Der Einfluss steigender Cerivastatindosierungen auf Serummarker des Cholesterinmetabolismus normocholesterinämischer Probanden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von: Wolfgang Hubert Schneider geb. Schneider
aus: Hausen

2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privat-Dozent Dr. rer. nat. Dr. med. sci. Dieter Lütjohann

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Lothar Siekmann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 2006

Aus der Abteilung für klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN **4**

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG **5**

1.1 Der Cholesterinstoffwechsel **5**

1.1.1 Die Cholesterinbiosynthese und Sterinresorption *5*

1.1.2 Der Cholesterinabbau *7*

1.1.3 Der Cholesterinstoffwechsel im Gehirn ***8***

1.2 Cholesterin, Statine und Zentrales Nervensystem **8**

1.3 Problemstellung **10**

2. MATERIAL UND METHODEN **11**

2.1 Studienteilnehmer **11**

2.2 Probennahme und -asservierung **11**

2.3 Probenaufarbeitung **12**

2.4 Beschreibung der Analyseverfahren **13**

2.5 Durchführung der Analysen **16**

2.5.1 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion *16*

2.5.2 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-massenselektiver Detektion ***17***

2.6 Statistik **19**

3. ERGEBNISSE **20**

3.1 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin im Verlauf der Untersuchung – graphische Darstellung und Interpretation der Ergebnisse **20**

3.1.1 Serumkonzentrationen des Cholesterins und seiner Vorstufen Lathosterin, Lanosterin und Desmosterin *20*

3.1.2 Ratios der Vorstufen Lathosterin, Lanosterin und Desmosterin zu Cholesterin *21*

3.1.3 Serumkonzentrationen der Cholesterinmetabolite 24S- und 27-Hydroxycholesterin *22*

3.1.4 Ratios der Cholesterinmetabolite zu Cholesterin *23*

3.1.5 Serumkonzentrationen der pflanzlichen Sterine Campesterin und Sitosterin *24*

3.1.6 Ratios der pflanzlichen Sterine zu Cholesterin ***25***

3.2 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin im Verlauf der Untersuchung – tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse **27**

3.2.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter sowie deren Ratio zu Cholesterin *27*

3.2.2 Korrelationsbetrachtungen der einzelnen Parameter ***28***

4. DISKUSSION **29**

5. ZUSAMMENFASSUNG **35**

6. LITERATURVERZEICHNIS **36**

DANKSAGUNG **45**

LEBENSLAUF **46**

ABKÜRZUNGEN

ABC	ATP-bindende Cassetten
BHT	3,5-di-*tert*.-Butyl-4-Hydroxy-Toluol
Camp	Campesterin
CHGC	Cholesterin (gaschromatographisch bestimmt)
Cyp 7A1	Cholesterin 7α-Hydroxylase
Cyp 27A1	Sterin 26-Hydroxylase
Desmo	Desmosterin
E. C.	Enzyme classification
FID	Flammenionisationsdetektion
GC	Gaschromatographie
HDL-C	High-Density Lipoprotein-Cholesterin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A
ISTD	Interner Standard
KHK	Koronare Herzkrankheit
Lano	Lanosterin
Latho	Lathosterin
LDL-C	Low-Density Lipoprotein-Cholesterin
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektive Detektion
MW	Mittelwert
m/z	Masse pro Ladung
OH-Chol	Hydroxycholesterin
PFTBA	Perfluortributylamin
R_Sterin	Ratio Sterin zu Cholesterin
SIM	Selected Ion-Monitoring
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Statistikprogramm)
SD	Standardabweichung
TMS-	Trimethylsilyl-
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Der Cholesterinstoffwechsel

1.1.1 Die Cholesterinbiosynthese und Sterinresorption

Wenige organische Moleküle haben ein so intensives und anhaltendes wissenschaftliches Interesse auf sich gelenkt wie das Cholesterin. Es ist das Paradebeispiel einer Janus-köpfigen Substanz, der Bösewicht, der einerseits Atherosklerose und vaskuläre Erkrankungen verursacht, andererseits aber auch für den Aufbau von Zellmembranen lebensnotwendig ist (Bloch, 1992). Im gesunden menschlichen Organismus stehen körpereigene Synthese, intestinale Aufnahme über die Nahrung, Veresterung durch spezifische Enzyme, extrazellulärer Transport mittels Lipoproteinen, und biliäre Ausscheidung des Cholesterins - in unveränderter oder in metabolisierter Form als Gallensäuren - miteinander im Gleichgewicht. Cholesterin ist ein sehr hydrophobes Molekül mit einer begrenzten Polarität aufgrund der β-ständigen Hydroxylgruppe am C3-Atom (Abbildung 1)**.** Seine Hydrophobizität bestimmt wesentlich die Zellmembranfluidität, macht jedoch spezielle Mechanismen für seinen Transport in wässriger Umgebung notwendig.

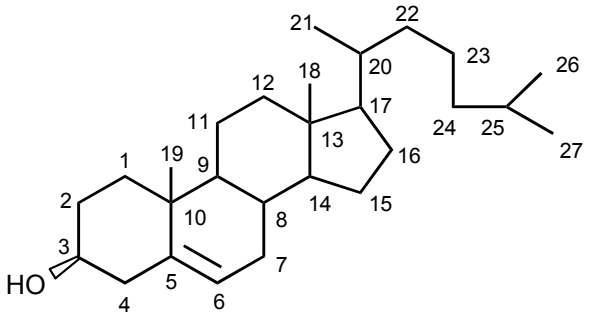


Abbildung 1 Strukturformel von Cholesterin (Cholest-5-en-3β-ol); die C-Atome sind systematisch durchnummeriert (Fieser und Fieser, 1961)

Häufig werden die absoluten Konzentrationen an Cholesterinvorstufen bzw. deren Ratio zu Cholesterin zur Beschreibung der Cholesterinbiosynthese in organischen Materialien wie Blut, Liquor, Fäzes oder Organpräparaten herangezogen. Die Serumkonzentrationen von Lanosterin (4,4´,14-Trimethylcholesta-8,24-dien-3β-ol), Desmosterin (Cholesta-5,24-dien-3β-ol) oder Lathosterin (Cholest-7-en-3β-ol) reflektieren die Aktivität der hepatischen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme-A- (HMG-CoA-) Reduktase (Enzyme classification [E.C.] 1.1.1.34)(Björkhem et al., 1987; Kempen et al., 1988; Miettinen et al., 1990; Reihner et al., 1990). Hierbei stellt das Lanosterin die erste steroidale Vorstufe in der Kaskade der Cholesterinsynthese dar (Abbildung 2).

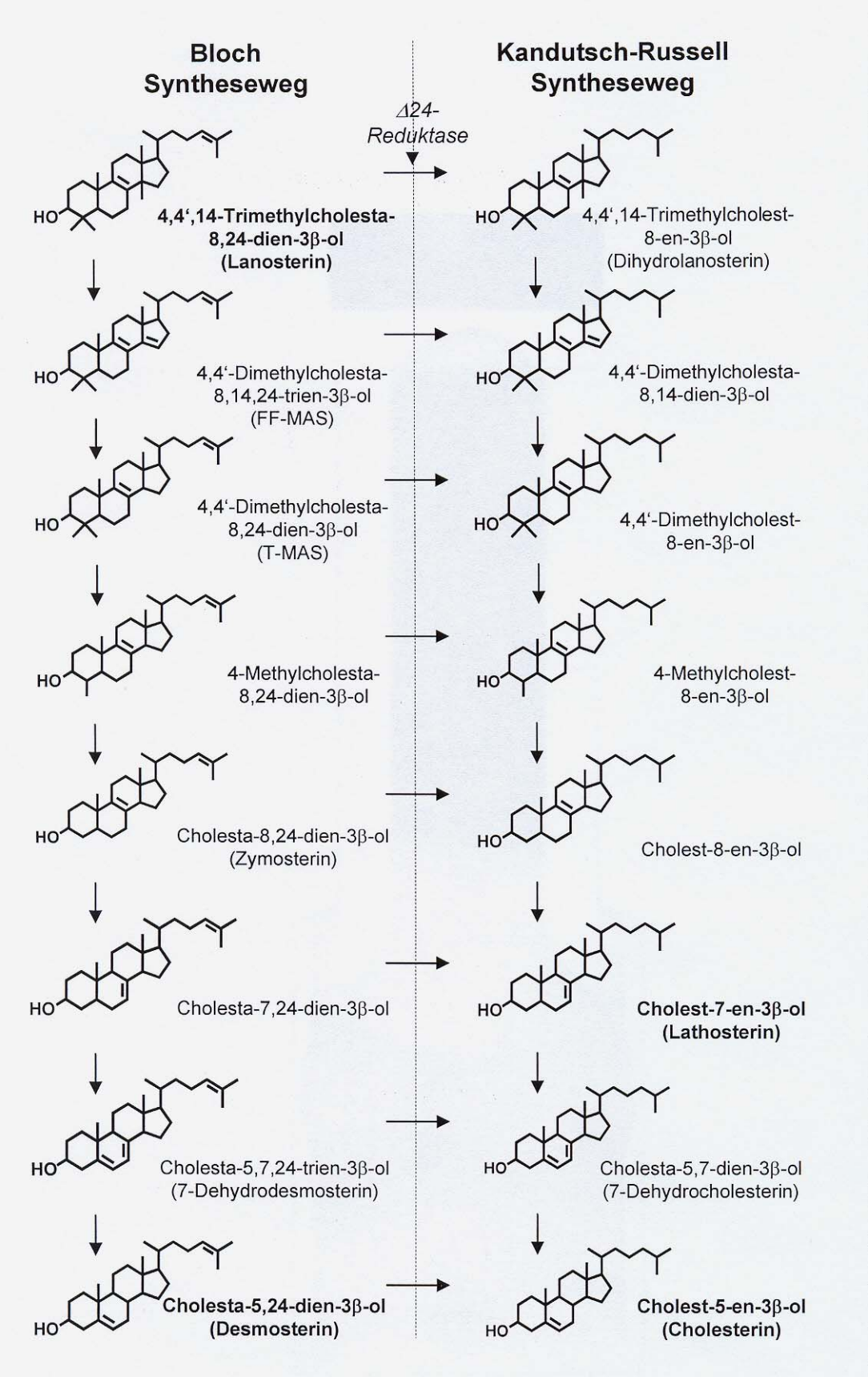


Abbildung 2 Steroidale Vorstufen der Cholesterinbiosynthese (modifiziert nach (Lütjohann et al., 2002))

Neben Cholesterin und seinen endogenen Vorstufen findet man in Serum, Liquor und Organellen Strukturanaloge des Cholesterins, die pflanzlichen Sterine bzw. Phytosterine. Sie unterscheiden sich von Cholesterin durch zusätzliche Methyl- (Campesterin)- oder Äthylgruppierungen (Sitosterin) am C24-Atom der Seitenkette des Cholesteringerüstes. Diese Phytosterine können dem menschlichen Körper nur über die Nahrung zugeführt werden und werden größtenteils sehr rasch über sogenannte selektive ATP-bindende Kassettentransporter **(**ABCG5/G8) vom Enterozyten direkt oder im Hepatozyten über die Galle in den Darm ausgeschieden (Berge et al., 2002; Lee et al., 2001; Yu et al., 2004). Die Aufnahmerate der Phytosterine im Dünndarm ist deutlich geringer als die des Cholesterins. Mit zunehmender Lipophilität nimmt die Resorptionsrate für Sterine ab. Cholesterin wird zwischen 20-70%, Campesterin bis zu 15% und Sitosterin zu weniger als 5% im Dünndarm resorbiert. Das Verhältnis (Ratio) von Campesterin oder Sitosterin zu Cholesterin im Serum stellt einen Surrogatserum- oder plasmamarker für die Cholesterinresorptionsrate dar (Miettinen et al., 1990). Findet man in einem gesunden Organismus einen sehr hohen Gehalt an pflanzlichen Sterinen, so weist dies auf eine allgemein erhöhte Resorptionsrate für Sterine, insbesondere für Cholesterin hin. Die Konzentrationen o.g. Cholesterinvorstufen und pflanzlicher Sterine werden heutzutage mittels hochsensitiver und -selektiver Methoden wie z.B. der massenspektrometrischen Detektion nach gas- oder flüssigkeitschromatographischer Trennung bestimmt.

1.1.2 Der Cholesterinabbau

Cholesterin ist im gesunden Organismus die Vorstufe von Gallensäuren und Steroidhormonen. Die komplette Synthese der Gallensäuren findet in der Leber statt, Vorstufen findet man jedoch auch in anderen Zellen. Eines der bedeutendsten Enzyme der Gallensäurensynthese ist die hepatische Cholesterin 7α-Hydroxylase (Cyp 7A1, E.C. 1.14.13.17). Sie steuert den initialen und geschwindigkeitbestimmenden Schritt im „klassischen“ (neutralen) Weg der Gallensäurenbiosynthese des Säugerorganismus (Princen et al., 1997; Russell, 2000). Die Sterin 26-Hydroxylase (Cyp 27A1, E.C. 1.14.13.15**)** katalysiert die Hydroxylierung verschiedener Sterinsubstrate, einschliesslich Cholesterin, zur Synthese von 27-Hydroxycholesterin und weiteren Intermediaten der Gallensäurenbiosynthese (Andersson et al., 1989; Cali und Russell, 1991; Russell, 2000; Wikvall, 1984). Diese und folgende Reaktionen bilden den „sauren“ Weg der Gallensäurenbiosynthese.

