

Aus dem Bereich für Innere Medizin III –
Klinische und Experimentelle Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar
Professor Dr. med. Ulrich Laufs

**QUANTIFIKATION PFLANZLICHER STEROLE
UND IHRER OXIDATIONSPRODUKTE
IM PLASMA UND IN SKLEROSIERTEN AORTENKLAPPEN**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

Vorgelegt von:
Alexandra Maria Luister
geb. am 07.11.1987 in Karlsburg

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	6
2. EINLEITUNG	10
2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: Prävalenz und Definition.....	10
2.2 Hypercholesterolämie - Medikamentöse Modulation.....	12
2.3 Phytosterole.....	13
2.3.1 Definition und Physiologie.....	13
2.3.2 Functional Food	16
2.3.3 Phytosterole - eine Kontroverse	16
2.4 Oxyphytosterole.....	18
2.5 Fragestellung der Arbeit	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Materialien.....	21
3.1.1 Reagenzien.....	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Studiendesign	22
3.2.2 Probenentnahme und Lagerung.....	23
3.2.3 Probenaufbereitung	24
3.2.4 Beschreibung der Analyseverfahren	26
3.2.5 Durchführung der Analysen	26
3.2.6 Evaluierung einer begleitenden KHK.....	35
3.2.7 Evaluierung des Ausmaßes einer Aortenklappenstenose	35
3.2.8 Statistische Methoden.....	35
4. ERGEBNISSE	36
4.1 Patientencharakteristika	36
4.2 Messparameter und Quotienten.....	37
4.3 Zusammenhang zwischen Phytosterolen und Oxyphytosterolen in Plasma und Klappe	38
4.3.1 Zusammenhang der Phytosterole zwischen Plasma und Klappe	39
4.3.2 Zusammenhang der Oxyphytosterole zwischen Plasma und Klappe	40
4.4 Beziehung zwischen Plasmacholesterol und Statinen	42
4.5 Beziehung zwischen koronarer Herzkrankheit und Phytosterolen sowie Oxyphytosterolen.....	43
4.5.1 Phytosterole.....	44
4.5.2 Verhältnisse der Phytosterole zu Lathosterol	45
4.5.3 Verhältnisse der Phytosterole zu Cholesterol.....	48

4.5.4 Oxyphytosterole	49
4.5.5 Verhältnisse der Oxyphytosterole zu Cholesterol	50
4.6 Beziehung zwischen einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen und Phytosterolen sowie Oxyphytosterolen	52
4.6.1 Phytosterole	52
4.6.2 Verhältnisse der Phytosterole zu Lathosterol	53
4.6.3 Verhältnisse der Phytosterole zu Cholesterol	54
4.6.4 Oxyphytosterole	55
4.6.5 Verhältnisse der Oxyphytosterole zu Cholesterol	56
4.7. Verhältnis von Cholestanol zu Cholesterol	58
5. DISKUSSION	59
5.1 Zusammenhang zwischen Phytosterolen und Oxyphytosterolen in Plasma und Klappe	60
5.2 Beziehung zwischen Phytosterolen und kardiovaskulären Erkrankungen	61
5.2.1 Phytosterole	61
5.3 Beziehung zwischen Oxyphytosterolen und kardiovaskulären Erkrankungen	65
5.3.1 Oxyphytosterole	65
5.4 Verhältnis von Cholestanol zu Cholesterol	68
5.5 Limitationen der Studienergebnisse	69
5.6 Potentielle klinische Bedeutung der Befunde und Ausblick	70
6. LITERATURVERZEICHNIS	72
7. PUBLIKATIONEN	81
8. DANKSAGUNG	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
=O	Keto-Gruppe
%	Prozent
Σ	Summe
1M	1-molar
4S-Studie	Scandinavian Simvastatin Survival Study
Abb.	Abbildung
ABCG5/G8	ATP-binding cassette transporter G5/G8
ACAT 2	Acetyl-Coenzym A Acetyltransferase 2
ApoE -/- Maus	ApoE defiziente Mäuse
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP III	Adult Treatment Panel III
BHT	Butylhydroxytoluol
BMI	Body Mass Index
C-24-Atom	Kohlenstoffatom 24
C57BL/6	C57 black 6 - inbred strain of laboratory mouse
CAD	coronary artery disease
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
CVD	cardiovascular disease
Delta P max	maximaler Druckgradient über der Aortenklappe
Delta P mean	mittlerer Druckgradient über der Aortenklappe
EAS	European Atherosclerosis Society
EPIC study	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ESC	European Society of Cardiology
et al.	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum)
eV	Elektrovolt
FA	Familienanamnese
g, kg, mg, ng, pg	Gramm, Kilogramm, Milligramm, Nanogramm, Pikogramm
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion
GC-MS	Gaschromatographie- massenselektive Detektion
HDL	high-density Lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
KHK	Koronare Herzkrankheit
L, dL, mL, µL, nL	Liter, Deziliter, Milliliter, Mikroliter, Nanoliter
ISTD	Interner Standard

LASA study	Longitudinal Aging Study Amsterdam
LDL	low-density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LURIC	Ludwigshafen risk and cardiovascular health study
m, cm, mm, μm , m^3	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Kubikmeter
MeOH	Methanol
mLDL	modified low-density Lipoprotein
min	Minute
min^{-1}	Umdrehungen pro Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol, mmol	Mol, Millimol
MTP	mikrosomales Triglyzerid Transporter Protein
MW	Mittelwert
m/z	charakteristische Massenfragmente
n	Anzahl der Patienten
NaCl	Natriumchlorid
NCEP	National Cholesterol Education Program Expert Panel
NPC1L1	Niemann-Pick-C1-Like-1-Protein
OH	Hydroxy
OPS	Oxyphytosterole
p	zweiseitiges Signifikanzniveau
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
POP	pflanzliche Steroloxidationsprodukte
PROCAM study	Prospective Cardiovascular Münster Study
QG	Quantifizierungsgrenze
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
R^2	Regression
SD	Standardabweichung
SIM	Selected-Ion-Monitoring
TIC	Totalionenchromatogramm
TICE	transintestinale Cholesterol Exkretion
TMSi	Trimethylsilyl
U937	Human leukemic monocyte lymphoma cell line
V	Volt
vs	versus = kontra

1. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund der Studie: An der Pathogenese der Atherosklerose und der Aortenklappenstenose sind inflammatorische, vaskuläre sowie zelluläre Komponenten beteiligt. Neben Cholesterol lassen sich Phytosterole wie Campesterol und Sitosterol in atherosklerotischen Läsionen messen, die möglicherweise über ein erhöhtes Oxidationspotenzial verfügen. Das Ziel der vorliegenden Studie war die Beurteilung der Beziehung von Phytosterolen und ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten im Plasma und Aortenklappentaschen bei Patienten mit operationspflichtiger Aortenklappenstenose. Weiterer Gegenstand der Untersuchung war die Beziehung der Phytosterole und Oxyphytosterole mit begleitender koronarer Herzkrankheit (KHK) sowie positiver Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen.

Methoden: In die Studie wurden konsekutiv 104 Patienten (♂: 68, ♀: 36) im Alter von 40 bis 87 Jahren eingeschlossen, die sich einem elektiven, chirurgischen Aortenklappenersatz unterzogen haben. Zu Beginn der Untersuchung wurde eine ausführliche Anamnese unter besonderer Berücksichtigung von etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren, Familienanamnese und begleitender Statinbehandlung durchgeführt. Die präoperative Koronarangiographie diente der Beurteilung einer gleichzeitig bestehenden KHK. Eine venöse Blutprobe wurde am Tag vor der geplanten Operation entnommen. Die resezierten Aortenklappentaschen wurden mittels Speed-Vac-Concentrator getrocknet. Die Analyse des Probenmaterials erfolgte mit Hilfe von Gaschromatographie-Flammenionisation (Cholesterol) und Gaschromatographie-massenselektiver Detektion (Cholesterolvorstufen, Phytosterole und Oxyphytosterole).

Ergebnisse: Die Konzentrationen der beiden häufigsten Phytosterole, Campesterol und Sitosterol, korrelieren im Plasma ($r = 0,911$, $p < 0,001$), in Aortenklappentaschen ($r = 0,945$, $p < 0,001$) sowie zwischen Plasma und Aortenklappentaschen ($r = 0,488$, $p < 0,001$ für Campesterol, $r = 0,350$, $p < 0,001$ für Sitosterol). Eine starke Korrelation zeigt sich zwischen den Phytosterolen und ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten in Aortenklappentaschen ($r = 0,712$; $p < 0,001$ für Campesterol zur Summe $[\Sigma]$ der OH-Campesterole, $r = 0,706$; $p < 0,001$, für Sitosterol zur Σ -OH-Sitosterole), jedoch nur eine schwache Korrelation im Plasma ($r = 0,243$; $p < 0,05$ für Campesterol zur Σ -OH-Campesterole, $r = 0,317$; $p < 0,05$ für Sitosterol zur Σ -OH-Sitosterole). Die Summe der oxidierten Sitosterole zwischen Plasma und Aortenklappentaschen lässt eine schwache Korrelation erkennen ($r = 0,215$, $p < 0,05$). Für die Summe der oxidierten Campesterole zeigt sich zwischen Plasma und Aortenklappentaschen keine Korrelation ($r = 0,128$, $p = 0,199$).

Darüber hinaus zeigen in der Gesamtpopulation der Studie Patienten mit einer begleitenden KHK höhere Phytosterol/Lathosterol-Quotienten im Plasma sowie höhere Phytosterolkonzentrationen in den Aortenklappentaschen im Vergleich zu Patienten ohne KHK. Des Weiteren weisen Patienten mit einer positiven Familienanamnese im Gegensatz zu Patienten mit negativer Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen einen statistisch nicht signifikanten Trend zu höheren Phytosterol- und Oxyphytosterolkonzentrationen ebenso wie zu höheren Phytosterol/Lathosterol-Quotienten und Phytosterol/Cholesterol-Quotienten auf.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen starke Korrelationen der Phytosterole mit ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten in den Aortenklappen, hingegen lediglich schwache Korrelationen im Plasma. Für die Konzentrationen der Oxyphytosterole lassen sich allenfalls schwache Korrelationen zwischen den beiden Kompartimenten beobachten. Die Befunde der dargestellten Studie legen den Schluss nahe, dass die Oxidation von Phytosterolen im kardiovaskulären Gewebe einen lokalen Prozess darstellen könnte. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz wäre eine Akkumulation von Oxyphytosterolen in Aortenklappen.

SUMMARY

Background: In the pathogenesis of atherosclerosis and aortic stenosis inflammatory, vascular and cellular components are involved. In addition to cholesterol, phytosterols such as campesterol and sitosterol can be measured in atherosclerotic lesions, which are possibly predisposed to oxidation in several areas of their structure. The aim of this study was to assess the relationship of phytosterols and their corresponding oxidation products in plasma and aortic valve cusps in patients with aortic stenosis requiring surgery. Another object of this assessment was the relationship of phytosterols and oxyphytosterols with a concomitant coronary artery disease and a positive family history for cardiovascular disease.

Methods: In the following study 104 patients (♂: 68, ♀: 36) were consecutively included. Those people were between the age of 40 and 87 and suffered from severe aortic stenosis requiring a surgical aortic valve replacement. At the beginning of the study, a detailed medical history with special reference to established cardiovascular risk factors, family history and concomitant statin treatment was performed. Preoperative coronary angiography was used to assess a co-existing coronary artery disease. A venous blood sample was taken on the day before the scheduled surgery. The resected aortic valve cusps were dried by speed-vac-concentrator. The analysis of the sample material was evaluated by gas chromatographic flame ionization (cholesterol) and gas chromatographic mass selective detection (cholesterol precursors, phytosterols and oxyphytosterols).