1.1.3 Der Cholesterinstoffwechsel im Gehirn

Über viele Jahre hinweg wurde der Cholesterinstoffwechsel im Gehirn weitgehend ignoriert, da dieses Organ für die Sterinökonomie im gesamten Organismus von geringer Bedeutung ist und nicht auf die Kontrollmechanismen reagiert, die für die Einhaltung des Steringleichgewichtes in den meisten anderen Organen, hauptsächlich in der Leber, verantwortlich sind (Dietschy und Turley, 2001). Jedoch müssen Neurone, wie alle anderen Zelltypen auch, kontinuierlich mit freiem Cholesterin versorgt werden, welches entweder intrazellulär durch *de novo* Synthese entsteht oder aus der extrazellulären Umgebung unter Verwendung spezifischer Liganden und Membrantransporter aufgenommen wird (de Chaves et al., 1997). Nahezu ein Viertel des nicht-veresterten Gesamtkörper-Cholesterins ist im zentralen Nervensystem (ZNS) enthalten, obwohl dieses nur ungefähr 2% der Gesamtkörpermasse ausmacht. Sehr wenig Cholesterin (<1%) wird von zirkulierenden Lipoproteinen über die protektive Blut-Hirn-Schranke aufgenommen (Dietschy und Turley, 2004). Neben einem geringen Abtransport über Lipoproteine, insbesondere über Apolipoprotein E, muss es für Cholesterin weitere Möglichkeiten geben, die Blut-Hirn-Schranke zu seiner Elimination zu überwinden (Pitas et al., 1987). 24S-Hydroxycholesterin, welches sich als Umwandlungs- und Transportform für Cholesterin (Björkhem et al., 1998; Lütjohann et al., 1996) aus dem Gehirn via Blut-Hirn-Schranke zur Peripherie zeigt, wird zunehmend als Liquor- oder Plasmamarker für das Cholesteringleichgewicht bzw. für seine Regulation im menschlichen Gehirn verwendet (Björkhem et al., 2001; Bretillon et al., 2000a; Bretillon et al., 2000b; Fassbender et al., 2002; Holdenrieder et al., 2004; Kölsch et al., 2004; Kölsch et al., 2002; Kölsch et al., 2003; Lütjohann et al., 2001; Lütjohann et al., 1996; Lütjohann et al., 2000; Lütjohann et al., 2004; Lütjohann und von Bergmann, 2003; Papassotiropoulos et al., 2002; Papassotiropoulos et al., 2000; Schonknecht et al., 2002).

1.2 Cholesterin, Statine und Zentrales Nervensystem

Erhöhte Serumkonzentrationen von Gesamtcholesterin und Low-Density Lipoprotein-Cholesterin (LDL-C) erhöhen das Risiko der Atherosklerose und koronarer Herzerkrankungen (KHK) (Kannel et al., 1971). Die Behandlung von Dyslipidämien mit HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statine) ist ein heutzutage häufig verwendeter therapeutischer Ansatz in der primären und sekundären Prävention der KHK (Grundy, 1998). Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, ein Schlüsselenzym, welches die Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonsäure katalysiert (Endo, 1981). Neben der Reduktion der hepatischen Cholesterinsynthese im Besonderen, erhöhen diese Substanzen die Anzahl der LDL-

Rezeptoren an der Oberfläche der Zellen (Brown und Goldstein, 1981) und erniedrigen hierbei die Konzentrationen von zirkulierendem LDL-Cholesterin in einer Dosis-abhängigen Weise (Jones et al., 1998). Trotz der großen Übereinstimmungen bei der Enzymbindung der verschiedenen Statine gibt es wesentliche Unterschiede hinsichtlich ihrer physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften. Mit Ausnahme von Pravastatin und Rosuvastatin sind alle übrigen Statine lipophile Verbindungen. Ein wesentlicher First-Pass-Effekt besteht – bedingt durch die Prodrug-Eigenschaften – bei Lovastatin und Simvastatin, bei den übrigen ist er weniger ausgeprägt (Schachter, 2005). Der Wirkmechanismus der Statine ist vielfältig. Neben ihrem primären Wirkmechanismus, der Senkung von Serum-Gesamtcholesterinwerten, insbesondere des LDL-Cholesterins, werden mit Statinen auch andere potenziell nützliche Effekte auf Parameter verbunden, die mit dem Risiko für das Auftreten koronar oder allgemein vaskulär bedingter Ereignisse in Zusammenhang gebracht werden und als Risikomarker oder -faktor für derartige Ereignisse angesehen werden (so genannte pleiotrope Effekte) (Davignon, 2004). Beispielsweise kann hier die Wirkung auf die Thrombozytenfunktion, das HDL-Cholesterin und das C-reaktive Protein genannt werden (Balk et al., 2003; Law et al., 2003; Lee und Sacks, 2003; Puccetti et al., 2005). Welche dieser vielfältigen Statinwirkungen letztlich für den Nutzen einer Statintherapie bei Hochrisikopatienten bedeutsam sind und welche weiteren pathophysiologischen Mechanismen involviert sind, ist jedoch nach wie vor unklar. Um die kardiale Morbidität und Todesrate zu senken, sollten LDL-Cholesterinwerte <100 mg/dL erreicht werden, wie dies im dritten Bericht des Nationalen Cholesterinschulungsprogramm zur Behandlung von Erwachsenen vorgeschlagen wurde (Brewer, 2003). Eine Erweiterung des Protokolles fordert nun bei Hochrisikopatienten sogar einen LDL-Cholesteringehalt im Serum von < 70 mg/dl (Grundy et al., 2004). Aggressive und hochdosierte Statintherapie führt zum Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen und kann lebensbedrohliche Zustände wie Myopathie oder Rhabdomyolyse verursachen (Ballantyne et al., 2003; Paiva et al., 2005). Daher wurde schliesslich im August 2001 das Präparat Cerivastatin vom Markt genommen (SoRelle, 2001). Bemerkenswerterweise kam der Einfluß der Statine auf das ZNS in den letzten Jahren in den Fokus der Lipidforschung und der Neurowissenschaften. Die Einnahme von Statinen über eine längere Zeit wurde mit einer niedrigeren Prävalenz für dementielle Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit assoziiert (Jick et al., 2000; Rockwood et al., 2002; Wolozin et al., 2000). Aus pharmakologischer Sicht ist es von größtem Interesse zu untersuchen, ob dieser Effekt durch eine lokale Hemmung der Cholesterinsynthese oder andere Effekte der Statine wie z.B. anti-inflammatorische, sogenannte pleiotrope Effekte, zurückzuführen ist (Davignon

und Ganz, 2004; Gupta, 2003). Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass nur lipophile Statine wie z.B. Simvastatin die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Tsuji et al., 1993), obwohl die aktiven Formen von Simvastatin und Pravastatin chemisch ähnliche Strukturen aufweisen (Serajuddin et al., 1991). In einer Untersuchung, die in der Abteilung für Klinische Pharmakologie Bonn vor einigen Jahren durchgeführt wurde, führte die aggressive Behandlung mit Simvastatin, einem lipophilen Statin, in einer Dosierung von 80 mg/Tag bei Patienten mit Hyperlipidämie über 24 Wochen zu einer deutlichen Senkung des absoluten und für Cholesterin korrigierten Serumgehaltes von 24S-Hydroxycholesterin, welches auf eine bedeutende Einwirkung auf den Cholesterinmetabolismus im Gehirn hinweist (Locatelli et al., 2002). In einer weiteren plazebo-kontrollierten Untersuchung bei 44 Alzheimer Patienten über 26 Wochen wurde eine geringere Verschlechterung des kognitiven Zustandes bei denjenigen Patienten gefunden, die 80 mg Simvastatin/Tag erhielten. Simvastatin erniedrigte den Gehalt an Lathosterin und 24S-Hydroxycholesterin im Liquor der Patienten mit milder Form der Alzheimer Demenz (Simons et al., 2002). Im Gegensatz hierzu zeigte eine Untersuchung von Plasmamaterial aus einer klinischen Studie, bei der 51 gesunde Männer über 6 Monate entweder Plazebo oder 40 mg/Tag hydrophiles Pravastatin erhielten, keine Änderung der Plasmakonzentrationen von 24S-Hydroxycholesterin unter Pravastatin und somit keinen Einfluss dieses Statins auf die Cholesterinbiosynthese im ZNS (Thelen et al., 2006). Ob eine Langzeitbehandlung mit anderen Statinen ebenfalls die Gehalte an 24S-Hydroxycholesterin senkt, muss erst noch gezeigt werden.

1.3 Problemstellung

In dieser Untersuchung wurde der Einfluß von ansteigenden Dosierungen eines lipophilen Statins, dem Cerivastatin (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag), über jeweils 6 Wochen bei 6 männlichen, normocholesterinämischen Probanden auf Surrogatmarker des Cholesterinmetabolismus untersucht. Da aus vorhergehenden Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe ein Einfluss von hochdosiertem Simvastatin auf den Cholesterinmetabolismus im Gehirn nachgewiesen wurde, soll in dieser Untersuchung primär die Wirkung von unterschiedlichen Dosierungen von Cerivastatin auf Serum-Surrogatmarker des zentralen Cholesterinstoffwechsels untersucht werden. Weitere Untersuchungsparameter beziehen sich auf die periphere Cholesterinsynthese und den Cholesterinabbau.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienteilnehmer

Sechs Männer im Alter zwischen 24 und 48 Jahren (38 ± 9 Jahre, MW ± SD) mit einem Body-Mass Index von 24,5 bis 27,7 kg/m^2 (26,0 ± 1,54 kg/m^2) nahmen an dieser Untersuchung teil. In der hier beschriebenen Studie haben wir Änderungen von Cholesterin und Serummarkern der Cholesterinbiosynthese und intestinalen Resorptionsrate sowie seiner Abbauprodukte in Gehirn und Leber unter aufsteigenden Dosierungen von Cerivastatin (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag) verfolgt. Die Analytik erfolgte post-hoc aus asserviertem Probenmaterial aus einer Untersuchung, die in der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Marburg (Dir.: Prof. Dr. med. B. Maisch), unter der Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Schäfer mit dem primären Ziel durchgeführt wurde, unter den ansteigenden Cerivastatinkonzentrationen eine *in vivo* HDL- und LDL-Kinetik nach Infusion von mit stabilen Isotopen markiertem Leucin ($^2H_3$-Leucin) bei jedem Patienten zu bestimmen. Diese Untersuchungen folgten den Prinzipien der Helsinki-Deklaration zur Durchführung von klinischen Studien am Menschen unter ethischen Gesichtspunkten. Alle Teilnehmer unterschrieben vor Eintritt in die Studie eine **Einverständniserklärung**. Die lokale **Ethikkommission** der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg gab ihr Positivvotum. Eine weitere Lipid-senkende Therapie war ausgeschlossen. Die Probanden wurden gebeten, für die Dauer der Studie weder Ess- und Rauchgewohnheiten noch körperliche Aktivität zu ändern. Ausschlusskriterien waren kardiovaskuläre, thromboembolische und endokrinologische Erkrankungen in der Vorgeschichte und erhöhter Konsum von Alkohol oder Drogen sowie auch relevante Abweichungen klinisch-chemischer Laborparameter von Leber- und Nierenfunktion.

2.2 Probennahme und -asservierung

Venöse Blutabnahmen wurden unmittelbar vor Studienbeginn als Basismessung sowie im Studienverlauf nach 6, 12 und 18 Wochen nach aufsteigender Dosierung der Medikation durchgeführt. Dazu mussten die Probanden nüchtern sein und eine wenigstens 10-stündige Rauch- sowie 24-stündige Alkoholkarenz einhalten. Die Blutentnahmen erfolgten dann zwischen 8 und 10 Uhr morgens nach einer wenigstens 20-minütigen Ruhepause kurz vor der Infusion einer $^2H_3$-Leucin-Lösung. Die Proben wurden innerhalb einer Stunde nach Entnahme bei 3000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und nach Aufteilung in Aliquots (1 ml Eppendorfgefäße) in flüssigem Stickstoff schockgefroren bei -70°C bis zum Zeitpunkt der Analyse aufbewahrt. Da nach der Zentrifugation dem Serum kein Antioxidanz wie z. B. 3,5-

di-*tert*-Butyl-4-Hydroxy-Toluol (BHT; Merck, KGaA, Darmstadt) zugesetzt wurde, konnten wir nicht ausschließen, dass ein gewisser Anteil von Cholesterin bei der Probenasservierung und vor der Aufarbeitung bereits autoxidativ in 7α-Hydroxycholesterin umgewandelt wurde. Daher verzichteten wir in unserer Untersuchung auf die Bestimmung dieser Gallensäurenvorstufe.