Results: The concentrations of the two most common phytosterols, campesterol and sitosterol, correlated in plasma ($r = 0.911$, $p < 0.001$), in aortic valve cusps ($r = 0.945$, $p < 0.001$) and between plasma and aortic valve cusps ($r = 0.488$, $p < 0.001$ for campesterol, $r = 0.350$, $p < 0.001$ for sitosterol). Furthermore a strong correlation between phytosterols and their corresponding oxidation products in aortic valve cusps ($r = 0.712$, $p < 0.001$ for campesterol to the sum $[\Sigma]$ of OH-campesterols, $r = 0.706$, $p < 0.001$ for sitosterol for Σ -OH-sitosterol) was established, but only a weak correlation in plasma ($r = 0.243$, $p < 0.05$ for campesterol to Σ -OH-campesterols, $r = 0.317$, $p < 0.05$ for sitosterol for Σ -OH-sitosterol). For the sum of oxidized sitosterols a weak correlation has been detected between plasma and aortic valve cusps ($r = 0.215$, $p < 0.05$). The sum of the oxidized campesterols showed no correlation between plasma and aortic valve cusps ($r = 0.128$, $p = 0.199$).

In addition, in the total population of the study patients with concomitant coronary artery disease showed higher phytosterol / lathosterol ratios in plasma and higher phytosterol levels in aortic valve cusps in contrast to patients without CHD. Furthermore, patients with a positive family history of cardiovascular disease had a statistically non-significant tendency

towards higher phytosterol and oxyphytosterol levels as well as to higher phytosterol / lathosterol ratios and phytosterol / cholesterol ratios in contrast to patients with a negative family history.

Conclusions: The results of this study show strong correlations of phytosterols with their corresponding oxidation products in the aortic valve, however only weak correlations in the plasma. Between the two compartments at most weak correlations of oxyphytosterols can be observed. The results of this study suggest that the oxidation of phytosterols could represent a local process in the cardiovascular tissue. Another possible explanation might be the accumulation of oxyphytosterols in aortic valve cusps.

2. EINLEITUNG

2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: Prävalenz und Definition

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) sind derzeit die Haupttodesursache in Europa (Abb. 1) und verantwortlich für mehr als 4 Millionen Todesfälle jährlich¹⁵. Die **klinischen Hauptmanifestationen** stellen die koronare Herzkrankheit (KHK), der ischämische Schlaganfall (Apoplex) sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) dar²⁵.

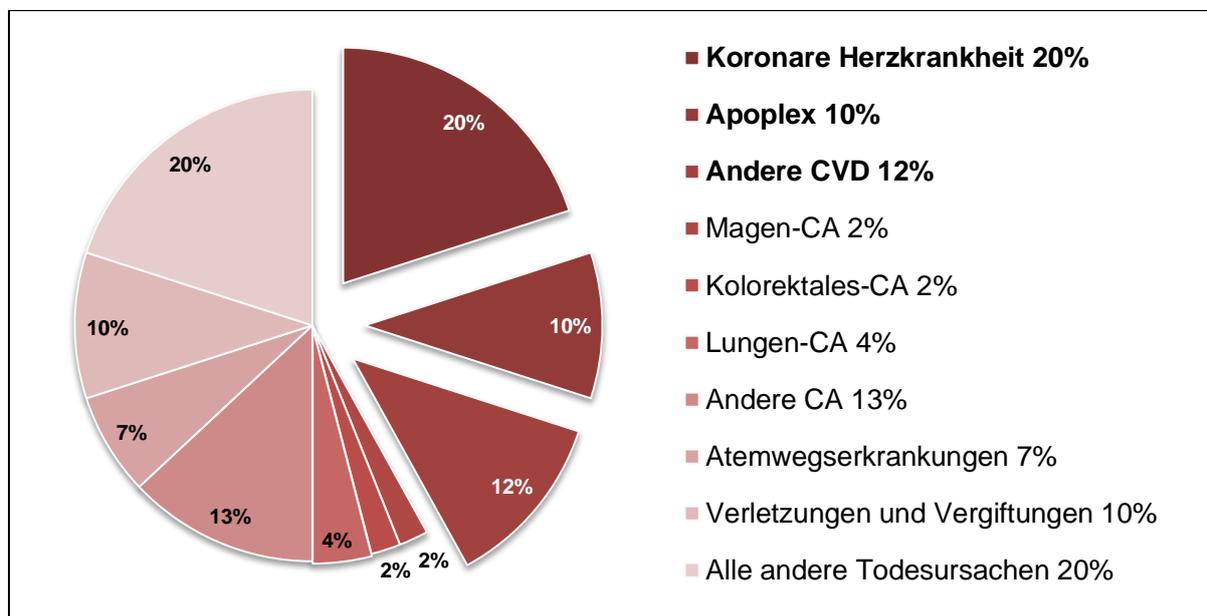


Abbildung 1: Haupttodesursachen bei Männern in Europa, modifiziert nach¹⁵.

Die Ursachen der kardiovaskulären Erkrankungen sind multifaktoriell begründet. Einige modifizierbare **Risikofaktoren** stehen in Beziehung mit der individuellen Lebensführung wie Rauchen, Mangel an Bewegung oder Ernährungsgewohnheiten. Darüber hinaus stellen arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus Typ II, Dyslipidämien sowie familiäre Disposition aber auch nicht modifizierbare Faktoren wie Alter und Geschlecht weitere Einflussgrößen dar²⁵. Insbesondere Lipide spielen eine wichtige Rolle für die Pathogenese der koronaren Herzkrankheit (Abb. 2)¹⁶.

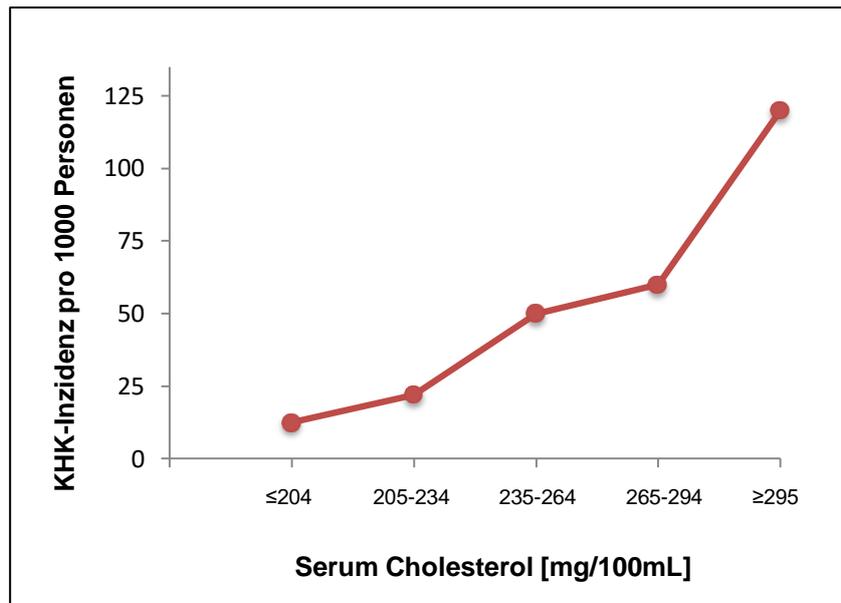


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen Gesamtcholesterol im Serum und Inzidenz der KHK in der Framingham-Heart-Studie, modifiziert nach¹⁶.

Die **Atherosklerose** - eine progressive multifaktorielle Systemerkrankung charakterisiert durch die Akkumulation von Lipiden sowie fibrösen Matrixbestandteilen - stellt den wichtigsten ursächlichen pathophysiologischen Prozess kardiovaskulärer Erkrankungen dar⁵². Das heutige Verständnis der Atherosklerose, sieht die Erkrankung als einen dynamischen Wechselwirkungsprozess zwischen inflammatorischen, vaskulären sowie zellulären Komponenten⁵¹. Dabei spielt Cholesterol insbesondere in seiner oxidierten modifizierten Form eine zentrale Rolle.

Die **schematische Darstellung des Verlaufs der Atherosklerose** über die Lebensspanne ist in Abbildung 3 dargestellt. Ausgangspunkt atherosklerotischer Läsionen ist die endotheliale Dysfunktion - lokale Funktionsdefekte der Tunica intima⁸⁵. Bereits ab der ersten Lebensdekade ist das Wachstum atherosklerotischer Läsionen aufgrund von Lipidablagerungen in Form von Schaumzellen sowie fatty streaks erkennbar^{30, 101}. Die fortschreitende Akkumulation extrazellulärer Lipide führt zur Ausbildung eines dichten Lipidkerns, dem Atherom¹⁰¹. Ab der vierten Lebensdekade dominieren fibröse Plaques, gekennzeichnet durch die Zunahme glatter Muskelzellen sowie Kollagenfasern. Komplikationen im Sinne einer Ruptur der Läsion führen zur Ausbildung einer instabilen, komplizierten Plaque mit der Folge eines Hämatoms/Hämorrhagien oder Bildung eines Thrombus¹⁰⁰. Die daraus resultierende klinische Symptomatik manifestiert sich am Herzen in Form von Angina Pectoris-Beschwerden, akutem Koronarsyndrom oder dem Tod.

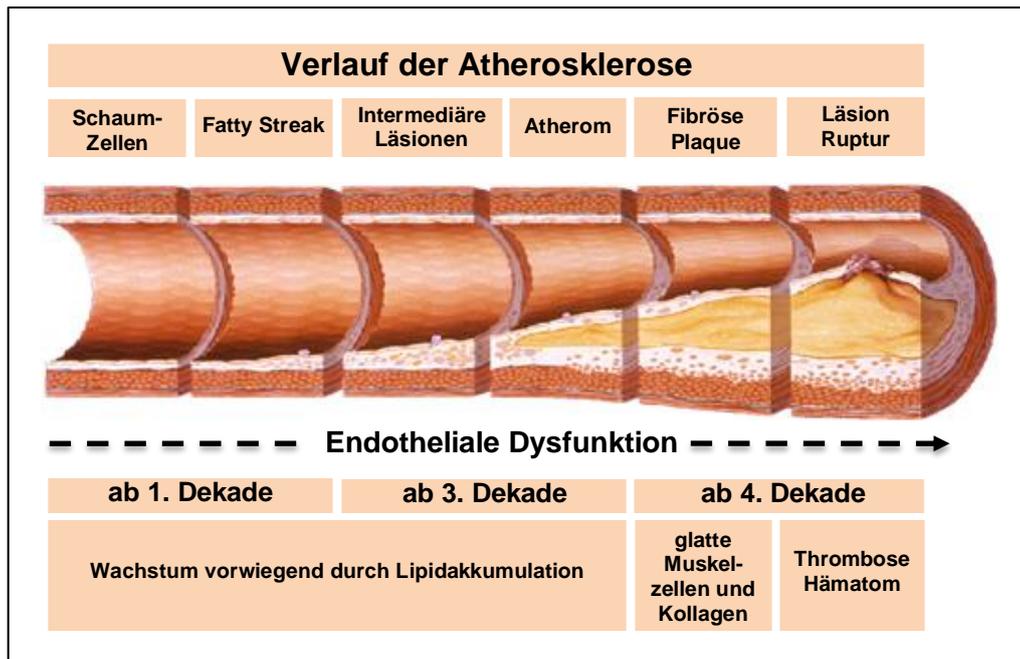


Abbildung 3: Verlauf der Atherosklerose, modifiziert nach¹⁰⁰.

2.2 Hypercholesterolämie - Medikamentöse Modulation

Hohe Cholesterolerumkonzentrationen sind ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung der koronaren Gefäßerkrankung (CAD)^{16, 44, 117, 123}. Große, klinische prospektiv-randomisierte Studien konnten für die Primär- sowie Sekundärprävention zeigen, dass die Senkung des Gesamtcholesterols sowie LDL-Cholesterols durch **Statine** mit einer Reduktion kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität einhergeht^{5, 36, 84, 93}. Aus diesem Grund sind Statine, kompetitive Hemmer der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), Therapie der ersten Wahl zur medikamentösen Lipidsenkung⁴⁸.