2.3 Probenaufarbeitung

Die Sterine in den Serumproben werden zur gaschromatographischen (GC) Trennung mit anschließender Flammenionisationsdetektion (FID) oder massenselektiver Detektion (MSD) im Scan oder Selected Ion-Monitoring (SIM) Modus zunächst in ihre freie Form gebracht, indem durch eine alkalische Hydrolyse die fettsäureveresterten Sterine dekonjugiert werden. Danach werden die freien Sterine extrahiert und mittels eines Silylierungsreagenzes in einen Silylsterinäther umgewandelt (Lütjohann et al., 2000).

- → Die tiefgefrorenen Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.
- → 1 µg Epicoprostanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) (10 µl einer Stammlösung von 100 µg/ml in Cyclohexan, Merck KGaA, Darmstadt), 50 µg 5α-Cholestan (Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg) (50 µl einer Stammlösung von 1 mg/ml in Cyclohexan) und jeweils 100 ng razemisches [23,23,24,25-$^2H_4$]24(R,S)-Hydroxycholesterin (Klinische Chemie, Karolinska-Institut, Stockholm, Schweden, (Dzeletovic et al., 1995)) und [15,16,17,20,22-$^2H_5$]27-Hydroxycholesterin (Klinische Chemie, Karolinska-Institut, Stockholm, Schweden, (Dzeletovic et al., 1995)) (100 µl einer Stammlösung eines Gemisches von [$^2H_4$]24(R,S)-Hydroxycholesterin und [$^2H_5$]27-Hydroxycholesterin, 1 µg/ml in MeOH, Merck, KGaA, Darmstadt) wurden als interne Standards zu 200 µl der Serumprobe bei Raumtemperatur in einem Teflon-beschichteten Reagenzglas mit Schraubverschluss zugesetzt.
- → Zur Vermeidung von weiteren autoxidativen Prozessen wurden außerdem noch 50 ng BHT (10 µl aus einer Stammlösung von 50 mg BHT/10 ml MeOH) zugesetzt.
- → Zur alkalischen Hydrolyse wurde das Probengemisch nach Zusatz von 1 ml 90%-iger äthanolischer NaOH-Lsg. (1M) (Merck, KGaA, Darmstadt) im Wasserbad bei 68°C über 1 Stunde inkubiert.
- → Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zusatz von 500 µl aqua bidest. wurden die freien Sterine zweimal in 3 ml Cyclohexan (Merck KGaA, Darmstadt) extrahiert.

→ Die vereinigten organischen Phasen wurden unter Stickstoffbegasung bei 65°C getrocknet.

→ Die Hydroxylgruppen der Sterine wurden nach Zugabe von 1 ml eines Trimethylsilylierungs- (TMS-) Reagenzes (Pyridin-Hexamethyldisilazan-Trimethylchlorsilan, 9:3:1; v/v/v) (Merck, KGaA, Darmstadt) zum Rückstand nach 1-stündiger Inkubation bei 65°C zu TMS-Äthern derivatisiert.

→ Die restlichen Silylierungsreagenzien wurden daraufhin unter Stickstoffbegasung bei 65°C verdampft.

→ Der Rückstand wurde in 160 µl n-Dekan (Merck KGaA, Darmstadt) gelöst.

→ 80 µl dieses Gemisches an Sterintrimethylsilyläthern in n-Dekan wurden in die Mikroeinsätze der Glasphiolen für die GC-MSD-Analyse überführt.

→ Die übrigen 80 µl wurden mit 500 µl n-Dekan für die GC-FID-Analyse verdünnt.

→ Die Glasphiolen wurden zur eindeutigen Identifizierung beschriftet.

2.4 Beschreibung der Analyseverfahren

Cholesterinvorstufen und -metabolite wie das 24S- und das 27-Hydroxycholesterin liegen im Serum in einer 10^3 bis 10^4-fach geringeren Konzentration als ihre Ausgangssubstanz Cholesterin vor. Daher wird die Konzentration des Cholesterins in Serumproben durch die weniger spezifische und selektive **Flammenionisationsdetektion** nach **gaschromatographischer Trennung** bestimmt, während die Cholesterinvorstufen und -metabolite durch die hochspezifische und -sensitive **massenselektive Detektion** aus der gleichen Probenaufarbeitung erfasst werden. Die Identifizierung von Cholesterin erfolgt über den Vergleich der Retentionszeiten mit zertifizierter Referenzsubstanz und die Quantifizierung erfolgt über einen zu Beginn der Aufarbeitung zugesetzten internen Standard (5α-Cholestan), der physiologischerweise nicht im Serum enthalten ist und dem zu bestimmenden Sterin chemisch möglichst ähnlich ist.

Nutzt man die **Massenspektrometrie** zur Strukturidentifizierung, muss eine kontinuierliche Aufnahme von Massenspektren über einen großen Massenbereich (z.B. 50-600 m/z) erfolgen (Scan Modus), d.h. man registriert alle Ionen, in die eine Substanz zerfällt, nach Masse-Ladungs-Verhältnis und nach relativer Intensität. Bei der Quantifizierung beschränkt man sich auf die Aufzeichnung von wenigen charakteristischen Massen, bei denen die Verbindung Fragmente höchster Intensität bildet (SIM Modus). Die Messzeit auf den ausgewählten und zyklisch registrierten Massen wird verlängert und so die Empfindlichkeit der Messung (Sensitivität) um den Faktor 30 bis 50 gesteigert (Hübschmann, 1996). Zur quantitativen

Bestimmung von Cholesterinvorstufen und pflanzlichen Sterinen wird Epicoprostanol, ein nicht-physiologisches Stanol, und zur Bestimmung von Oxysterinen werden mehrfach deuterierte Oxysterine als interne Standards verwendet. Die mit stabilen Isotopen markierten Oxysterine weisen aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu den nicht-deuterierten Substanzen das gleiche Verteilungsverhalten auf und unterscheiden sich von den authentischen Substanzen lediglich in der Masse ihrer Hauptfragmente, so dass sie massenspektrometrisch voneinander getrennt erfasst werden können. Die deuterierten Oxysterole weisen im Vergleich zu den nicht-deuterierten Substanzen leicht verkürzte Retentionszeiten auf (Hübschmann, 1996). Das Epicoprostanol und die stabilen Isotope werden den Proben ebenfalls vor Beginn der Aufarbeitung zugesetzt. Das Massenspektrum der TMS-Derivate von 24S-OH-Chol und 27-OH-Chol im Vergleich zu ihren deuterierten Verbindungen ist in Abbildung 3 dargestellt. Das Massenspektrum des TMS-Derivates von 24S-OH-Chol (Masse = 546) weist 2 Fragmente mit Massen von m/z 503 und m/z 456 auf, was einer Abspaltung der Isopropylgruppe [M^+(-43)] bzw. der Trimethylsilanolgruppe [M^+(-90)] entspricht (Abbildung 3A). Diese Ionen weisen zwar höhere Massen aber geringere Intensitäten auf als das Fragment mit Masse m/z 413. Dieses charakteristische Fragment höchster Intensität entsteht durch Abspaltung sowohl der Isopropyl- als auch der Trimethylsilanolgruppe [M^+(-43)(-90)] und wird daher im SIM-Modus hier massenselektiv detektiert. Das Molekülion [M^+] der Masse m/z 546 tritt im Massenspektrum von 24S-OH-Chol sowie in dem von 27-OH-Chol auf, da beide Verbindungen gleiches Molekulargewicht besitzen. Das Fragment der Masse m/z 456, welches durch Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe [M^+(-90)] aus dem TMS Derivat von 27-OH-Chol entsteht, hat die höchste Masse und Intensität und dient daher der Bestimmung von 27-OH-Chol (Abbildung 3C). Die deuterierten Standards werden auf den entsprechend höheren Massen gemessen (Abbildungen 3B und 3D). Für den vierfach deuterierten Standard [23,23,24,25-$^2H_4$]24(R,S)-OH-Chol reduziert sich die Markierung nach Fragmentierung auf eine dreifache Deuterierung, so dass das Fragment höchster Intensität die Masse m/z 416 aufweist. Bei [15,16,17,20,22-$^2H_5$]27-OH-Chol bleibt auch nach der Fragmentierung die fünffache Deuterierung erhalten, die Verbindung wird daher auf der Masse m/z 461 massenselektiv detektiert.

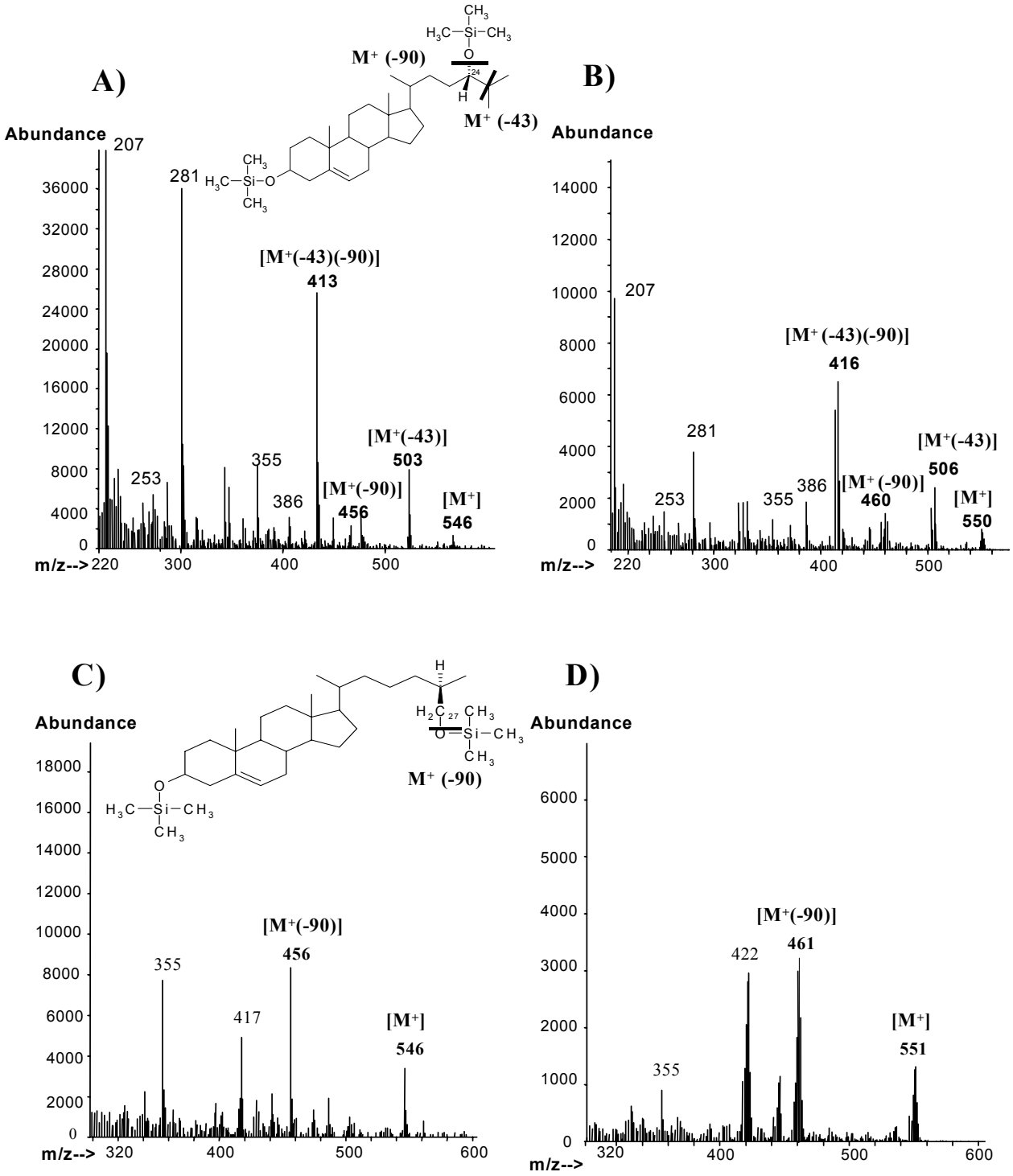


Abbildung 3 Massenspektren der Trimethylsilyl-Derivate von 24S-Hydroxycholesterin (A) und des vierfach deuterierten racemischen Gemisches (B) sowie von 27-Hydroxycholesterin (C) und seiner fünffach deuterierten Verbindung (D)

2.5 Durchführung der Analysen

2.5.1 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion

Das Sterintrimethylsilyläthergemisch wurde mit einem HP 7683 Injektor auf eine vernetzte Methylsilikon DB-XLB 122-1232 Kapillarsäule (J&W, Folsom, USA) (30m x 0,25 mm Innendurchmesser x 0,25 µm Schichtdicke) in einem Hewlett Packard Gaschromatographen (HP 6890) nach splittloser Injektion bei 280°C injiziert. Der Trägergasfluss – in unserem Falle: Wasserstoff - betrug 1,1 ml/min. Die Ofentemperatur wurde zu Beginn für 3 min bei 150°C gehalten und dann mit einer Steigerungsrate von 30°C/min auf eine Endtemperatur von 290°C geführt. Diese Temperatur blieb über 22,33 min konstant. Der interne Standard 5α-Cholestan wurde mit einer Retentionszeit von 12,0 min und der Cholesterintrimethylsilyläther mit einer Retentionszeit von 15,88 min im Flammenionisationsdetektor (FID) bei 280°C mit einem kombinierten konstanten Säulen- und Make-up-Fluss (Wasserstoff + Stickstoff; 30 ml/min) detektiert. Die Steuerung des Gaschromatographen und die Auswertung der Gaschromatogramme sowie die Quantifizierung erfolgte durch die HP GC ChemStation Software (Version 2.1.1.0) auf einem Kayak XA Pentium II-Computer. Zur **Quantifizierung** wird die integrierte Fläche des Cholesterinpeaks durch die Fläche des 5α-Cholestanpeaks dividiert und mit dem vorgegebenen Gehalt an internem Standard von 50 µg multipliziert. Dies ergibt den Gehalt an Cholesterin in µg pro Probe. Bei einer eingesetzten Menge von 200 µl muss man diesen Betrag noch auf 100 ml umrechnen, um die Cholesterinkonzentration in mg/dl anzugeben. Zur **Validierung dieser Einpunkt-Eichmethode** mit 5α-Cholestan als internem Standard wurden die Ergebnisse der Serumkonzentrationen von Cholesterin einer Einpunkt-Eichung gegenüber einer erstellten Eichgerade verglichen. Die Ergebnisse zeigten gute Übereinstimmung beider Eichverfahren. Abbildung 3 zeigt die Eichkurve für Cholesterin mit 5α-Cholestan als internem Standard in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 200 µg/Probe. Zur **Präzision der Methode** wurde die gleiche Serumprobe sechsfach aufgearbeitet und gemessen (**Wiederholbarkeit**), sowie eine aufgearbeitete Probe nach Silylierung sechsmal hintereinander injiziert um die Stabilität des Messinstrumentes zu zeigen. Für die Wiederholbarkeit der Einpunkt-Methode ergab sich ein Variationskoeffizient von 1,45 % (n=6) und für die Stabilitätsmessung des GC-FID ein Variationskoeffizient von 1,60 % (n=6). Die **Nachweisgrenze einer Substanz** wird normalerweise ermittelt, indem man bekannte niedrige Konzentrationen des Analyten mit substanzfreiem Medium gegenüberstellt und die minimale Konzentration ermittelt, bei der der Analyt gerade noch erfasst werden kann. Ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 wird zur Bestimmung der Nachweisgrenze akzeptiert. Bei der Bestimmung von Cholesterin im Serum gibt es bezüglich der Nachweisgrenze für

Cholesterin kein Problem. Daher wird die **Nachweisgrenze** für die GC-FID-Methode auf < 0.1 mg/dl durch den niedrigsten Punkt unserer Eichkurve festgelegt (Abbildung 4). Für die **Bestimmungsgrenze** in biologischen Matrizes wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 festgelegt. Der Einfluss der chromatographischen Basislinie kann für den Analyten Cholesterin vollständig vernachlässigt werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis übersteigt hier die Bestimmungsgrenze erheblich. Die Reinheit der Referenzsubstanzen wurde mittels GC-FID und GC-MSD bestätigt und die Stammlösungen wurden bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt. Pipetten und Wägeeinheiten wurden turnusmässig validiert.

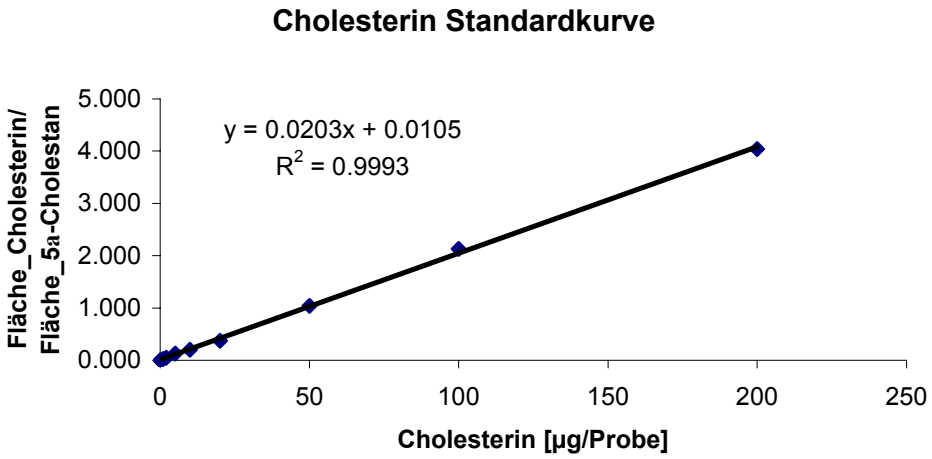


Abbildung 4 Eichkurve für Cholesterin mit 5α-Cholestan als Internem Standard

2.5.2 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-massenselektiver Detektion

Die säulenchromatographische Trennung des Sterinsilylgemisches erfolgte auf einer 30 m DB-XLB Kapillarsäule mit Helium als Trägergas. Der Trägergasfluss betrug 1.0 ml/min. Das Temperaturprogramm startete gleichfalls mit 150°C für 1 min und wurde mit einer Steigerungsrate von 30°C/min auf 290°C fortgeführt. Die Endtemperatur wurde über 30 Minuten gehalten. Die Injektor- und Transferlinetemperatur wurde auf 280°C fest eingestellt. Die Multiplierspannung lag bei 2700 Volt. Der Elektronenstrom an der Kathode betrug 220 mA und die Elektronenimpakt-Ionisationsspannung wurde auf 70eV festgelegt. Das Selected-Ion-Monitoring wurde im Daten-Acquirierungsprogramm so eingestellt, dass der Quadrupolmassenfilter innerhalb einer Sekunde die gewählten m/z-Werte zweimal erfassen kann. Vor jeder größeren Analysensequenz wurde zur Optimierung der Messeigenschaften des MSD eine vorgegebene automatische Selbstjustierung mittels einer definierten Substanz (PFTBA – Perfluortributylamin, Agilent Technologies, Waldbronn) in Form eines „Autotunes“ durchgeführt. Der SIM-Modus wurde mit dem Ion m/z 370 für Epicoprostanol

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) begonnen. In Tabelle 1 sind die Retentionszeiten und spezifischen Massen für jede gemessene Substanz aufgelistet.

Tabelle 1 Parameter zur gaschromatographischen Trennung und massenselektiven Detektion von Trimethylsilylsterinäthern

No.	TMSi-Äther von	Kategorie	Retentionszeit [min]	m/z
1	Epicoprostanol	ISTD	16,9	370
2	Desmosterin	Cholesterinvorstufe	19,6	441
3	Lathosterin	Cholesterinvorstufe	20,3	458
4	Campesterin	Phytosterin	21,3	472
5	Lanosterin	Cholesterinvorstufe	23,8	393
6	Sitosterin	Phytosterin	23,8	486
7	[$^2H_4$]24R,S-Hydroxycholesterin	ISTD	25,0	416
8	24S-Hydroxycholesterin	Cholesterinmetabolit	25,1	413
9	[$^2H_4$]27-Hydroxycholesterin	ISTD	28,7	461
10	27-Hydroxycholesterin	Cholesterinmetabolit	28,9	456

Für jedes zu messende Sterin wurde eine eigene Eichgerade erstellt, die darüber Aufschluss gab, ob integrierte Peakflächen und eingesetzte Substanzkonzentrationen linear verlaufen. Dies ist Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung. Steigende Mengen an Sterinen und unmarkierten Oxysterinen, denen je gleiche Mengen an Epicoprostanol bzw. mit stabilen Isotopen markiertes 24(R,S)-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin zugesetzt wurden, wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie im SIM Modus gemessen und das Verhältnis der Peakfläche des unmarkierten zu der des jeweiligen Internen Standards gegen die eingesetzten Substanzmengen (ng) aufgetragen.

Zur **Identifizierung** der jeweiligen Substanzen wurde die Identität der Massenspektren aller Substanzen, die mittels GC-MSD im SCAN Modus aus Serumproben bestimmt wurden, durch den Vergleich der Massenspektren mit authentischen Referenzsubstanzen bestätigt. Selbst Analyte, die gaschromatographisch nicht eindeutig voneinander abgetrennt werden konnten, konnten aufgrund ihrer spezifischen Massen im SIM Modus voneinander unterschieden und quantifiziert werden. Somit konnte z. B. das Lanosterin (Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg) neben dem Sitosterin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) bei sehr nahe beieinanderliegenden Retentionszeiten unterschieden werden.

Die Linearität der Eichkurven, die **Spannweite** und die **Quantifizierungsgrenze** wurde für jede einzelne Substanz überprüft und wir erhielten für die Sterine und Oxisterine folgende Charakteristika:

Tabelle 2 Eichgeradencharakteristika und Nachweisgrenzen

Analyt	Achsenabschnitt	Anstieg	R	Spannweite	Quantifizierungs-grenze
Desmosterin	-0,0051	0,1453	0,9996	0,06-8.1 mg/dl	0,06 µg/dl
Lathosterin	-0,004	0,760	0,9996	0,01-3.2 mg/dl	0,02 µg/dl
Campesterin	-0,0025	0,2451	0,9995	0,02-55.6 mg/dl	0,02 µg/dl
Lanosterin	-0,0071	0,7107	0,9995	0,01-0,95 mg/dl	0,02 µg/dl
Sitosterin	-0,0056	0,2221	0,9995	0.35-83.9 mg/dl	0,06 µg/dl
24S-OH-Chol	0,022	0,0053	0,9996	7-210 ng/ml	8 ng/ml
27-OH-Chol	0,0218	0,0044	0,9998	12-360 ng/ml	10 ng/ml

2.6 Statistik

Alle Originaldaten wurden in Excel-Dateien eingetragen und in eine SPSS- (Statistical Package for the Social Sciences, Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) Basisdatei zu weiteren statistischen Betrachtungen übertragen. Die Daten erscheinen in den Tabellen als Mittelwerte ± Standardabweichung und in den Abbildungen als Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede für den jeweiligen Parameter nach ansteigenden Konzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert oder der unterschiedlichen Dosierungen zueinander. Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte für alle Parameter eine Normalverteilung. Mit der Prozedur "T-Test bei gepaarten Stichproben" werden die Mittelwerte zweier Variablen für eine einzelne Gruppe verglichen. Bei diesem Test werden für jeden Fall die Differenzen zwischen den Werten der zwei Variablen berechnet und überprüft, ob der Durchschnitt von 0 abweicht. In der Standardeinstellung wird ein 95%-Konfidenzintervall für die Differenz der Mittelwerte angezeigt. Ein p-Wert $< 0,05$ wird als signifikanter Wert angenommen. Zur Beschreibung von bivariaten Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit dem jeweiligen Signifikanzniveau berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin im Verlauf der Untersuchung – graphische Darstellung und Interpretation der Ergebnisse

3.1.1 Serumkonzentrationen des Cholesterins und seiner Vorstufen Lathosterin, Lanosterin und Desmosterin

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede des gaschromatographisch bestimmten Gesamtcholesterins zeigten nach 0,2 mg Cerivastatin/Tag eine jeweils signifikante Senkung um 17,8% (p = 0,001), nach 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 19,4% (p < 0,001) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 22,6% (p < 0,001) (Abbildung 5). Der Mittelwert der individuellen prozentualen Änderungen nach Gabe von 0,8 mg Cerivastatin/Tag war um 5,8% (p = 0.011) höher als nach Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag.

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede von Lathosterin zeigten nach Behandlung mit 0,2 mg Cerivastatin/Tag eine Senkung um 42,4% (p = 0,032), nach 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 57,8% (p < 0,009) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 56,8% (p < 0,008) (Abbildung 5). Zwischen den Mittelwerten der einzelnen Therapiegruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede von Lanosterin zeigten nach Behandlung mit 0,2 mg Cerivastatin/Tag eine Senkung um 15,9% (p = 0,044), nach 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 20,9% (p < 0,015) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 21,8% (p < 0,012) (Abbildung 5). Zwischen den einzelnen Therapiegruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede von Desmosterin zeigten nach Behandlung mit 0,2 mg Cerivastatin/Tag eine Senkung um 15,5% (p = 0,006), nach 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 23,9% (p = 0,001) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 25,5% (p = 0,008) (Abbildung 5). Der Mittelwert der individuellen prozentualen Änderungen nach Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag war um 9,9% (p = 0.008) niedriger als nach Gabe von 0,4 mg Cerivastatin/Tag und um 11,8% (p = 0.012) niedriger als nach Gabe von 0,8 mg Cerivastatin/Tag.