Einen zusätzlichen Beitrag zur effektiven Reduktion des Serumcholesterols leisten Statine aufgrund der Steigerung der hepatischen LDL-Cholesterol Rezeptoren (LDL-R), dem Hauptmechanismus der LDL-Cholesterol Elimination aus der Zirkulation⁵⁰. Meta-Regression-Analysen von Studien zeigen eine Risikoreduktion für koronare Herzerkrankungen von 22% pro 1,0 mmol/L LDL-Cholesterol Abnahme^{5, 88}.

Ergänzend werden Statine eine Reihe von Cholesterol-unabhängigen Wirkmechanismen - sogenannte „pleiotrope Effekte“ - zugeschrieben^{3, 50, 130}. Neben dieser antiatherogenen Effekte, konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der endogenen Cholesterolbiosynthese eine Erhöhung der intestinalen Sterolabsorption zur Folge hat, resultierend in einem bis zu dreifach höheren Anstieg der Plasma-Phytosterolkonzentration⁶⁰.

Darüber hinaus machten die Ergebnisse der Subgruppenanalyse der 4S-Studie darauf aufmerksam, dass Patienten mit einer hohen Baseline-Cholesterolresorption vermutlich nicht

von einer Statintherapie profitieren^{60, 61}. Miittinen und Kollegen gaben den Anstoß eine Differenzierung der Patienten in „Responder auf Statintherapie“ (niedrige Cholesterolesorption, hohe Cholesterolsynthese) und „Non-Responder auf Statintherapie“ (hohe Cholesterolesorption, niedrige Cholesterolsynthese) durchzuführen⁶⁰. Sie schlussfolgerten, dass Cholesterolspiegel bei Patienten mit erhöhter Resorption und verminderter Synthese weniger adäquat gesenkt werden und eventuell zur Erhöhung des kardiovaskulären Risikos führen. Infolge dieser Erkenntnis wurde empfohlen bei Patienten mit einer hohen Baseline-Sterolesorption, die ein Viertel der Population ausmachen⁶³, eine zusätzliche Behandlung mit Inhibitoren der Cholesterolesorption anzuwenden^{60, 61, 63, 102}. Zur Hemmung der intestinalen Cholesterolesorption kann **Ezetimib**, ein Wirkstoff aus der Klasse der Azetidione, verwendet werden. Der Wirkmechanismus besteht in der Blockade des NPC1L1-Proteins auf Ebene des intestinalen Bürstensaums^{29, 73, 92}. Die ESC/EAS Guidelines für die Diagnose und Therapie der Dyslipidämie²⁵ empfehlen Ezetimib ergänzend zu Simvastatin, falls das LDL-Therapieziel durch die maximal tolerierte Statindosis nicht erreicht werden kann.

2.3 Phytosterole

2.3.1 Definition und Physiologie

Die Modifikation der Ernährungsgewohnheiten bildet die Basis der cholesterolsenkenden Behandlungsmaßnahmen. Eine Möglichkeit der nicht-medikamentösen Cholesterolsenkung besteht im Verzehr sogenannter „funktioneller Lebensmittel“. Diese mit Zusätzen von Phytosterolen und Phytostanolen angereicherten Produkte sind heutzutage ein verbreiteter, nicht verschreibungspflichtiger Ansatz zur Senkung des Serumcholesterolspiegels. Um eine signifikante Reduktion des Serumcholesterols von 10-15% zu erreichen, ist ein Phytosterolkonsum von 2-3 g/Tag erforderlich^{20, 45}. Meta-Analysen von 14 randomisierten, kontrollierten Studien konnten für den Effekt von Phytosterolen im Vergleich zu Phytostanolen keinen signifikanten Unterschied auf die Cholesterolsenkung dokumentieren¹⁰⁶. Im Gegensatz dazu beobachteten Musa-Veloso und Kollegen in einer weiteren Meta-Analyse, dass die maximale LDL-Cholesterolreduktion für Phytostanole (16,4%) und Phytostanolester (17,1%) signifikant höher war als die maximale LDL-Cholesterolreduktion für Phytosterole (8,3%) und Phytosterolester (8,4%)⁶⁷.

Phytosterole sind im Pflanzenreich das natürliche Äquivalent zu Cholesterol und zählen zu der großen Familie der Isoprenoide. Als Membranbestandteile im pflanzlichen Organismus regulieren sie die Fluidität und Permeabilität der Membran und dienen darüber hinaus als Substrate für die Synthese einer Vielzahl von sekundären Metaboliten³⁵. Die chemische

Struktur pflanzlicher Sterole unterscheidet sich von Cholesterol durch eine zusätzliche Methyl- oder Ethylgruppe am C-24-Atom oder eine weitere Doppelbindung in der Seitenkette (Abb. 4). Die beiden häufigsten Phytosterole sind Sitosterol und Campesterol und machen ca. 60% bzw. 30% der diätischen Zufuhr pflanzlicher Fette aus⁴². Pflanzliche Stanole hingegen bilden die gesättigte Form pflanzlicher Sterole und kommen in viel geringeren Konzentrationen im Körper vor¹⁶.

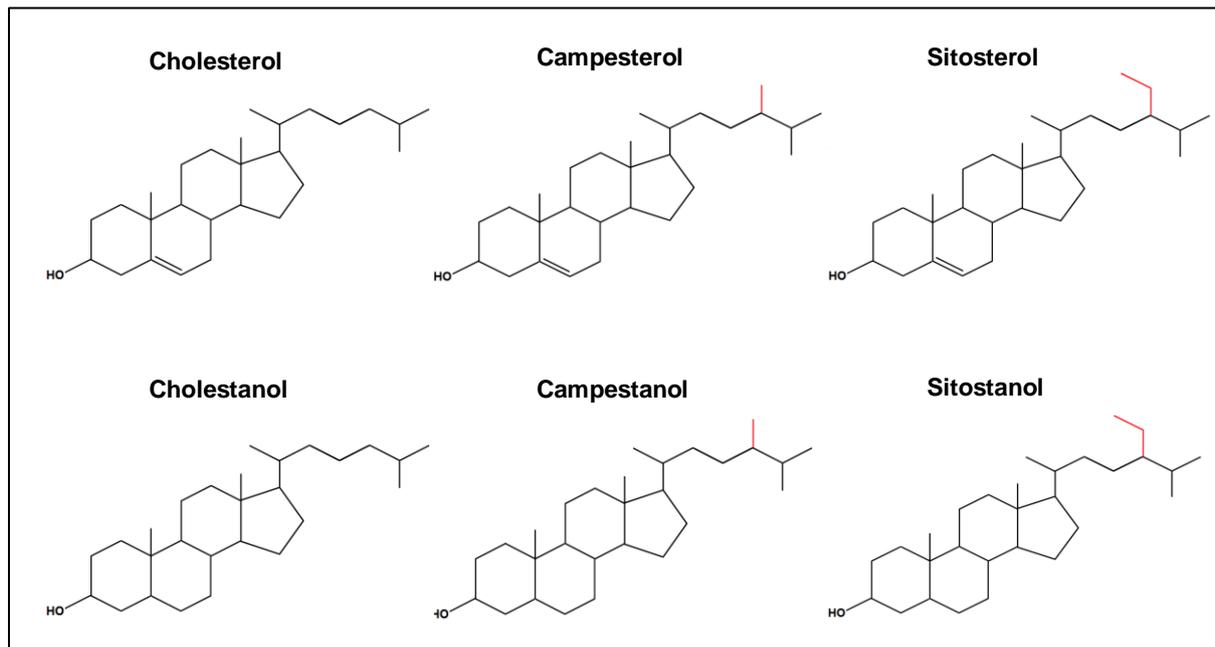


Abbildung 4: Chemische Strukturen von Cholesterol, Phytosterolen und ihren gesättigten Formen, modifiziert nach¹¹⁶.

Als Hauptquellen gelten fettreiches Gemüse und Gemüseprodukte wie Olivenöl, Körnerprodukte, Samen, Früchte und Nüsse¹¹⁸. Die typische Ernährung der westlichen Bevölkerung beinhaltet 200-500 mg Cholesterol und 200-400 mg pflanzliche Sterole¹¹⁸. Die Aufnahme und Speicherung des diätischen Cholesterols liegt bei 55-60% - die Absorption der Phytosterole/Phytostanole hingegen bei weniger als 5%, wobei durch rasche Elimination letztlich weniger als 1% einbehalten wird⁷¹.

Im Darm werden die Sterole zunächst in Mizellen aufgenommen, bevor sie mit den Enterozyten des Bürstensaums interagieren und die Aufnahme in die Zelle erfolgen kann (Abb. 5). Der exakte molekulare Mechanismus ist bislang nicht vollkommen entschlüsselt. Es ist allerdings bekannt, dass sowohl Cholesterol als auch Phytosterole über das Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1) absorbiert werden. Innerhalb der Enterozyten wird Cholesterol durch die Acetyl-Coenzym A Acetyltransferase 2 (ACAT2) verestert und an der basolateralen Seite der Membran unter Beteiligung des mikrosomalen Triglyzeride Transfer Proteins (MTP) in Chylomikronen verpackt. Anschließend erfolgt die Sekretion in das lymphatische System. Unverestertes Cholesterol wird ebenso wie Phytosterole

energieaufwendig über die ATP-binding-cassette transporter G5 und G8 (ABCG5/ABCG8) zurück ins Darmlumen gepumpt. Der Großteil der Phytosterole wird damit über die Fäzes ausgeschieden, was in einer limitierten Nettoabsorption resultiert. Lediglich ein geringer Anteil der pflanzlichen Sterole unterliegt der Resorption und wird rasch über die Galle eliminiert^{42, 71, 116}.

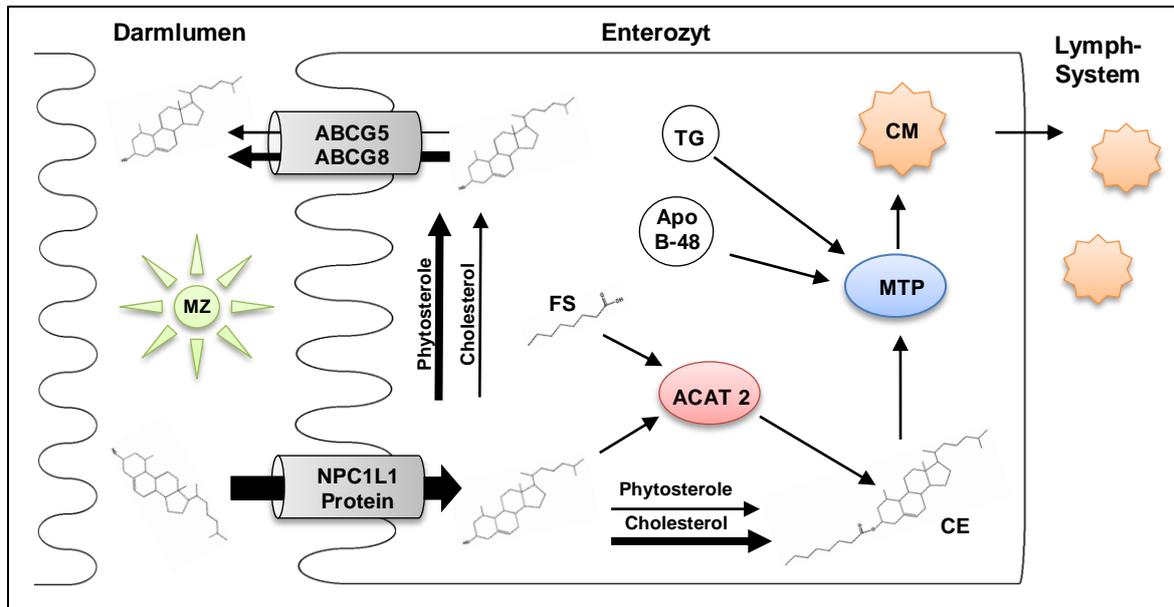


Abbildung 5: Absorption und intrazellulärer Metabolismus von Sterolen und Phytosterolen, modifiziert nach¹¹⁶.