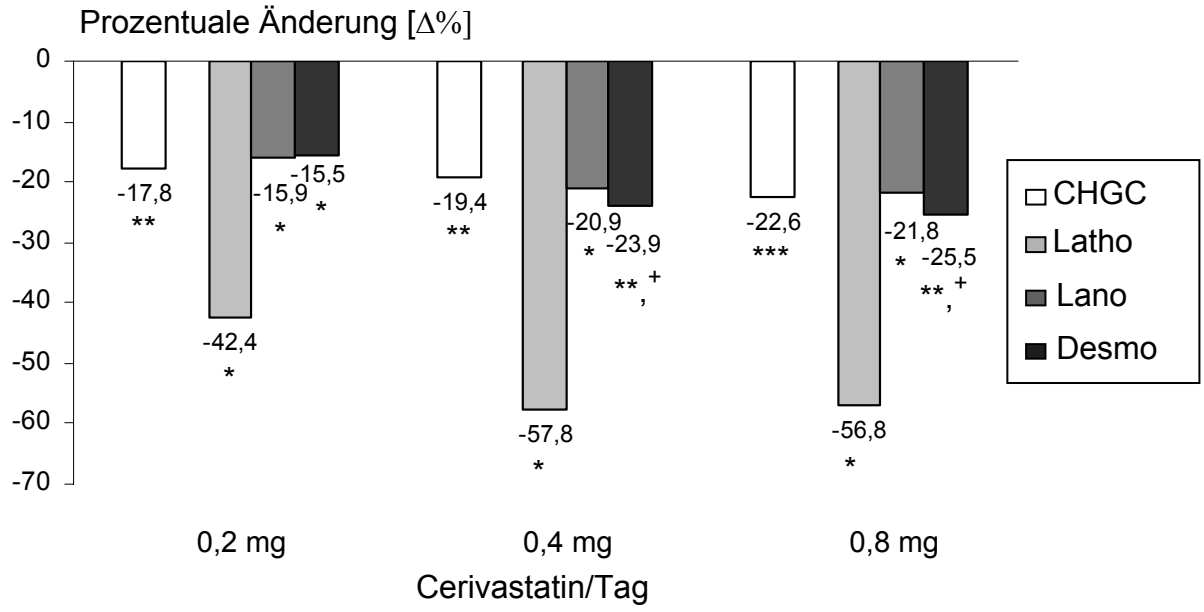


Abbildung 5 Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen zum Ausgangswert von Cholesterin (CHGC), Lathosterin (Latho), Lanosterin (Lano) sowie von Desmosterin (Desmo) im Serum nach steigender Cerivastatindosierung (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert. $^{+}$ $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag.

3.1.2 Ratios der Vorstufen Lathosterin, Lanosterin und Desmosterin zu Cholesterin

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede der Ratio Lathosterin zu Cholesterin zeigten nach Behandlung mit 0,4 mg Cerivastatin/Tag eine signifikante Senkung um 44,4% ($p < 0,023$) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 39,6% ($p < 0,023$) (Abbildung 6). Der Mittelwert der individuellen prozentualen Änderungen nach Gabe von 0,4 mg Cerivastatin/Tag war um 20,1% ($p = 0.032$) höher als nach Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag.

Die verschiedenen Dosierungen zeigten im Vergleich der Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen der Ratios Lanosterin und Desmosterin zu Cholesterin weder zum Ausgangswert noch untereinander signifikante Unterschiede (Abbildung 6).

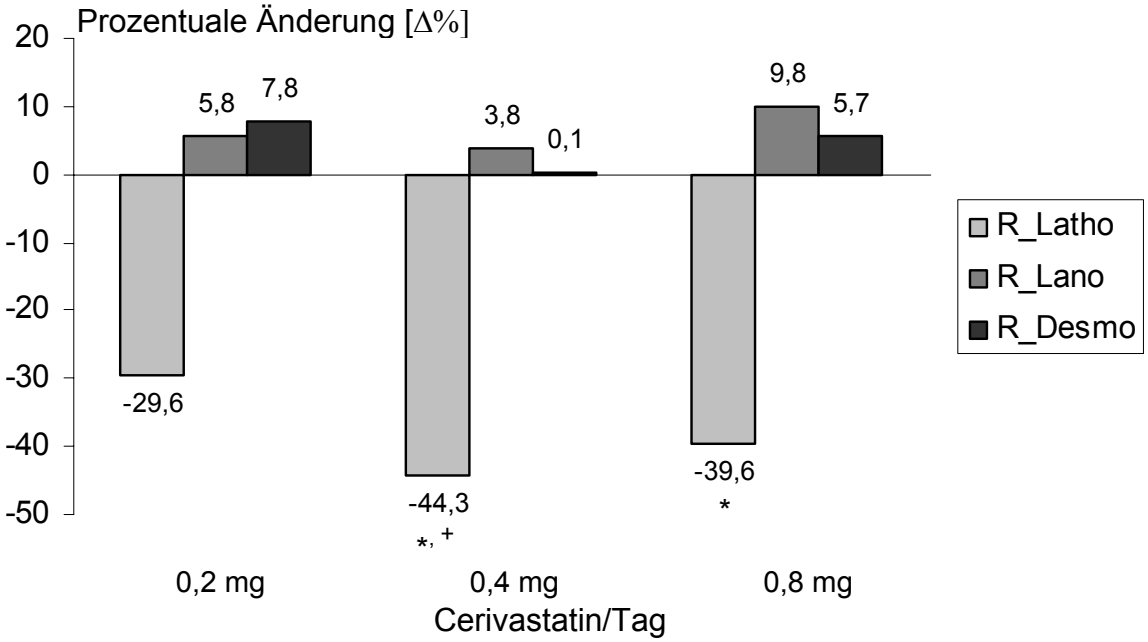


Abbildung 6 Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen zum Ausgangswert der Ratios von Lathosterin (R_Latho), Lanosterin (R_Lano) und Desmosterin (R_Desmo) zu Cholesterin im Serum nach steigender Cerivastatindosierung (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag). * $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert. $^{+}$ $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag

3.1.3 Serumkonzentrationen der Cholesterinmetabolite 24S- und 27-Hydroxycholesterin

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede von 24S-Hydroxycholesterin zeigten nach Behandlung mit 0,2 mg Cerivastatin/Tag eine Senkung um 28,7% ($p < 0,001$), nach 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 31,5% ($p < 0,001$) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 36,1% ($p = 0,008$) (Abbildung 7). Der Mittelwert der individuellen prozentualen Änderungen nach Gabe von 0,8 mg Cerivastatin/Tag war um 10,3% ($p = 0.024$) niedriger als nach Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag und um 6,8% ($p = 0.025$) niedriger als nach Gabe von 0,4 mg Cerivastatin/Tag.

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede von 27-Hydroxycholesterin zeigten nach Behandlung mit 0,2 mg Cerivastatin/Tag eine Senkung um 24,2% ($p < 0,004$), nach 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 28,5% ($p < 0,005$) und nach 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 31,2% ($p < 0,004$) (Abbildung 7). Der Mittelwert der individuellen prozentualen Änderungen nach Gabe von 0,8 mg Cerivastatin/Tag war um 9,3% ($p = 0.033$) niedriger als nach Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag.

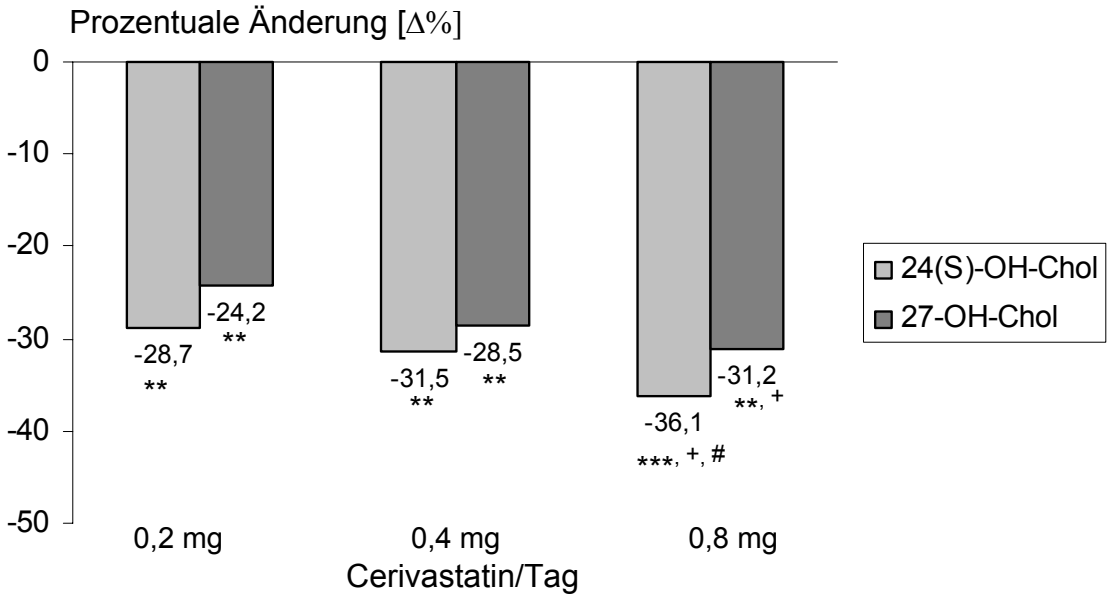


Abbildung 7 Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen zum Ausgangswert von 24S-Hydroxycholesterin (24S-OH-Chol) und 27-Hydroxycholesterin (27-OH-Chol) im Serum nach steigender Cerivastatindosierung (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert. $^{+}$ $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Gabe von 0,2 mg Cerivastatin/Tag. $^{\#}$ $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zur Gabe von 0,4 mg Cerivastatin/Tag

3.1.4 Ratios der Cholesterinmetabolite zu Cholesterin

Die verschiedenen Dosierungen zeigten im Vergleich der Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen der Ratios 24S-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin zu Cholesterin weder zum Ausgangswert noch untereinander signifikante Unterschiede (Abbildung 8).

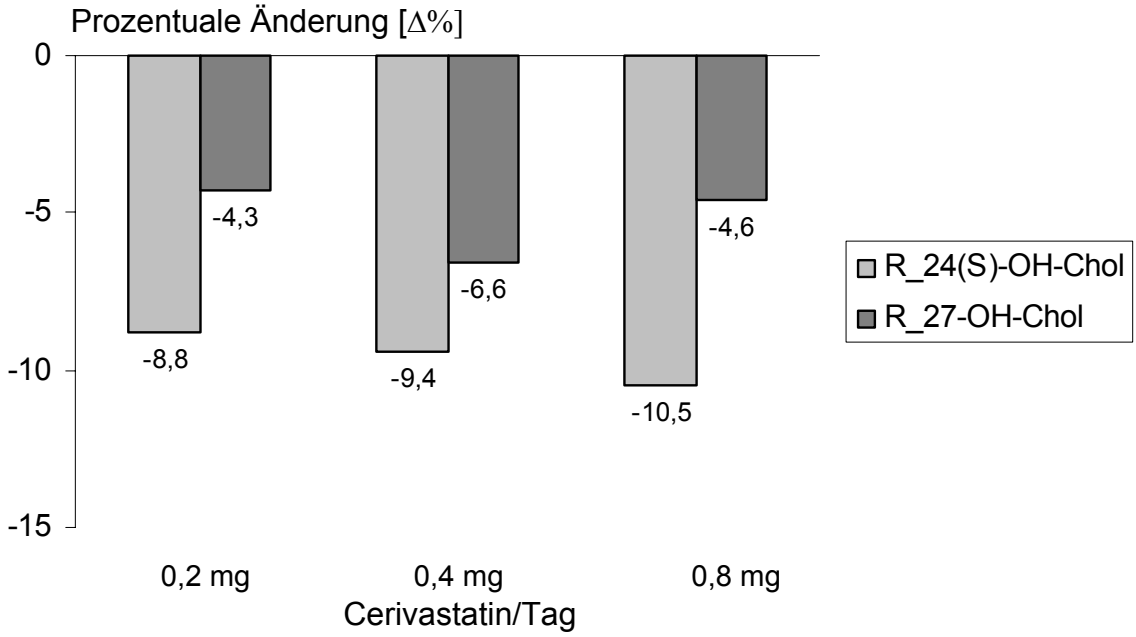


Abbildung 8 Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen zum Ausgangswert der Ratios von 24S-Hydroxycholesterin (R_24S-OH-Chol) und 27-Hydroxycholesterin (R_27-OH-Chol) zu Cholesterin im Serum nach steigender Cerivastatindosierung (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag).

3.1.5 Serumkonzentrationen der pflanzlichen Sterine Campesterin und Sitosterin

Die verschiedenen Dosierungen zeigten im Vergleich der Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen von Campesterin und Sitosterin weder zum Ausgangswert noch untereinander signifikante Unterschiede (Abbildung 9).

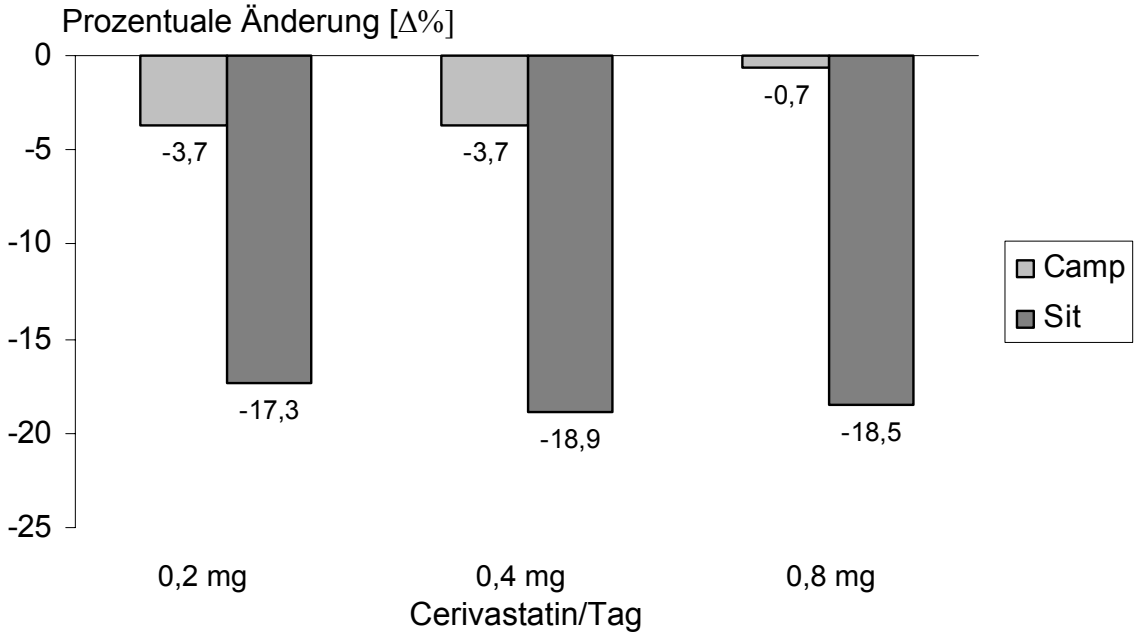


Abbildung 9 Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen zum Ausgangswert von Campesterin (Camp) und Sitosterin (Sit) im Serum nach steigender Cerivastatindosierung (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag).

3.1.6 Ratios der pflanzlichen Sterine zu Cholesterin

Die Mittelwerte der individuellen prozentualen Unterschiede der Ratio von Campesterin zu Cholesterin waren im Vergleich zum Ausgangswert nach Behandlung mit 0,4 mg Cerivastatin/Tag um 26,5% ($p < 0,021$) und mit 0,8 mg Cerivastatin/Tag um 38,6% ($p < 0,024$) jeweils signifikant höher (Abbildung 10). Dies ist aber nicht von Bedeutung, da sich dieses Ergebnis nur daraus ergibt, dass sich die absoluten Campesterinkonzentrationen nicht ändern, sondern die entsprechenden Cholesterinwerte gesenkt werden. Dies gibt dann rein mathematisch einen Anstieg der Ratios zwischen Campesterin und Cholesterin.

Die verschiedenen Dosierungen zeigten im Vergleich der Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen der Ratio Sitosterin zu Cholesterin weder zum Ausgangswert noch untereinander signifikante Unterschiede (Abbildung 10).

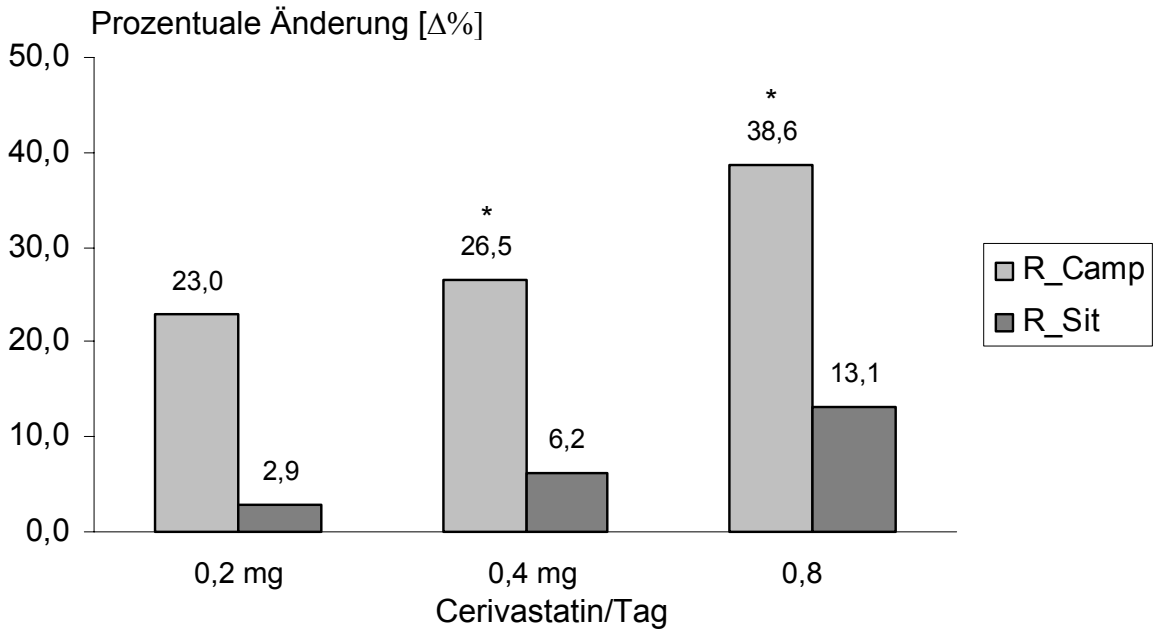


Abbildung 10 Mittelwerte der individuellen prozentualen Änderungen zum Ausgangswert der Ratios von Campesterin (R_Camp) und Sitosterin (R_Sit) zu Cholesterin im Serum nach steigender Cerivastatindosierung (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag). * $p < 0,05$ signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert.

3.2 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin im Verlauf der Untersuchung – tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

3.2.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter sowie deren Ratio zu Cholesterin

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte ± SD von Cholesterin, seinen Vorstufen, seinen Metaboliten sowie den pflanzlichen Sterolen und deren Ratios zu Cholesterin aufgeführt.

Tabelle 3 Serumkonzentrationen (Mittelwert ± SD) von Cholesterin, seinen Vorstufen Lathosterin, Lanosterin, Desmosterin, seinen Metaboliten 24S-Hydroxycholesterin (24S-OH-Chol und 27-Hydroxycholesterin (27-OH-Chol), sowie den pflanzlichen Sterolen Campesterin und Sitosterin, und deren Ratios zu Cholesterin (R_Sterin) vor (Ausgangswert) und während ansteigender Cerivastatindosierungen (0,2 mg/Tag, 0,4 mg/Tag und 0,8 mg/Tag) bei normocholesterinämischen Probanden (n=6)

		Ausgangswert	0,2 mg/Tag	0,4 mg/Tag	0,8 mg/Tag
Cholesterin	mg/dl	209 ± 24[c]	171 ± 21[b]	168 ± 24[c]	161 ± 21[c,d]
Lathosterin	mg/dl	0,25 ± 0,11	0,13 ± 0,04[a]	0,10 ± 0,03[b]	0,10 ± 0,03[b]
Lanosterin	µg/dl	23,9 ± 3,2	19,8 ± 1,2[a]	18,6 ± 0,8[a]	18,4 ± 0,6[a]
Desmosterin	mg/dl	0,28 ± 0,04	0,23 ± 0,02[b]	0,21 ± 0,02[b,e]	0,20 ± 0,02[b,d]
24S-OH-Chol	ng/ml	102 ± 21	73 ± 18[c]	70 ± 18[c]	65 ± 17[c,d,f]
27-OH-Chol	ng/ml	142 ± 38	108 ± 30[b]	101 ± 23[b]	97 ± 27[b,d]
Campesterin	mg/dl	0,35 ± 0,17	0,34 ± 0,15	0,33 ± 0,14	0,33 ± 0,11
Sitosterin	mg/dl	0,21 ± 0,13	0,17 ± 0,10	0,17 ± 0,10	0,16 ± 0,09
R_Lathosterin	µg/mg	1,18 ± 0,53	0,77 ± 0,18	0,60 ± 0,14[a,d]	0,66 ± 0,16[a]
R_Lanosterin	µg/mg	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,07	0,12 ± 0,02
R_Desmosterin	µg/mg	1,30 ± 0,29	1,37 ± 0,24	1,27 ± 0,17	1,32 ± 0,16
R_24S-OH-Chol	ng/mg	47 ± 10	43 ± 12	43 ± 12	42 ± 10
R_27-OH-Chol	ng/mg	65 ± 11	62 ± 12	61 ± 14	62 ± 14
R_Campesterin	µg/mg	1,54 ± 0,46	1,95 ± 0,83	2,00 ± 0,78[a]	2,14 ± 0,74[a]
R_Sitosterin	µg/mg	0,90 ± 0,40	0,96 ± 0,50	1,00 ± 0,57	1,02 ± 0,49

[a] $P<0,05$, [b] $P<0,01$, [c] $P<0,001$ signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert
[d] $P<0,05$, [e] $P<0,01$ signifikant unterschiedlich zu 0,2 mg Cerivastatin/Tag
[f] $P<0,05$, signifikant unterschiedlich zu 0,4 mg Cerivastatin/Tag

3.2.2 Korrelationsbetrachtungen der einzelnen Parameter

Tabelle 4 Bivariate Korrelationen nach Pearson und deren Signifikanzniveaus für Cholesterin (CHGC), Lathosterin (Latho), Lanosterin (Lano), Desmo (Desmosterin), 24S-Hydroxycholesterin (24S-OH), 27-Hydroxycholesterin (27-OH), Campesterin (Camp) und Sitosterin (Sit)

	Latho	Lano	Desmo	24S-OH	27-OH	Camp	Sit
CHGC	0,579[a] 0,003[b]	0,642 0,001	0,493 0,014	0,654 0,001	0,825 0,000	0,482 0,017	0,682 0,000
Latho		0,922 <0,001	0,706 <0,001	0,345 0,099	0,396 0,056	0,107 0,619	0,200 0,349
Lano			0,684 <0,001	0,516 0,010	0,517 0,010	0,174 0,416	0,304 0,149
Desmo				0,551 0,005	0,429 0,037	-,214 0,314	-0,029 0,893
24S-OH					0,890 <0,001	0,330 0,116	0,365 0,114
27-OH						0,548 0,006	0,790 <0,001
Camp							0,908 <0,001

[a] Korrelation nach Pearson
[b] Signifikanz (2-seitig)

4. DISKUSSION

Statine haben eine Vielzahl bekannter und möglicherweise auch unbekannter Effekte auf bekannte und unbekannte, wichtige und weniger wichtige Marker des vaskulären Risikos. Das LDL-Cholesterin ist nach den Ergebnissen vorliegender Interventionsstudien zu verschiedenen cholesterinsenkenden Therapien weder ein valider Surrogatmarker für kardiovaskuläre Ereignisse noch für die Gesamtsterblichkeit (D'Agostino, 2000). Um den Nutzen einer Statintherapie in Bezug auf patientenrelevante Endpunkte zu überprüfen, sind daher für alle Substanzen entsprechende Langzeitstudien notwendig, die genau diese Endpunkte und die unerwünschten Arzneimittelwirkungen prüfen und nicht alleine nur Surrogatmarker wie z.B. das LDL-Cholesterin, das HDL-Cholesterin, das C-reaktive Protein, Effekte auf Parameter der Blutgerinnung oder andere.

Verschiedene Statine senken dosisabhängig den Gesamtcholesteringehalt zwischen 17-35% (Edwards und Moore, 2003). Die Ergebnisse unserer Untersuchung bestätigten vorherige Beobachtungen, dass die tägliche Einnahme von Cerivastatin in unterschiedlichen Dosierungen zwischen 0,2 - 0,8 mg/Tag die Plasmakonzentrationen des Gesamtcholesterins senkt. Die Behandlung mit 0,4 mg Cerivastatin führt zu vergleichbaren Ergebnissen wie die mit 40 mg Pravastatin (Edwards und Moore, 2003). Somit war zunächst einmal ein Medikament gefunden, welches in hundertfach niedrigerer Dosierung einen äquivalenten Effekt zeigte.

Aus einer Metaanalyse von 2.316 Patienten, die unterschiedliche Dosierungen (feste oder titrierte) an Cerivastatin erhielten, ergibt sich eine mittlere gewichtete Reduktion von der Ausgangskonzentration (266 mg/dl) von 62 mg/dl und somit um 22% (Edwards und Moore, 2003). In unserer Untersuchung lag der Ausgangswert bei 210 mg/dl. Unter einer titrierten Dosierung beginnend mit 0,2 mg/Tag über 0,4 mg/Tag bis zu 0,8 mg/Tag konnte eine mittlere Reduktion um 17.8% über 19.4% bis zu 22.6% erzielt werden. Dies korrelierte sehr gut mit den Ergebnissen o.g. Metaanalyse.