Welcher Schritt der Prozesskaskade den zentralen Wirkmechanismus des cholesterolsenkenden Effekts der Phytosterole vermittelt, ist derzeit noch nicht hinreichend geklärt. Im Allgemeinen reduziert der Konsum von pflanzlichen Sterolen und Stanolen die LDL-Konzentration durch verminderte intestinale Cholesterolabsorption und führt infolgedessen zu einem Anstieg der endogenen Cholesterolsynthese und einer Hochregulation der LDL-Rezeptorexpression^{80, 81}. Darüber hinaus ist die sogenannte „transintestinale Cholesterol Exkretion (TICE)“¹⁹ Gegenstand aktueller Forschungen und beschreibt einen weiteren Erklärungsansatz des hypocholesterolämischen Effekts pflanzlicher Sterole in einer Gallen-unabhängigen Ausscheidung von Cholesterol^{13, 14, 112}. Ferner deuten tierexperimentelle sowie in vitro Untersuchungen darauf hin, dass Phytosterole neben den cholesterolsenkenden Eigenschaften zudem über Krebs-protective Eigenschaften verfügen¹⁰. Als mögliche antikanzerogene Effekte werden multiple Mechanismen wie die Hemmung des Tumorwachstums, die Inhibition der Tumormetastasierung sowie die Förderung der Apoptose diskutiert¹³². Derzeit stehen noch eindeutige Belege für den Nutzen von Pflanzensterolen hinsichtlich einer Krebsprävention aus⁷⁹.

2.3.2 Functional Food

Die erste Studie, die pflanzlichen Sterolen eine Rolle in der Regulation der Cholesterollhomöostase zusprach, wurde von Peterson et al. publiziert, datiert auf das Jahr 1951. In dieser Untersuchung wurden Hühner mit unterschiedlicher Nahrung gefüttert - supplementiert mit 0,5-1% Soja-Sterolen, mit 0,5-1% Cholesterol oder einer Mischung aus beidem. In der Gruppe der mit Soja-Sterol gefütterten Hühnern konnte eine signifikante Reduktion der hepatischen sowie plasmatischen Cholesterolkonzentration festgestellt werden⁷⁵. Im Laufe der darauffolgenden Jahre wurde das Interesse des cholesterolsenkenden Effekts von oral zugeführten Phytosterolen zunehmend größer und Bestandteil unzähliger wissenschaftlicher Arbeiten^{62, 90}. In den 90er Jahren stellte sich aufgrund zunehmender Kosten im Gesundheitswesen die Idee der Entwicklung von Lebensmitteln zur Verbesserung des Gesundheitszustandes und zur Risikoreduktion verbreiteter Erkrankungen als innovativer Trend der Lebensmittelentwicklung heraus⁶⁶. Das erste auf dem europäischen Markt erhältliche sogenannte „**Functional Food**“ war ein Streichfett, welches durch die Supplementierung pflanzlicher Sterolester zu einer Senkung des Cholesterolspiegels im Blut führte⁴⁷. In den folgenden Jahren wurden Phytosterole als Nahrungsmitteladditiva in die Herstellung weiterer Lebensmittel integriert, darunter Milch-, Joghurt- und Käseprodukte, Brot sowie Soja- und Fruchtgetränke¹²¹. Der tägliche Verzehr von 2 g pflanzlichen Sterolen und Stanolen reduziert das LDL-Cholesterol im Serum bis zu 10%⁷⁹. Als Folge dessen sprachen verschiedene maßgebende wissenschaftliche Organisationen weltweit Empfehlungen aus, den Gebrauch von Phytosterolen sowie Phytostanolen als Teil der Ernährung zwecks LDL-Cholesterol-Senkung zu nutzen. Zu den genannten Organisationen zählten u.a. das „National Cholesterol Education Panel“²⁶, die „American Heart Association“⁵⁴ und die „European Food Safety Authority“²². Die Fülle an Evidenz für den cholesterolsenkenden Effekt pflanzlicher Fette resultiert letztlich in der Weiterempfehlung pflanzlicher Sterole und Stanole durch aktuelle Ernährungsleitlinien^{25, 26, 74}.

2.3.3 Phytosterole - eine Kontroverse

Phytosterole und Phytostanole in Form von „Functional Food“ stellen einen globalen Wachstumsmarkt dar und schreiben insbesondere in Deutschland progredient steigende Verkaufszahlen. So war es möglich den Umsatz von 1995 bis 2009 annähernd zu verdoppeln, womit im Jahr 2009 4,52 Milliarden Euro Einnahmen durch Functional Food verbucht werden konnten (Abb.6)¹¹¹. Nichtsdestotrotz sind in erster Linie die Nahrungsergänzungen mit pflanzlichen Sterolestern ein kontrovers diskutiertes Thema^{121, 122}.

¹²⁶.

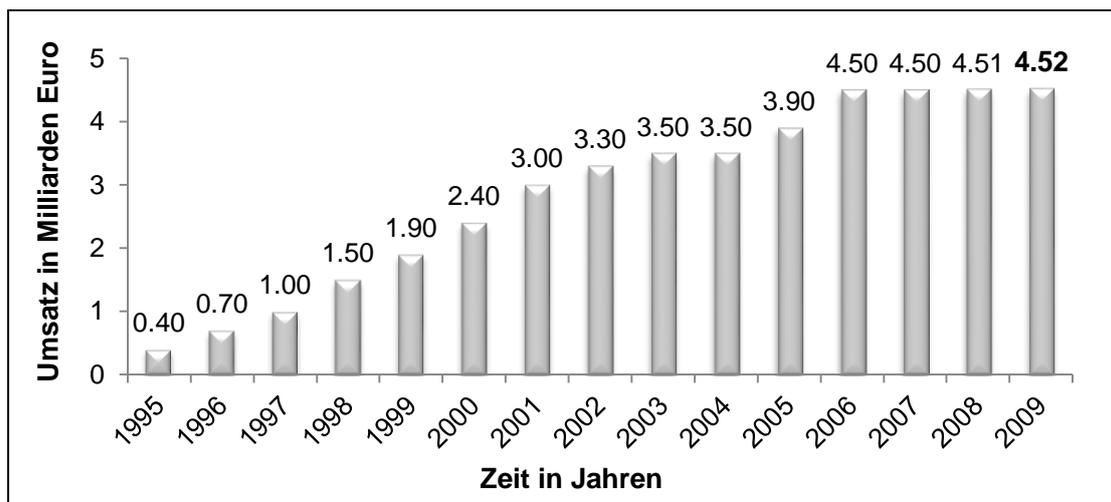


Abbildung 6: Umsatz mit Functional Food in Deutschland in den Jahren 1995 bis 2009 [in Milliarden Euro], modifiziert nach¹¹¹.

Aufgrund der weiten Verbreitung und der Vielzahl unterschiedlicher Produkte von Nahrungsmitteladditiven, wurden Sicherheitsbedenken geäußert, dass eine kumulative Aufnahme zu unphysiologisch hohen Phytosterolkonzentrationen führt und diese wiederum die intestinale Resorption von Carotinoiden und fettlöslichen Vitaminen beeinträchtigen könnten⁴⁷. Reduzierte Carotinoidkonzentrationen sind mit Gesundheitsrisiken wie kardiovaskulären Erkrankungen aber auch Krebs assoziiert³¹. Da die aktuelle Studienlage jedoch keine einheitlichen Ergebnisse liefert bezüglich der Effektivität höherer Konzentrationen^{18, 38, 58}, gilt als Vorsichtsmaßnahme eine Tageszufuhr von 3 g nicht zu überschreiten²³. Phytostanolester reduzieren nicht nur das Serumcholesterol, sondern ebenfalls die Konzentration der Phytosterolesteren, bewirken jedoch im Gegensatz zu Phytosterolen keine Senkung der Gallensäuresynthese⁶⁹. Die Ansprechbarkeit des LDL-Cholesterols hängt nicht nur von der Höhe der konsumierten Phytosterole und Phytostanole ab. Die genetisch bedingten individuellen Charakteristika des Cholesterometabolismus jedes Einzelnen bestimmen ebenfalls das Ausmaß der Cholesterolreduktion^{77, 133}. Fuentes und Kollegen²⁸ konnten bei 30 Studienteilnehmern mit familiärer Hypercholesterolämie beobachten, dass Personen mit hoher Cholesterolresorption - gemessen an der Sitosterol/Cholesterol-Ratio - unter Phytosterolgabe eine stärkere Reduktion des LDL-Cholesterols zeigten.

Der Verzehr von Nahrungsmitteladditiven in Form von Functional Food hat neben dem cholesterolsenkenden Effekt auch eine Erhöhung der pflanzlichen Sterole sowie Stanol zur Folge¹²⁸. Erste Hinweise auf eine atherogene Wirkung von Phytosterolen lieferten Bhattacharyya und Connor im Jahre 1974 mit der Erkenntnis über die pathophysiologischen Mechanismen der **Sitosterolämie**, einer äußerst seltenen autosomal-rezessiven Erkrankung⁷. Der genetische Defekt im STLS-Lokus auf Chromosom 2q21 bewirkt den

Funktionsdefekt eines der beiden Transportergene ABCG5 und ABCG8, welche für die gleichnamigen intestinalen Halbtransporter in Darm und Leber codieren⁷². Die daraus resultierende vermehrte Resorption und verminderte Exkretion von Phytosterolen geht mit erhöhten Plasmakonzentrationen im Bereich von 12 - 40 mg/dl (normal < 1 mg/dl) einher - pathognomonisch für diese Erkrankung. Zu den charakteristischen Befunden der Sitosterolämie zählen Xanthome, Arthralgien, frühzeitige - häufig letal verlaufende - Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen¹⁰⁴. Hypersplenismus, chronisch hämolytische Anämie ebenso wie Thrombozytopenien sind weitere klinische Merkmale homozygoter Träger⁴⁶. Der Cholesterolasmaspiegel der betroffenen Menschen liegt im Normbereich, im Gegensatz zur familiären Hypercholesterolämie, der häufigsten Ursache für Xanthome. Diese Erkenntnisse führte zu der Theorie, dass pflanzliche Sterole selbst ein besonders atherogenes Potential haben könnten und in Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen stehen¹²¹.

In einer vorausgegangen klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, dass Patienten, die mit Phytosterolestern angereicherte Margarine konsumierten, über eine fünffach erhöhte Sterolkonzentration im Aortenklappengewebe verfügten¹²⁶. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen einer weiteren Studie, deren Untersuchungsgegenstand die Veränderungen des Cholesterometabolismus in Bezug auf vaskuläre Erkrankungen war. Anhand dieser Studie konnte unsere Arbeitsgruppe¹²⁹ zeigen, dass eine gesteigerte Absorption (gemessen an Campesterol) und eine verminderte Synthese von Cholesterol (gemessen an Lathosterol) im Zusammenhang steht mit einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen und der Entwicklung einer begleitenden koronaren Herzkrankheit bei Patienten mit Aortenklappenstenose. Dies unterstützt die Hypothese, dass Phytosterole in der Pathogenese von Aortenklappenveränderungen involviert sein könnten.

Da die Wirkung der Phytosterole sowie Phytostanole im Hinblick auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen strittig ist, war das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit weitere Erkenntnisse über den Stellenwert der Phytosterole im menschlichen Organismus bei Patienten mit Aortenklappenersatz zu erhalten.

2.4 Oxyphytosterole

Auf Basis der wohl bekannten cholesterolsenkenden Eigenschaft von Phytosterolen erstreckt sich ihre weltweite Vermarktung heutzutage auf mehr als 40 Patente ebenso wie mehr als 15 verschiedene Phytosterolprodukte. Phytosterole sind bedingt durch ihre chemische Struktur anfällig für die Oxidation in verschiedenen Bereichen ihres Sterolgerüsts mit der Folge der Entstehung einer Vielzahl verschiedener pflanzlicher Steroxidationsprodukte (POP)³¹. Die

Anwesenheit von erhöhten Oxidationsprodukten der Phytosterole im Plasma von Patienten mit Sitosterolämie, die über ein ausgeprägtes atherosklerotisches Profil verfügen, steigerte das Interesse an oxidierten Phytosterolen als proatherogener Mediator des kardiovaskulären Risikos^{78, 89}. Ferner gibt das Vorhandensein von α - und β -Epoxytosterol im Plasma von Patienten mit Waldenströms Makroglobulinämie, einer malignen Lymphomkrankung weiteren Anlass für eine kritische Begutachtung der Phytosterole hinsichtlich gesundheitsschädlicher Einflüsse¹².

Aufgrund der strukturellen Kongruenz beruht der Großteil der Erkenntnisse über die Oxidationsprozesse von pflanzlichen Sterolen auf Studien zur Erforschung von Cholesterol⁹⁹. Die Serumkonzentration von **Oxyphytosterolen im Organismus** ist auf drei verschiedene Quellen zurückzuführen. Die erste Quelle bildet die intestinale Resorption pflanzlicher Oxidationsprodukte über die Nahrungsaufnahme wie beispielsweise in Form von Weizenmehl⁶⁸, Kaffee¹¹⁰, gebratenen Kartoffeln²¹, Pflanzenöl oder industriell hergestellten Nahrungsmitteladditiva wie functional food⁴³. Darüber hinaus können die mittels Kosmetika in die Haut gelangten Phytosterole über Photooxidationsprozesse, eine durch UV-Licht katalysierte Reaktion, in Oxyphytosterole umgewandelt werden¹⁰⁹. Außerdem sind oxidierte Phytosterole meist am C5-Atom gesättigt oder in der Seitenkette modifiziert. Dies bedingt eine niedrige Absorptionsrate, sodass der Hauptanteil erst nach Aufnahme von Phytosterolen durch enzymatische Prozesse oder Autooxidation im Körper generiert wird¹¹⁴. Dieser Prozess stellt die dritte Quelle der im Organismus vorkommenden Oxyphytosterole dar. Die nicht-enzymatische durch reaktiven Sauerstoff oder freie Radikale hervorgerufene Oxidation betrifft insbesondere den Sterolring und kann durch verschiedene Faktoren wie Hitze, Licht, Luft, Wasser oder Übergangsmetalle initiiert werden⁷⁰. Die Hauptoxidationsprodukte der Ringstruktur von Sterolen sind Hydroxy- (OH-), Keto- (=O), Epoxy- sowie Triolderivate und sind in Abbildung 7 dargestellt. Die enzymatische Oxidation hingegen ist vorwiegend in der Seitenkette lokalisiert und schließt Enzyme wie Cytochrom P450 Monooxygenase, Dehydrogenasen oder Hydroxylasen ein³⁹. Ungeachtet der Art der Detektion wird die Oxyphytosterolkonzentration im Plasma auf 0,3 bis 4,5 ng/mL geschätzt. Dies entspricht im Vergleich zu Oxysterolen (oxidiertes Cholesterol) einem 10 bis 100-fach geringeren Wert¹¹³.

Die Tatsache, dass Oxysterole eine zentrale Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen spielen, wurde bereits durch eine Vielzahl von Studien belegt^{11, 53, 55}. Dem gegenüber bleibt die Frage - welche Rolle Oxyphytosterole im Zusammenhang mit Atherosklerose spielen - ein zentrales Thema vieler Debatten³¹.

Da derzeitige Untersuchungsergebnisse lediglich auf zytologischen sowie tierexperimentellen Studien basieren, war das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit die

Rolle pflanzlicher Oxidationsprodukte im menschlichen Organismus bei Patienten mit Aortenklappenersatz zu analysieren.

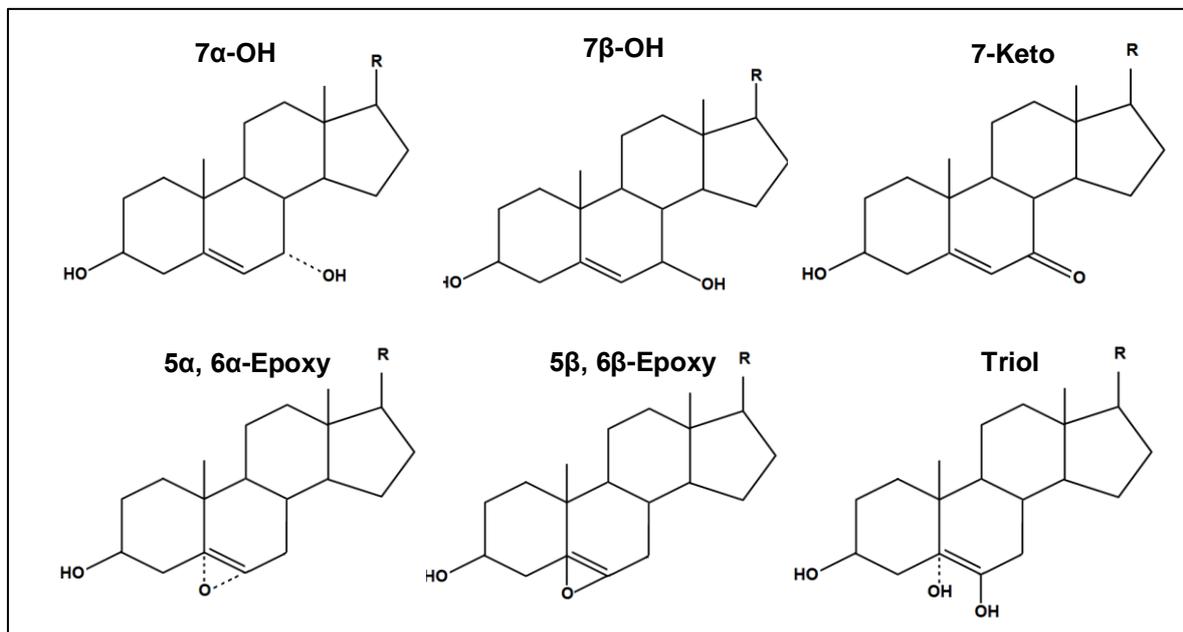


Abbildung 7: Chemische Struktur der häufigsten Oxyphytosterole, modifiziert nach³⁹.

2.5 Fragestellung der Arbeit

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Phytosterole bzw. Oxyphytosterole in Plasma und Aortenklappe bei Patienten mit operationspflichtiger Aortenklappenstenose?
2. Besteht eine Beziehung zwischen der Höhe der Phytosterolkonzentration bzw. Oxyphytosterolkonzentration - in Plasma und Aortenklappe - und koronarer Herzkrankheit?
3. Besteht eine Beziehung zwischen der Höhe der Phytosterolkonzentration bzw. Oxyphytosterolkonzentration - in Plasma und Aortenklappe - und positiver Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen?
4. Besteht eine Beziehung zwischen der Höhe der Cholestanol/Cholesterol-Ratio - in Plasma und Aortenklappe - und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien

- 7 α , β -OH-Campesterol/Sitosterol
- 7-Keto-Campesterol/Sitosterol
- d₄-7 α , β -OH-Campesterol/Sitosterol
- d₅-7-Keto-Campesterol/Sitosterol
- Butylhydroxytoluol [25 mg/mL], (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Ethanolisches NaOH [1 mol/L], (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Aqua bidest.
- Phosphorsäure 85% (Merck, KGaA, Darmstadt)
- pH-Indikator Streifen 5 -10 (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Natriumchloridlösung [9 mg/mL] (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Ethanol (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Methanol (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Dichlormethan (VWR, Darmstadt)
- n-Hexan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- n-Dekan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- 2-Propanol (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Pyridin (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Hexamethyldisilazan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Trimethylchlorosilan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- 5 α -Cholestan (Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg)
- Cyclohexan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- MeOH (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Epicoprostanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Cholesterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Cholestanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Campesterol/Sitosterol (40:60; w:w) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Lathosterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Die Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war die stationäre Aufnahme von Patienten im Alter von 18 bis 90 Jahren am Universitätsklinikum des Saarlandes, die sich bei hochgradiger Aortenklappenstenose einem elektiven, chirurgischen Aortenklappenersatz unterzogen. Die Aufnahme in die Studie erfolgte im Zeitraum von April 2011 bis August 2012. Zu Beginn der Studie wurde eine ausführliche Anamnese unter besonderer Berücksichtigung der kardiovaskulären Risikofaktoren (arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Rauchverhalten, Body Mass Index, Alter, Geschlecht) durchgeführt. Die genetische Prädisposition für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wurde anhand der Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen erfasst (Tabelle 1).

Definition: Positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen
Verwandtschaft 1. Grades
Geschlecht und Alter
♀ < 65 Jahre
♂ < 55 Jahre
Erkrankungen
Myokardinfarkt
KHK
Plötzlicher Herztod
Apoplex

Tabelle 1: Definition der positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Risikofaktoren.

Darüber hinaus wurde die Anwendung von lipidmodifizierenden Therapieformen dokumentiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Einnahme von Statinen gelegt. Die Studienteilnehmer unterzeichneten eine Einverständniserklärung mit der sie einwilligten eine Blutprobe sowie einen Teil der entnommenen Herzklappe zur Ermittlung von Cholesterol, Cholesterolvorstufen, Phytosterolen sowie Oxyphytosterolen zur Verfügung zu stellen. Das Studienprotokoll der vorliegenden Arbeit wurde durch die Ärztekammer des Saarlandes genehmigt.

3.2.2 Probenentnahme und Lagerung

Am Morgen vor dem operativen Aortenklappenersatz erfolgte bei stationärer Aufnahme eine venöse Blutentnahme. Unmittelbar im Anschluss wurde die Blutprobe zentrifugiert und das Plasma des Patienten gewonnen. Zum Schutz vor Autoxidationsprozessen wurden zu 1 mL Plasma 10 μ L methanolisches Butylhydroxytoluol (BHT; 25 mg/mL Methanol), ein Antioxidans, hinzugefügt. Daraufhin wurde das Plasma bei - 80°C bis zum Zeitpunkt der Analyse eingefroren.

Nach Entnahme der Aortenklappe durch den Operateur wurden die Taschenanteile der Aortenklappe bereits im Operationssaal vom Aortenring separiert und wiederholt mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung von Blutresten gesäubert. Die Aufbewahrung des Klappenmaterials erfolgte ebenfalls bei -80°C.

In verblindeter Form sowie randomisierter Reihenfolge wurden die Blut- und Klappenproben dem Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie am Universitätsklinikum Bonn - Prof. Dr. Dr. rer. nat. Dieter Lütjohann - für die Analyse der neutralen und oxidierten Sterole zugestellt. Die Analyse erfolgte durch die Mitarbeiter des Institutes unter Mithilfe der Doktorandin. Die Bestimmung der verschiedenen Sterole erfolgte mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID) sowie Gaschromatographie-massenselektiver Detektion (GC-MSD).

Die Aortenklappen wurden vor der Probenaufbereitung und der Analyse der einzelnen Sterole zunächst für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Vakuum in einem Speed-Vac-Concentrator getrocknet (Abb.8A). Anschließend wurde die atherosklerotische Plaque (Abb.8B) mechanisch vom Klappengewebe (Abb.8C) getrennt. Für die Bestimmung der Sterol-, Phytosterol- und Oxyphytosterolkonzentrationen wurde im weiteren Verlauf das Gewebe der Aortenklappen verwendet. Dieser Separationsvorgang hatte den Zweck die ermittelte Sterolkonzentration auf das Trockengewicht des Gewebes beziehen zu können, ohne dass der Anteil an verkalktem Material zu falsch niedrigen Sterolkonzentrationen führte.