Die Beurteilung von Absolutwerten von Surrogatmarkern in Serumproben ist problematisch. Neben der Hemmung der endogenen Cholesterinsynthese steigern Statine die LDL-Rezeptoraktivität (Brown und Goldstein, 1981; Schachter, 2005). Dies hat zur Folge, dass alle LDL-gebundenen Sterine - somit auch die steroidalen Cholesterinvorstufen wie Lathosterin, Desmosterin und Lanosterin, die Abbauprodukte 24S- und 27-Hydroxycholesterin als auch die pflanzlichen Sterine, Campesterin und Sitosterin - dem Serum entzogen werden. Alle o.g. Sterine wiesen in der Analyse unserer Zielparameter signifikante Korrelationen mit Cholesterin auf. Ferner korrelierten jeweils die Vorstufen, die Metabolite 24S- und 27-

Hydroxycholesterin als auch die pflanzlichen Sterine untereinander. Bisher scheint es daher am wahrscheinlichsten, dass die positiven Korrelationen zwischen den Sterinvorstufen, den Oxisterinen und den pflanzlichen Sterinen mit dem Gesamtcholesterin in Serum und Plasma durch den gemeinsamen Transport mittels Lipoproteinen erklärt werden können (Babiker und Diczfalusy, 1998). Aus diesem Grunde müssen zur Beurteilung von Änderungen dieser Art von Surrogatmarkern im Serum oder Plasma die Absolutkonzentrationen für die Änderungen im Cholesterin korrigiert werden. Dies geschieht durch die Bildung der Ratio des entsprechenden Sterins zu Cholesterin.

Lathosterin und der Quotient Lathosterin zu Cholesterin korrelieren signifikant mit der hepatischen HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (Björkhem et al., 1987). Da die Leber beim Menschen den größten Beitrag zur Cholesterinsynthese leistet, kann für gewisse Untersuchungen die Ratio Lathosterin zu Cholesterin vereinfachend als Marker der Gesamtkörpercholesterinsynthese eingesetzt werden (Kempen et al., 1988; Sudhop et al., 2002). Interessanterweise folgten in unserer Untersuchung die Änderungen in den übrigen Cholesterinvorstufen Lanosterin und Desmosterin nicht so deutlich denen des Lathosterins. Die Cholesterinbiosynthese kann über zwei, sich überschneidende Wege ablaufen, den Kandutsch-Russell- oder den Bloch-Stoffwechselweg (Lütjohann et al., 2002). Die Auswahl des Stoffwechselweges wird durch die Stufe bestimmt, auf welcher die Doppelbindung an der Position des Kohlenstoffatomes „C-24“ (siehe Abbildungen 1 und 2 - Einleitung) in der Sterinseitenkette reduziert wird. Wenn diese Doppelbindung bis zum letzten Reaktionsschritt aufrechterhalten wird, geht die Synthese hauptsächlich über Desmosterin (Bloch-Stoffwechselweg), wohingegen die frühe Reduktion primär zur Bildung von Lathosterin und 7-Dehydrocholesterin führt (Kandutsch-Russell-Stoffwechselweg). Die biologische Bedeutung dieser Komplexität ist noch unklar. In der Peripherie und im Leberstoffwechsel spielt Lathosterin wohl eine bedeutendere Rolle als das Lanosterin und Desmosterin, während im noch reifenden ZNS die Cholesterinsynthese zunächst über Desmosterin begünstigt wird, sich aber im adulten Zustand in Richtung Lathosterin und somit Kandutsch-Russell-Stoffwechselweg verschiebt (Lütjohann et al., 2002; Vainio et al., 2006). Somit zeigte sich im Lathosterin eine deutlich höhere signifikante Senkung im Vergleich zu den beiden anderen Vorstufen Lanosterin und Desmosterin. Daraus ergab sich für die Ratio zu Cholesterin eine signifikante Änderung für Lathosterin, während die Ratios Lanosterin und Desmosterin zu Cholesterin geringfügig, aber nicht signifikant anstiegen. Für weitere Untersuchungen von Serumparametern lässt sich hieraus schliessen, dass allein die Beurteilung der Änderungen

der Ratio Lathosterin zu Cholesterin hinreichend über Änderungen der Cholesterinbiosynthese Auskunft gibt.

Pflanzliche Sterine wie Campesterin und Sitosterin im menschlichen Körper stammen ausschliesslich aus der Nahrung und können weder endogen synthetisiert noch in Gallensäuren umgewandelt werden. Sie werden somit auch unverändert als Campesterin und Sitosterin wieder biliär ausgeschieden (Sudhop et al., 2005; von Bergmann et al., 2005). Während die prozentuale Resorptionsrate für Cholesterin zwischen 30-70% variiert (MW ca. 50%), liegt die Resorptionsrate für Campesterin bei ca. 15% und für Sitosterin bei bis zu 5%.

Die Aufnahme und Abgabe pflanzlicher Sterine wird über den ABCG5/G8-Tandemtransporter reguliert (Lee et al., 2001). Die Ratio von Campesterin zu Cholesterin im Serum gilt als Surrogatmarker der intestinalen Cholesterinresorptionsrate (Miettinen et al., 1990; Sudhop et al., 2002). In der hier vorliegenden Untersuchung wurden ebenfalls die Änderungen der Konzentrationen pflanzlicher Sterole über die verschiedenen Therapiezeiträume verglichen. Während die absoluten Phytosterinkonzentrationen sich im Verlauf der Dosissteigerung nicht signifikant änderten, nahm die Ratio von Campesterin zu Cholesterin nach einer Gabe von 0,4 und 0,8 mg Cerivastatin/Tag signifikant zu. Dies ist jedoch rein mathematisch zu erklären, da die Abnahme von Campesterin über die verschiedenen Zeiträume wesentlich weniger ausgeprägt erschien als die des Cholesterins und sich somit bei der Bildung der Ratio eine positive Änderung (Anstieg) berechnen liess. Während bei pharmakologisch induzierter Hemmung der intestinalen Cholesterinresorption eine deutliche initiale Steigerung der endogenen Cholesterinsynthese in der Leber nachgewiesen wird (Sudhop et al., 2002), erscheint es bisher nicht eindeutig nachgewiesen, dass die verminderte Cholesterinsynthese nach Gabe von Statinen eine Erhöhung der intestinalen Resorption von Cholesterin zur Folge hat. Bisher konnte nur nach Gabe von Atorvastatin ein Anstieg in der Absolutkonzentration pflanzlicher Sterine gezeigt werden (Miettinen und Gylling, 2003; Paiva et al., 2005). Cerivastatin zeigte dies in der hier beschriebenen Untersuchung jedenfalls nicht. Die Unterschiede in den Mittelwerten der prozentualen Änderungen von Campesterin und Sitosterin sind statistisch signifikant, obwohl die Standardabweichungen sehr hoch sind. Dies wurde bisher noch bei keinem der analysierten Statine gesehen (Paiva et al., 2005; Thelen et al., 2006). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine unterschiedliche Kompartimentierung von Campesterin und Sitosterin bezüglich ihres Transportes in Lipoproteinen sein. Hiernach müsste Sitosterin zu ähnlicheren Anteilen im LDL vorhanden sein wie Cholesterin, während dies für Campesterin nicht gilt. Aufgrund der individuell verschiedenen Änderungen in den Serumkonzentrationen für

Campesterin und Sitosterin bei unseren 6 Probanden ist dies jedoch äusserst schwierig zu beurteilen und muss an grösseren Kollektiven kontrolliert werden.

Bei 12 Männern und 6 Frauen im Alter von durchschnittlich 50 Jahren mit primärer Hypercholesterinämie, die über 6 Monate 80 mg Simvastatin täglich erhielten, konnte erstmals gezeigt werden, dass Simvastatin offensichtlich den Cholesterinmetabolismus im zentralen Nervensystem beeinflusst (Locatelli et al., 2002). Der Gehalt an 24S-Hydroxycholesterin im Plasma, welches beim Menschen ausschliesslich in Neuronen synthetisiert und über die Blut-Hirnschranke in die Peripherie transportiert wird, wird schon nach 6 Wochen deutlich reduziert (Locatelli et al., 2002). Eine zusätzliche prozentuale Senkung des Gehaltes an 24S-Hydroxycholesterin nach 6 bis 24 Wochen geschieht unabhängig von der Reduktion im Gesamplasmacholesterin. Dies weist auf unterschiedliche Wirkungsorte hin und lässt auf einen Effekt des Simvastatins auf den Cholesterinmetabolismus im Gehirn schliessen. Die Hemmung der Cholesterinbiosynthese wurde auch in dieser Studie durch die Senkung der Ratio von Lathosterin zu Cholesterin, einem Indikator der hepatischen und Gesamtcholesterinsynthese (Björkhem et al., 1987; Kempen et al., 1988) nachgewiesen. In unserer Untersuchung zeigte sich bezüglich der Änderungen im absoluten Serumgehalt von 24S-Hydroxycholesterin eine dosisabhängige signifikante Senkung. Dies konnte ebenso für die Änderungen im Gehalt an 27-Hydroxycholesterin bestätigt werden, jedoch nicht für die Änderungen in der Konzentration an Lathosterin, wo schon nach der Therapie mit 0,4 mg/Tag Cerivastatin die maximale Synthesehemmung erzielt wurde.

Eine positive Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von 24S-Hydroxycholesterin und dem Gesamtcholesterin konnte bisher in wenigen Untersuchungen gefunden werden (Björkhem et al., 1998; Bretillon et al., 2000a; Locatelli et al., 2002). Diese Korrelation wird unter anderem durch einen geringen Cholesterinfluss von der Peripherie ins ZNS erklärt, der durch die Umwandlung des aus dem Blutkreislauf stammenden Cholesterins in 24S-Hydroxycholesterin und dessen Ausscheidung über die Blut-Hirn-Schranke kompensiert wird. Dieser Prozeß könnte das Gehirn vor einer von den Cholesterinplasmakonzentrationen abhängigen Cholesterinüberladung schützen (Björkhem et al., 1998). Ob solch ein Cholesterintransfer von der Peripherie ins ZNS stattfinden kann, ist jedoch bisher sehr fraglich (Danik et al., 1999). Auch die positive Korrelation zwischen 27-Hydroxycholesterin und Cholesterin wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Babiker et al., 1999; Harik-Khan und Holmes, 1990). Analog zu den Befunden aus o.g. Untersuchung zum Cholesterinmetabolismus nach Gabe von 80 mg Simvastatin über 6 Monate (Locatelli et al.,

2002) konnten wir für die absoluten Serumkonzentrationen an 24S-Hydroxycholesterin dosisabhängige Abnahmen erkennen, jedoch waren die Änderungen der Ratio 24S-Hydroxycholesterin zu Cholesterin nicht signifikant, obwohl auch dort die Abnahmen deutlich dosisabhängig waren. Analog zum 24S-Hydroxycholesterin wurden auch die Konzentrationen an 27-Hydroxycholesterin, wenn auch geringfügiger, dosisabhängig und signifikant gesenkt. Die Senkung der Ratio von 27-Hydroxycholesterin zu Cholesterin hatte jedoch schon nach 0.4 mg Cerivastatin täglich ihr Maximum erreicht.

Da beide Oxysterine zu gleichen Anteilen in LDL-Partikeln transportiert werden (Babiker und Diczfalusy, 1998), ist die stärkere Senkung des 24S-Hydroxycholesterins unter Cerivastatin nicht nur auf die ausgeprägtere Senkung des Gesamtcholesterins, dem Subtrat für Oxysterine, zurückzuführen. Sollte 24S-Hydroxycholesterin im Gehirn vor allem aus peripherem über die Blut-Hirn-Schranke transportiertem Cholesterin entstehen (Björkhem et al., 1997; Lütjohann et al., 1996), dann könnte eine durch Statine gesenkte Cholesterin-Serumkonzentration eine verminderte 24S-Hydroxilierung im Gehirn bewirken. Allerdings passieren Lipoproteine und freies Cholesterin kaum die Blut-Hirn-Schranke (Danik et al., 1999). Das Gehirn weist einen eigenen, vom peripheren Kreislauf unabhängigen Cholesterinstoffwechsel auf (Danik et al., 1999). Es kann daher vermutet werden, dass das lipophile Cerivastatin nach Passage der Blut-Hirn-Schranke eine Hemmung der zerebralen Cholesterin- und/oder 24S-Hydroxycholesterinsynthese bewirkt. Eine direkte Hemmung der 24S-Hydroxylase durch Statine insbesondere durch Cerivastatin ist bisher nicht untersucht und kann daher auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. In Tierexperimenten wird gezeigt, dass Simvastatin in sehr hoher Dosierung sowohl beim Meerschweinchen als auch bei Mäusen die *de novo* Cholesterinsynthese im Gehirn vermindert, während der Gesamtcholesteringehalt im ZNS nicht davon beeinflusst wird (Fassbender et al., 2001; Lütjohann et al., 2004; Thelen et al., 2005).

Während der dosissteigernden Therapie korrelierten die Senkungen von 24S- und 27-Hydroxycholesterin signifikant miteinander. Nur die Änderungen von 27-Hydroxycholesterin korrelierten mit den prozentualen Gesamtcholesterinsenkungen. Das Fehlen einer Korrelation zwischen den Änderungen von 24S-Hydroxycholesterin und Cholesterin sowie die ausgeprägtere Senkung von 24S-Hydroxycholesterin im Vergleich zum Gesamtcholesterin könnte auch für dieses lipophile Statin auf einen teilweise unterschiedlichen Wirkungsort von Cerivastatin auf die Cholesterin- und/oder 24S-Hydroxycholesterinsynthese schliessen lassen. Dies war bisher der erste Befund, der auf einen möglichen Einfluss von Cerivastatin auf den Cholesterinmetabolismus im Gehirn hindeutet. Die fehlende Signifikanz zu den gezeigten

Änderungen in der Ratio 24S-Hydroxycholesterin zu Cholesterin kann durchaus in der geringen Anzahl der Teilnehmer (n=6) begründet sein. Da schwerwiegende Nebenwirkungen bei Cerivastatin zur Marktrücknahme geführt haben, werden weitere Untersuchungen beim Menschen aus ethischen Gründen wohl nicht mehr durchgeführt werden können. Insofern stellt diese retrospektive Untersuchung vorläufig eine Art letzte Möglichkeit zur Analyse des Wirkprofils von Cerivastatin auf den Hirn-Cholesterinmetabolismus beim Menschen dar. Es wäre jedoch nun von grossem Interesse, diesen bisher einmaligen Befund im Tiermodell weiter zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Cerivastatin, einem lipophilen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktasehemmer, in aufsteigenden Dosierungen über jeweils 6 Wochen auf endogene Serummarker des Cholesterinmetabolismus, insbesondere auf einen Surrogatmarker des zerebralen Cholesterinstoffwechsels, das 24S-Hydroxycholesterin, untersucht.