Abbildung 8: Aortenklappentasche⁹¹

- A: Verkalte Tasche der Aortenklappe,
- B: Verkaltes Material nach mechanischer Separation
- C: Gewebe der Aortenklappe nach mechanischer Separation.

3.2.3 Probenaufbereitung

3.2.3.1 Probenaufbereitung der neutralen Sterole

Die neutralen Sterole wie Cholesterol, Cholesterolvorstufen und Phytosterole wurden vor der Quantifizierung zunächst in ihre freie Form gebracht. Anschließend erfolgte die Extraktion der freien Sterole und die Umwandlung in Trimethylsilyl-(TMSi)-Ether mit Hilfe von Silylierungsreagenz.

Zu Beginn der Probenaufbereitung der neutralen Sterole wurden die Plasmaproben bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden 1 µg Epicoprostanol (10 µL einer Stammlösung von 100 µg/mL in Cyclohexan gelöst) und 50 µg 5α-Cholestan (50 µL einer Stammlösung von 1 mg/mL in Cyclohexan gelöst) als interne Standards zu 100 µL der Probe hinzugegeben. Zum Schutz vor Autoxidationsprozessen wurde die Probenlösung mit 50 ng methanolisches Butylhydroxytoluol (BHT) (10 µL aus einer Stammlösung von 50 mg BHT / 10 mL MeOH) versetzt. Für die alkalische Hydrolyse (Verseifung) wurde 1 mL einer 90%igen ethanolischen NaOH-Lösung (1M) zur Probe hinzugegeben und diese für 1 Stunde im Wasserbad bei 68°C hydrolysiert. Im Anschluss erfolgte die Abkühlung bei Raumtemperatur, der Zugabe von 500 µL Aqua bidest. und die zweimalige Extraktion der freien Sterole in 3 mL Cyclohexan. Die Trocknung der vereinigten organischen Phasen erfolgte unter Stickstoffbegasung bei 65°C. Die Derivatisierung der Hydroxylgruppen der Sterole zu ihren TMSi-Ethern wurde nach Zusatz von 1 mL Trimethylsilylierungsreagenz (Pyridin-Hexamethyldisilazan-Trimethylchlorosilan 9:3:1, v/v/v) bewirkt. Die TMS-Reaktion wurde durch 1-stündige Inkubation bei 65°C durchgeführt. Im Folgenden wurden die restlichen Reagenzien unter Stickstoffbegasung verdampft und der Rückstand in 160 µL n-Dekan gelöst. 80 µL des resultierenden Gemisches wurden für die GC-MSD-Analyse in die Mikroeinsätze der Glasphiolen übertragen. Die restlichen 80 µL wurden für die GC-FID-Analyse mit 500 µL n-Dekan versetzt. Zur eindeutigen Identifizierung erfolgte die genaue Beschriftung der Glasphiolen¹¹⁹.

Zur Ermittlung der Sterolkonzentrationen in den **Aortenklappen** wurde das Klappengewebe zunächst für 48 Stunden in Folch-Reagenz (Chloroform/Methanol im Verhältnis 3:1, mit 0.25 mg/mL BHT) gegeben. Der interne Standard wurde zu 2 mL dieses Extrakts hinzugefügt und in Analogie zu der Probenaufbereitung des Plasmas verfahren¹¹⁹.

3.2.3.2 Probenaufbereitung der Oxyphytosterole

Für die Quantifizierung der Oxyphytosterole mussten diese - analog zu den nicht-oxidierten Sterolen - zunächst in freie Form gebracht werden und die freien Sterole extrahiert werden.

Im Gegensatz zur Aufbereitung der neutralen Sterole erfolgte daraufhin eine Festphasen-Extraktion zur Trennung der nicht-oxidierten Sterole von den oxidierten Sterolen. Die Überführung der Oxyphytosterole in Trimethylsilyl (TMSi)-Ether wurde ebenfalls mittels Silylierungsreagenz bewirkt.

Bei Raumtemperatur wurden die tiefgefrorenen Plasmaproben zunächst aufgetaut. 50 µL einer mit Deuterium-markierten internen Standardmischung (6.55 ng d₄-7α-OH-Campesterol, 4.41 ng d₄-7α-OH-Sitosterol, 12.67 ng d₄-7β-OH-Campesterol, 16.47 ng d₄-7β-OH-Sitosterol, 14.45 ng d₄-7-Keto-Campesterol und 23.74 ng d₄-7-Keto-Sitosterol) wurden bei Raumtemperatur zu 1 mL Plasma gegeben. Um die Entstehung von Artefakten durch Cholesterol und Phytosterole zu minimieren, wurden die Proben 5 Minuten mit Stickstoff begast. Für die **alkalische Hydrolyse** (Verseifung) wurden 2 mL einer 90%igen ethanolischen NaOH-Lösung (1M) zur Probe hinzugeben und bei Raumtemperatur und kontinuierlicher Bewegung vier Stunden unter Ausschluss von Licht gegeben. Nach Hinzugabe von 1 mL destilliertem Wasser wurde der pH-Wert der Probe durch die weitere Zugabe von 210 µL Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure 85%: Aqua dest 1:1 (v/v)) auf pH 7.0 eingestellt. Anschließend wurde noch 2 mL Natriumchlorid-Lösung (9 mg/mL) hinzugegeben. Die **Extraktion** der Oxyphytosterole wurde mit 2*3 mL Dichlormethan (Lösungsmittel) wie folgt durchgeführt. Die Probe wurde zunächst für 30 Sekunden durchmischt, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation (2000 min⁻¹ x g). Im Anschluss wurde die Dichlormethan-Phase in ein neues Reagenzglas überführt. Die organische Phase wurde in Dunkelheit belassen und der Extraktionsprozess ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss wurden die vereinigten organischen Phasen unter Stickstoffbegasung bei 65°C verdampft und der trockene Rückstand in 1 mL n-Hexan gelöst.

Oxysterole und Oxyphytosterole wurden daraufhin durch eine **Festphasen-Extraktion** von Cholesterol und Phytosterolen getrennt. Die Kieselgel-Kartuschen wurden mit 3 x 1 mL n-Hexan äquilibriert. Im Anschluss wurden die Proben auf die Säule gegeben und mittels Schwerkraft durch die Säule befördert. Die Auswaschung der neutralen Sterole, Cholesterol und Phytosterole, erfolgte mit Hilfe von 8 x 1 mL 0,5% 2-Propanol-Lösung (in n-Hexan, v/v). Die Oxyphytosterole wurden von der Säule mittels 3 x 1 mL 30%iger 2-Propanol-Lösung (in n-Hexan, v/v) gewaschen. Die **Derivatisierung der Hydroxylgruppen der Oxyphytosterole zu ihren TMSi-Ethern** wurde nach Zugabe von 1 mL Trimethylsilylierungsreagenz (Pyridin-Hexamethyldisilazan-Trimethylchlorsilan 9:3:1, v/v/v) bewirkt. Die TMS-Reaktion wurde durch 1,5-stündige Inkubation bei 90°C durchgeführt. Infolgedessen wurden die restlichen Reagenzien unter Stickstoffbegasung verdampft und der Rückstand in 30 µL n-Dekan gelöst und 10 µL TMS hinzugegeben. Das resultierende Gemisch wurde für die GC-MSD-Analyse in die Mikroinsätze der Glasphiolen übertragen. Zur eindeutigen Identifizierung erfolgte wiederum die genaue Beschriftung der Glasphiolen.

Zur Ermittlung der Oxyphytosterolkonzentrationen in den **Aortenklappen** wurde das Klappengewebe zunächst für 48 Stunden in Folch-Reagenz (Chloroform/Methanol im Verhältnis 3:1, mit 0.25 mg/mL BHT) gegeben. 2 mL dieses Extrakts wurden zum deuterierten internen Standard hinzugefügt und in Analogie zu der Probenaufbereitung des Plasmas verfahren.⁴⁰

3.2.4 Beschreibung der Analyseverfahren

Die Gaschromatographie diente zunächst der Auftrennung und Identifizierung der Sterole und Oxyphytosterole aus den Probe. Für die genaue qualitative und quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten des Stoffgemisches erfolgte im Anschluss die Kopplung mit zwei verschiedenen Detektionssystemen. Im Plasma kommt Cholesterol im Gegensatz zu den Cholesterolvorstufen sowie pflanzlichen Sterolen in 10^3 -fach höherer Konzentration vor. Im Vergleich zu den oxidierten pflanzlichen Sterolen liegt Cholesterol in 10^6 -fach höherer Konzentration vor. Aus diesem Grund wurde für die Analyse des Cholesterols die weniger spezifische aber robustere Methode der Flammenionisationsdetektion (FID) verwendet. Cholesterolvorstufen, Phytosterole sowie Oxyphytosterole wurden hingegen mit der sensitiveren, hochselektiven und hochspezifischen massenselektiven Detektion (MSD) bestimmt.

Für die Evaluation der Sterolkonzentrationen im Probenmaterial wurde zudem für die verschiedenen Sterole jeweils eine Standardkurve erstellt. Die Quantifizierung der einzelnen Eichpunkte der verschiedenen Sterole oder Oxyphytosterole erfolgte mittels Flammenionisationsdetektion gegen 5 α -Cholestan (Interner Standard; ISTD).

3.2.5 Durchführung der Analysen

3.2.5.1 Analyse der neutralen Sterole

3.2.5.1.1 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion

Für die Trennung des Steroltrimethylsilylethergemisches mittels gaschromatographischer Flammenionisationsdetektion wurde das Analysat nach splittloser Injektion durch einen HP 7683 Injektor bei 280°C gasförmig auf eine vernetzte Methylsilikon DB-XLB 122-12322 Kapillarsäule (J&W, Folsom, USA) (30 m x 0,25 mm Innendurchmesser x 0,25 μ m Schichtdicke) in einem Hewlett Packard Gaschromatographen (HP 6890) aufgebracht. Als

Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flussrate von 1.1 mL/min. Zu Beginn der Säule kondensierten die verschiedenen Sterolether. Die Ofentemperatur wurde zunächst 3 min bei 150°C belassen und anschließend mit einer Steigerungsrate von 30°C/min bis zu einer Zieltemperatur von 290°C erhöht, welche für 33 min konstant gehalten wurde. Bei einem für die verschiedenen Sterolether charakteristischen Siedepunkt wurden die Substanzen wieder von dem Säulenmaterial gelöst und mittels Gasfluss zum Detektor getragen. Im Flammenionisationsdetektor wurden die Sterolether verbrannt und die ionisierten Fragmente in eine elektronische Ladung übertragen und aufgezeichnet. Die Detektion des internen Standards 5 α -Cholestan erfolgte mit einer Retentionszeit von 12,0 min und der Cholesteroltrimethylsilylether mit einer Retentionszeit von 15,88 min im Flammenionisationsdetektor (FID) bei 280°C. Dabei lag ein kombinierter konstanter Säulen- und Make-up-Fluss (Wasserstoff + Stickstoff, 30 mL/min) vor. Der Gaschromatograph, die Auswertung der Gaschromatogramme und die Quantifikation wurden mittels Software GC Chem Station Rev. B 02.01-SR1 [260] Agilent Technologies des Computer Intel(R) Pentium(R) 4 CPU 2,8 GHz 2,79GHz 512MB RAM gesteuert¹¹⁹.

Die Quantifizierung von Cholesterol erfolgte durch Division des integrierten Flächeninhalts des Cholesterolpeaks durch den Flächeninhalt des 5 α -Cholestanpeaks und Multiplikation mit dem vorgegebenen Gehalt des internen Standards (50 μ g). Dabei wurde der Cholesterolgehalt der Probe in μ g angegeben. Da das Probenvolumen 100 μ L betrug, konnte man direkt in mg/100 mL bzw. mg/dL umrechnen. Die Aufbewahrung der Stammlösung wurde bei 4°C unter Lichtausschluss gewährleistet und die Validierung der Pipetten sowie Wägeeinheiten erfolgte turnusmässig¹¹⁹.

3.2.5.1.2 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-massenselektive Detektion

Die Sterolsilylgemische wurden zunächst auf einer 30 m DB-XLB Kapillarsäule unter Verwendung von Helium als Trägergas mit einem Trägergasfluss von 1,0 mL/min säulenchromatographisch aufgetrennt. Das Temperaturprogramm wurde mit einer Temperatur von 150°C gestartet und steigerte sich nach 1 min mit einer Anstiegsrate von 30°C/min. Die Zieltemperatur betrug 290°C und wurde für 30 min belassen. Die Voreinstellung der Injektor- sowie Transferlinetemperatur lag bei 280°C und die Multiplierspannung wurde auf 2700V justiert. Die Elektronenimpakt-Ionisationsspannung lag bei 70eV. Die Regulation des Selected-Ion-Monitorings (SIM) erfolgte so, dass die Quadrupolmassenfilter innerhalb der gewählten m/z-Werte (spezifische Masse) eine Rate von 2,0 Zyklen pro Sekunde aufwies. Zwecks Optimierung der Analyseleistung wurde vor

jeder größeren Analysesequenz eine automatische Selbstjustierung vorgenommen, das sog. Autotune. Der SIM-Modus startete bei einem m/z-Wert von 370 für Epicoprostanol. Die spezifischen Retentionszeiten und die charakteristischen Massenfragmente (m/z Wert) der gemessenen Substanzen sind Tabelle 2 dargestellt.

TMSi-Ether	Kategorie	m/z Werte	Retentionszeit [min]
Epicoprostanol	ISTD	370	14,205
Cholestanol	Cholesterolmetabolit	306,460	15,71
Lathosterol	Cholesterolvorstufe	458	16,70
Campesterol	Phytosterol	472	17,39
Sitosterol	Phytosterol	486	19,25

Tabelle 2: Retentionszeiten und charakteristische Massenfragmente (m/z Werte) für die Detektion der Trimethylsilylsterol- und stanolether durch GC-MSD, modifiziert nach¹¹⁹.

Für die Beurteilung der Linearität der integrierten Peakfläche und eingesetzten Substanzkonzentration, wurde für jedes zu ermittelnde Sterol eine eigene Eichgerade angefertigt. Linearität war die Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung. Durch die GC-MSD im SIM-Modus erfolgte die Messung steigender Mengen an Sterolen, denen je gleiche Mengen an Epicoprostanol für die Bestimmung der Cholesterolvorstufen und pflanzlichen Sterole zugesetzt wurden. Daraufhin wurde das Verhältnis der Peakfläche des unmarkierten zu der des jeweiligen internen Standards berechnet und mit Hilfe der Geradengleichung konnten die Konzentrationen berechnet werden. Für die **Identifizierung** der jeweiligen Substanzen wurde die Identität der Massenspektren aller Substanzen - ermittelt durch GC-MSD-SIM aus den Plasmaproben - mit den Massenspektren der authentischen Referenzsubstanzen verglichen und bestätigt. Substanzen bei denen keine eindeutige gaschromatographische Trennung möglich war, konnten auf Basis ihrer spezifischen Massen voneinander differenziert und nachfolgend gemessen werden. Für die Überprüfung der **Linearität**, der **Spannweite** sowie der **Quantifizierungsgrenze** (QG) der Eichkurven jeder einzelnen Substanz ergaben sich die in Tabelle 3 aufgeführten charakteristischen Eigenschaften¹¹⁹.

Analyt	Achsenabschnitt	Steigung	R ²	Spannweite [ng/mL]	QG [µg/dL]
Cholestanol	- 0,0002	0,1486	0,9999	0,04 - 9,0	0,02
Lathosterol	- 0,004	0,760	0,9999	0,01 - 3,2	0,02
Campesterol	- 0,0025	0,2451	0,9999	0,02 - 55,6	0,02
Sitosterol	- 0,0056	0,2221	0,9999	0,35 - 83,9	0,06

Tabelle 3: Eichgeradearakteristika und Nachweisgrenzen, modifiziert¹¹⁹.

3.2.5.2 Analyse der Oxyphytosterole

3.2.5.2.1 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion

Für die Quantifikation der Oxyphytosterole in der Standard Kurve mittels gaschromatographischer Flammenionisationsdetektion wurden die Substanzen nach splittloser Injektion durch einen HP 7683 Injektor bei 280°C auf einer vernetzen Methylsilikon DB-XLB 122-12322 Kapillarsäule (J&W, Folsom, USA) (30 m x 0,25 mm Innendurchmesser x 0,25 µm Schichtdicke) in einem Hewlett Packard Gaschromatographen (HP 6890) aufgetrennt. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flussrate von 1,1 mL/min. Die Ofentemperatur wurde 3 min bei 150°C belassen und anschließend mit einer Steigerungsrate von 30°C/min bis zu einer Zieltemperatur von 290°C erhöht, welche für 22,33 min konstant gehalten wurde. Die Steuerung des Gaschromatographen wurde durch die Software GC Chem Station Rev. B 02.01-SR1 [260] Agilent Tehnologies des Computer Intel(R) Pentium(R) 4 CPU 2,8 GHz 2,79GHz 512MB RAM durchgeführt. Die Proben wurden durch einen automatischen Sampler Typ 7683 Auto Sampler und Injektor (HP) injiziert. Die Quantifizierung beinhaltete den internen Standard und das Ergebnis der Oxyphytosterole.⁴⁰ Der interne Standard, 5α-Cholestan, wurde mit einer Retentionszeit von 12,0 min und das TMS-Derivat - 7α-OH-Campesterol - mit einer Retentionszeit von 16,42 min im Flammenionisationsdetektor (FID) bei 280°C detektiert. Dabei lag ein kombinierter konstanten Säulen- und Make-up-Fluss (Wasserstoff + Stickstoff) vor. In Abbildung 9 ist eine gaschromatographische Trennung vom internen Standard 5α-Cholestan und den Oxyphytosterol-TMSi-Ethern - 7α- OH-Campesterol, 7β-OH-Campesterol, 7α-OH-Sitosterol, 7β-OH-Sitosterol, 7-Keto-Campesterol und 7-Keto-Sitosterol - dargestellt. Für die Quantifizierung wurde der integrierte Flächeninhalt des Oxyphytosterolpeaks durch den Flächengehalt des 5α-Cholestanpeaks dividiert und mit dem vorgegebenen Gehalt an internem Standard von 50 µg multipliziert. Das Ergebnis über den Gehalt der Oxyphytosterole wurde letztlich in ng angegeben.

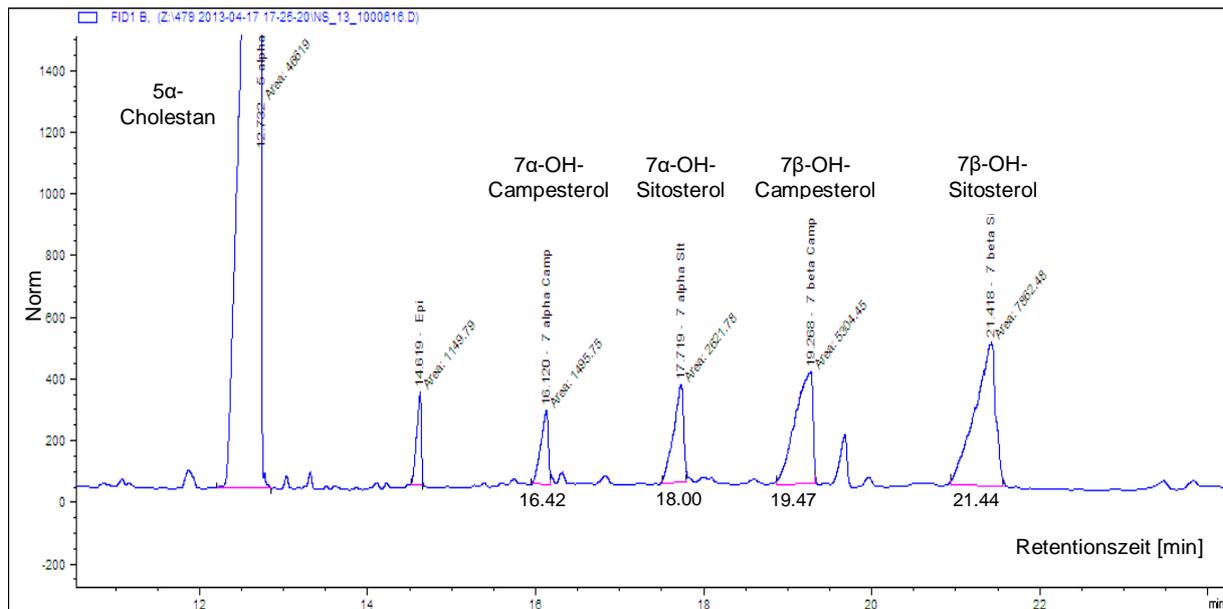


Abbildung 9: Gaschromatogramm eines Plasmasterolgemisches zur Quantifizierung von Oxyphytosterolen in der Standardkurve mittels GC-FID.

3.2.5.2.2 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-massenselektiver Detektion

Die säulenchromatographische Trennung der Oxyphytosterole in den Verdünnungsreihen der Standardkurve sowie im Probenmaterial erfolgte auf einer 30 m DB-XLB Kapillarsäule (J&W, Folsom, USA) unter Verwendung von Helium als Trägergas mit einer konstanten Flussrate von 0,8 mL/min. Die splittlose Injektion der Probe erfolgt bei 270°C mit einem Injektionsvolumen von 2 µL. Das Temperaturprogramm startete mit einer Temperatur von 150°C und steigerte sich nach 3 min mit einer Anstiegsrate von 30°C/min auf 290°C. Die gesamte Messdauer betrug 34 min. Die Injektor- sowie Transferlinientemperatur wurden auf 280° festgelegt und die Multiplierspannung auf 1400V eingestellt. Die Elektronenimpaktionsspannung lag bei 70eV. Das Selected-Ion-Monitoring (SIM) wurde so adjustiert, dass die Quadrupolmassenfilter innerhalb der gewählten m/z-Werte (charakteristischen Massenfragmente) mit einer Rate von 2,0 Zyklen pro Sekunde arbeiteten. Vor jeder Analysesequenz wurde zum Zweck der Optimierung der Analyseleistung eine automatische Selbstjustierung, das sog. Autotune, durchlaufen. Die TMS-Ether (7α-OH-Campesterol, 7α-OH-Sitosterol, 7β-OH-Campesterol, 7β-OH-Sitosterol, 7-Keto-Campesterol und 7-Keto-Sitosterol) wurden im Selected-Ion-Monitoring (SIM) Modus mittels der GC-MSD identifiziert. Die spezifischen Retentionszeiten und die charakteristischen Massenfragmente (m/z Wert) der gemessenen Substanzen sind in Tabelle 4 aufgeführt⁴⁰.