Nüchternblutproben wurden unmittelbar vor Studienbeginn als Basismessung sowie im Studienverlauf nach 6, 12 und 18 Wochen zur Analyse entnommen. Neben den gaschromatographischen Plasmakonzentrationen an Gesamtcholesterin wurden die Konzentrationen der Cholesterinvorstufen, der Abbauprodukte, sowie der pflanzlichen Sterine mittels hochsensitiver und -selektiver Gaschromatographie-Massenspektrometrie bestimmt. Die Analysen erfolgten retrospektiv aus Plasmaproben von 6 normocholesterinämischen Probanden im Alter zwischen 24 und 48 Jahren.

Neben einer deutlichen Senkung des Gesamtcholesterins wurden über die unterschiedlichen Therpieintervalle auch die absoluten Plasmakonzentrationen der Cholesterinvorstufen Lathosterin, Desmosterin und Lanosterin, des hirnspezifischen Metaboliten 24S-Hydroxycholesterin und des ubiquitären Metaboliten 27-Hydroxycholesterin gesenkt. Die signifikante und dosisrelevante Senkung der Ratio Lathosterin zu Cholesterin weist auf eine deutliche Hemmung der endogenen Cholesterinbiosynthese im Gesamtorganismus hin. Die Ratio Campesterin zu Cholesterin ist ein anerkannter Serummarker für die Cholesterinresorptionsrate. In diesem Falle geht jedoch der Anstieg der Ratio von Campesterin zu Cholesterin nicht mit einer höheren Aufnahme von Nahrungscholesterin einher, sondern stellt nur ein rein mathematisches Ergebnis dar.

Die Ratio von 24S-Hydroxycholesterin wurde im Gegensatz zur Ratio 27-Hydroxycholesterin zu Cholesterin zwar dosisabhängig erniedrigt; dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Trotzdem lässt dieses Ergebnis vermuten, dass Cerivastatin in der hier verwendeten Personengruppe über den gewählten Therapiezeitraum einen Einfluss auf die Cholesterinsynthese im Gehirn aber nicht auf den Abbau in der Peripherie hat.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. J Biol Chem 1989; 264:8222-8229

Babiker A, Andersson O, Lindblom D, van der Linden J, Wiklund B, Lütjohann D, Diczfalusy U, Björkhem I. Elimination of cholesterol as cholestenoic acid in human lung by sterol 27-hydroxylase: evidence that most of this steroid in the circulation is of pulmonary origin. J Lipid Res 1999; 40:1417-1425

Babiker A, Diczfalusy U. Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. Biochim Biophys Acta 1998; 1392:333-339

Balk EM, Lau J, Goudas LC, Jordan HS, Kupelnick B, Kim LU, Karas RH. Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review. Ann Intern Med 2003; 139:670-682

Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, März W, Reckless JP, Stein EA. Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. Arch Intern Med 2003; 163:553-564

Berge KE, von Bergmann K, Lütjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. J Lipid Res 2002; 43:486-494

Björkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24S-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O2 techniques in vivo and in vitro. J Biol Chem 1997; 272:30178-30184

Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. J Lipid Res 1998; 39:1594-1600

Björkhem I, Miettinen T, Reihner E, Ewerth S, Angelin B, Einarsson K. Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver. J Lipid Res 1987; 28:1137-1143

Björkhem I, Starck L, Andersson U, Lütjohann D, von Bahr S, Pikuleva I, Babiker A, Diczfalusy U. Oxysterols in the circulation of patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome: abnormal levels of 24S- and 27-hydroxycholesterol. J Lipid Res 2001; 42:366-371

Bloch K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. Steroids 1992; 57:378-383

Bretillon L, Lütjohann D, Stahle L, Widhe T, Bindl L, Eggertsen G, Diczfalusy U, Björkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. J Lipid Res 2000a; 41:840-845

Bretillon L, Sidén A, Wahlund LO, Lütjohann D, Minthon L, Crisby M, Hillert J, Groth CG, Diczfalusy U, Björkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. Neurosci Lett 2000b; 293:87-90

Brewer HB, Jr. New features of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III lipid-lowering guidelines. Clin Cardiol 2003; 26:III19-24

Brown MS, Goldstein JL. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. N Engl J Med 1981; 305:515-517

Cali JJ, Russell DW. Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. J Biol Chem 1991; 266:7774-7778

D'Agostino RB. Debate: The slippery slope of surrogate outcomes. Curr Control Trials Cardiovasc med 2000; 1:76-78

Danik M, Champagne D, Petit-Turcotte C, Beffert U, Poirier J. Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. Crit Rev Neurobiol 1999; 13:357-407

Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. Circulation 2004; 109:III39-43

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004; 109:III27-32

de Chaves EI, Rusinol AE, Vance DE, Campenot RB, Vance JE. Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. J Biol Chem 1997; 272:30766-30773

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol 2001; 12:105-112

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. J Lipid Res 2004; 45:1375-1397

Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. Anal Biochem 1995; 225:73-80

Edwards JE, Moore RA. Statins in hypercholesterolaemia: a dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomised, double blind trials. BMC Fam Pract 2003; 4:18-37

Endo A. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors. Methods Enzymol 1981; 72:684-689

Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lütjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:5856-5861

Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, Ragoschke A, Kuehl S, Walter S, Walter J, Brechtel K, Muehlhauser F, Von Bergmann K, Lütjohann D. Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. Neurology 2002; 59:1257-1258

Fieser LF, Fieser M. Steroide. Weinheim: Verlag Chemie, 1961

Grundy SM. The role of cholesterol management in coronary disease risk reduction in elderly patients. Endocrinol Metab Clin North Am 1998; 27:655-675

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Jr., Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Jr., Stone NJ. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. J Am Coll Cardiol 2004; 44:720-732

Gupta S. Statin face-off. Surprises from the first head-to-head comparison. Time 2003; 162:83

Harik-Khan R, Holmes RP. Estimation of 26-hydroxycholesterol in serum by high-performance liquid chromatography and its measurement in patients with atherosclerosis. J Steroid Biochem 1990; 36:351-355

Holdenrieder S, Lütjohann D, Geiger S, Von Bergmann K, Stieber P, Hamann GF. Does brain specific 24S-hydroxycholesterol in plasma indicate the disruption of the blood-brain barrier in patients with ischemic stroke? Neurosci Lett 2004; 368:201-204

Hübschmann HJ. Auswertung von GC-MS Analysen. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1996

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. Lancet 2000; 356:1627-1631

Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). Am J Cardiol 1998; 81:582-587

Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. Ann Intern Med 1971; 74:1-12

Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. J Lipid Res 1988; 29:1149-1155

Kölsch H, Heun R, Kerksiek A, Bergmann Kv K, Maier W, Lütjohann D. Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. Neurosci Lett 2004; 368:303-308

Kölsch H, Lütjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptok U, Jessen F, von Bergmann K, Rao ML, Maier W, Heun R. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. Mol Psychiatry 2002; 7:899-902

Kölsch H, Lütjohann D, von Bergmann K, Heun R. The role of 24S-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. J Nutr Health Aging 2003; 7:37-41

Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. BMJ 2003; 326:1407-1408

Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M, Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. Nat Genet 2001; 27:79-83

Lee SJ, Sacks FM. Effect of pravastatin on intermediate-density and low-density lipoproteins containing apolipoprotein CIII in patients with diabetes mellitus. Am J Cardiol 2003; 92:121-124

Locatelli S, Lütjohann D, Schmidt HH, Otto C, Beisiegel U, von Bergmann K. Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia: evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. Arch Neurol 2002; 59:213-216

Lütjohann D, Björkhem I, Locatelli S, Dame C, Schmolling J, von Bergmann K, Fahnenstich H. Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24S-hydroxycholesterol. Acta Paediatr 2001; 90:652-657

Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, Björkhem I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:9799-9804

Lütjohann D, Brzezinka A, Barth E, Abramowski D, Staufenbiel M, von Bergmann K, Beyreuther K, Multhaup G, Bayer TA. Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. J Lipid Res 2002; 43:1078-1085

Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. J Lipid Res 2000; 41:195-198

Lütjohann D, Stroick M, Bertsch T, Kuhl S, Lindenthal B, Thelen K, Andersson U, Björkhem I, Bergmann Kv K, Fassbender K. High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. Steroids 2004; 69:431-438

Lütjohann D, von Bergmann K. 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism. Pharmacopsychiatry 2003; 36 Suppl 2:S102-106

Miettinen TA, Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. Eur J Clin Invest 2003; 33:976-982

Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. Am J Epidemiol 1990; 131:20-31

Paiva H, Thelen KM, Van Coster R, Smet J, De Paepe B, Mattila KM, Laakso J, Lehtimaki T, von Bergmann K, Lütjohann D, Laaksonen R. High-dose statins and skeletal muscle metabolism in humans: a randomized, controlled trial. Clin Pharmacol Ther 2005; 78:60-68

Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptok U, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. J Psychiatr Res 2002; 36:27-32

Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. Neuroreport 2000; 11:1959-1962

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. Biochim Biophys Acta 1987; 917:148-161

Princen HMG, Post SM, Twisk J. Regulation of bile acid synthesis. Curr Pharm Design 1997; 3:59-84

Puccetti L, Pasqui AL, Auteri A, Bruni F. Mechanisms for antiplatelet action of statins. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 2005; 5:121-126

Reihner E, Rudling M, Stahlberg D, Berglund L, Ewerth S, Björkhem I, Einarsson K, Angelin B. Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol. N Engl J Med 1990; 323:224-228

Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. Arch Neurol 2002; 59:223-227

Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. Biochim Biophys Acta 2000; 1529:126-135

Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. Fundam Clin Pharmacol 2005; 19:117-125

Schönknecht P, Lütjohann D, Pantel J, Bardenheuer H, Hartmann T, von Bergmann K, Beyreuther K, Schroder J. Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. Neurosci Lett 2002; 324:83-85

Serajuddin AT, Ranadive SA, Mahoney EM. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. J Pharm Sci 1991; 80:830-834

Simons M, Schwarzler F, Lütjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. Ann Neurol 2002; 52:346-350

SoRelle R. Baycol withdrawn from market. Circulation 2001; 104:E9015-9016

Sudhop T, Lütjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S, Perevozskaya I, von Bergmann K. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. Circulation 2002; 106:1943-1948

Sudhop T, Lütjohann D, von Bergmann K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. Pharmacol Ther 2005; 105:333-341

Thelen KM, Lütjohann D, Vesalainen R, Janatuinen T, Knuuti J, Von Bergmann K, Lehtimäki T, Laaksonen R. Effect of pravastatin on plasma sterols and oxysterols in men. Eur J Clin Pharmacol 2006; 62:9-14

Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U, von Eckardstein A, Björkhem I, Lütjohann D. Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. J Pharmacol Exp Ther 2005; 316:1146-1152

Tsuji A, Saheki A, Tamai I, Terasaki T. Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 1993; 267:1085-1090

Vainio S, Jansen M, Koivusalo M, Rog T, Karttunen M, Vattulainen I, Ikonen E. Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. J Biol Chem 2006; 281:348-355

von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. Am J Cardiol 2005; 96:10D-14D

Wikvall K. Hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria catalyzing 26-hydroxylation of C27-steroids. J Biol Chem 1984; 259:3800-3804

Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methyglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Arch Neurol 2000; 57:1439-1443

Yu L, von Bergmann K, Lütjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. J Lipid Res 2004; 45:301-307

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Privat-Dozent Dr. rer. nat. Dr. med. sci. Dieter Lütjohann für die Überlassung des Themas, für seine immer freundliche Anleitung und Hilfe und sein unermüdliches Engagement.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schneider, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie, Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Marburg (Dir.: Prof. Dr. med. B. Maisch), danke ich für die Überlassung der Sera und der Basisdaten der Studienteilnehmer, insbesondere auch Herrn Drs. med. A. Sattler und M. Soufi für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. R. Fimmers, Institut. für Medizinische Biometrie, Informatik u. Epidemiologie des Universitätsklinikums Bonn, danke ich für die freundliche Beratung zur statistischen Auswertung der Daten.

Danken möchte ich auch Frau Anja Kerksiek und Frau Silvia Friedrichs für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Analysen.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Ehefrau und meinen Kindern, die in dieser Zeit viel Geduld aufbringen mussten.