Oxyphytosterole	Kategorie	m/z Werte	Retentionszeit [min]
d ₄ -7 α -OTMS-Campesterol	ISTD	474.4	15.486
7 α -OTMS-Campesterol	OPS	470.4	15.535
d ₄ -7 α -OTMS-Sitosterol	ISTD	488.6	16.91
7 α -OTMS-Sitosterol	OPS	484.5	16.972
d ₄ -7 β -OTMS-Campesterol	ISTD	474.5	18.22
7 β -OTMS-Campesterol	OPS	470.5	18.308
d ₄ -7 β -OTMS-Sitosterol	ISTD	488.6	20.088
7 β -OTMS-Sitosterol	OPS	484.4	20.181
d ₄ -7-Keto-Campesterol	ISTD	491.5	26.421
7-Keto-Campesterol	OPS	486.5	26.571
d ₄ -7-Keto-Sitosterol	ISTD	505.6	29.999
7-Keto-Sitosterol	OPS	500.5	30.173

Tabelle 4: Retentionszeiten und charakteristische Massenfragmente (m/z Werte) für die Detektion der Trimethylsilyl ether der Oxyphytosterole und deuterierten Oxyphytosterole durch GC-MSD.

ISTD = interner Standard, OPS = oxidierte Phytosterole

Die Darstellung des GC-MS Totalionenchromatogramms (TIC) des höchst konzentrierten Kalibrierpunktes der Kalibrierkurve ist in Abbildung 10 aufgeführt. Die charakteristischen Massenfragmente (m/z Werte) der TMS-Ether der Oxyphytosterole (d₀) mit korrespondierendem deuterierten, internen Standard (d₄) sind in Abhängigkeit von der Retentionszeit abgebildet. Für die quantitative Bestimmung der Oxyphytosterole im Probenmaterial, wurde zunächst für jedes zu ermittelnde Oxyphytosterol eine eigene Kalibriergerade - anhand einer Verdünnungsreihe - angefertigt. Am Beispiel von 7 α -OH-Campesterol soll dies exemplarisch veranschaulicht werden. Durch die GC-MSD im SIM-Modus (Abb. 11) erfolgte die Messung steigender Mengen von 7 α -OH-Campesterol, denen je gleiche Mengen an d₄-7 α -OH-Campesterol zugesetzt wurden. Daraufhin wurde das Verhältnis der Peakfläche des Analyten zu der Peakfläche des internen Standards berechnet. Anhand acht ermittelter Punkte, deren Gehalt an Analyt bekannt war, wurde eine Kalibriergerade erstellt, deren Geradengleichung berechnet werden konnte. Der von einer Probe unbekanntes Gehalts erhaltene Quotient aus der Fläche des Analyten durch die Fläche des internen Standards konnte nun in die erhaltende Geradengleichung eingesetzt werden. Durch anschließende Umformung der Gleichung konnte die unbekanntes Konzentration ermittelt werden.

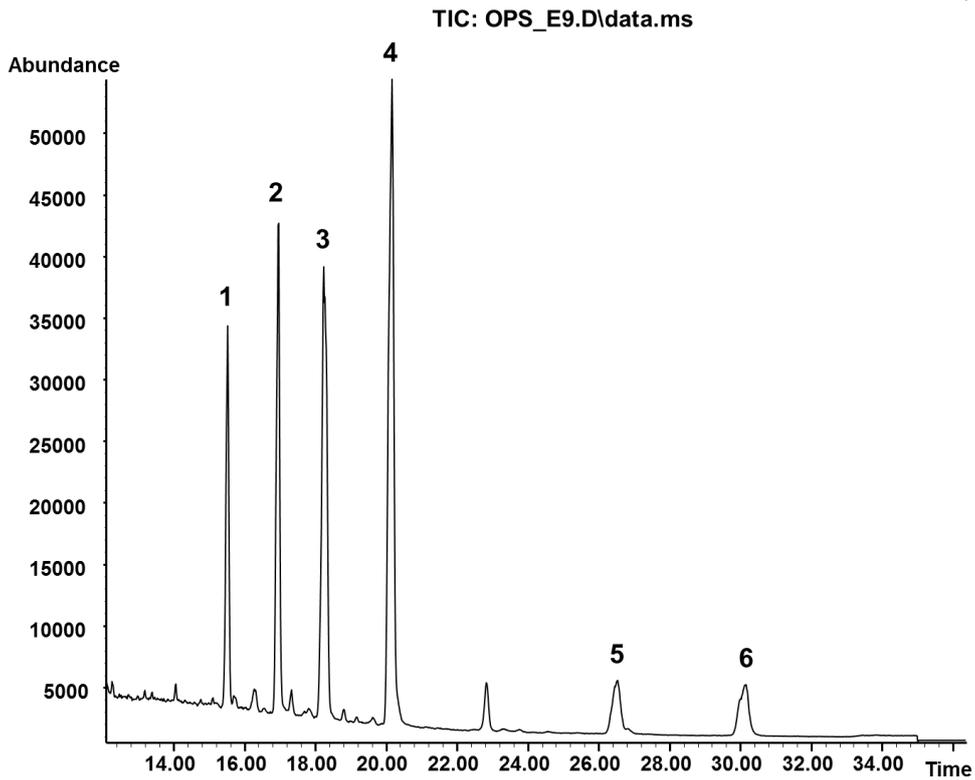


Abbildung 10: GC-MS Totalionenchromatogramm (TIC) der Trimethylether der Oxyphytosterole (d_0) mit internem Standard (d_4) einer Standardkurve (Isotopenverdünnungsverfahren): (1) d_4/d_0 -7 α -OH-Campesterol, (2) d_4/d_0 -7 α -OH-Sitosterol, (3) d_4/d_0 -7 β -OH-Campesterol, (4) d_4/d_0 -7 β -OH-Sitosterol, (5) d_4/d_0 -7-Keto-Campesterol, (6) d_4/d_0 -7-Keto-Campesterol.

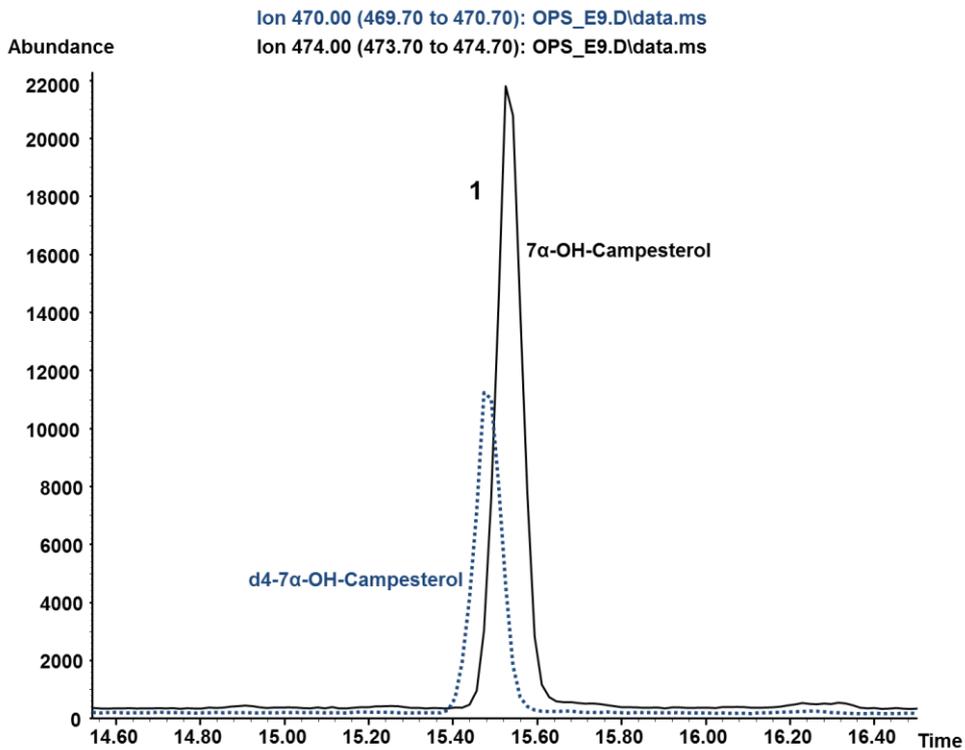


Abbildung 11: GC-MS Chromatograph einer Standardkurve im SIM-Modus von 7 α -OH-Campesterol und d_4 -7 α -OH-Campesterol.

Die Darstellung des GC-MS Totalionenchromatogramms einer authentischen Herzklappenprobe eines Studienteilnehmers ist in Abbildung 12 aufgeführt. Dabei wurde die Summe aller Signale, welche von den detektierten Ionen im vorliegenden Spektrum hervorgerufen wurde, im TIC aufgezeichnet. Da dies zur Signalüberlagerung der Massenfragmente einzelner Verbindungen führte, war für Identifikation und Quantifikation der TMS-Ether die Analyse im SIM-Modus erforderlich. In Abbildung 13 sind exemplarisch 7α -OH-Campesterol und 7β -OH-Campesterol mit ihren korrespondierenden deuterierten, internen Standards (d_4) im SIM-Modus dargestellt. Für die Bestimmung der Konzentrationen der Oxyphytosterole wurde die zuvor ermittelte Kalibriergerade jedes einzelnen Oxyphytosterols verwendet.

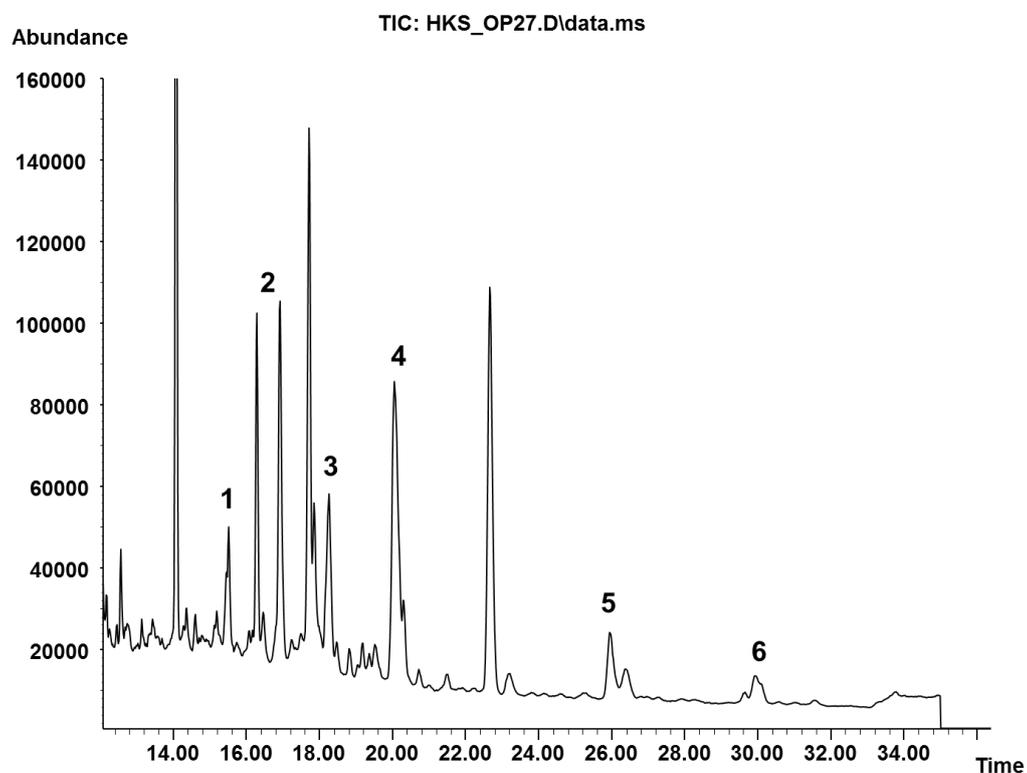


Abbildung 12: GC-MS Totalionenchromatogramm (TIC) der Trimethylether der Oxyphytosterole (d_0) mit internem Standard (d_4) einer authentischen Klappenprobe (Isotopenverdünnungsverfahren): (1) d_4/d_0 - 7α -OH-Campesterol, (2) d_4/d_0 - 7α -OH-Sitosterol, (3) d_4/d_0 - 7β -OH-Campesterol, (4) d_4/d_0 - 7β -OH-Sitosterol, (5) d_4/d_0 -7-Keto-Campesterol, (6) d_4/d_0 -7-Keto-Campesterol.

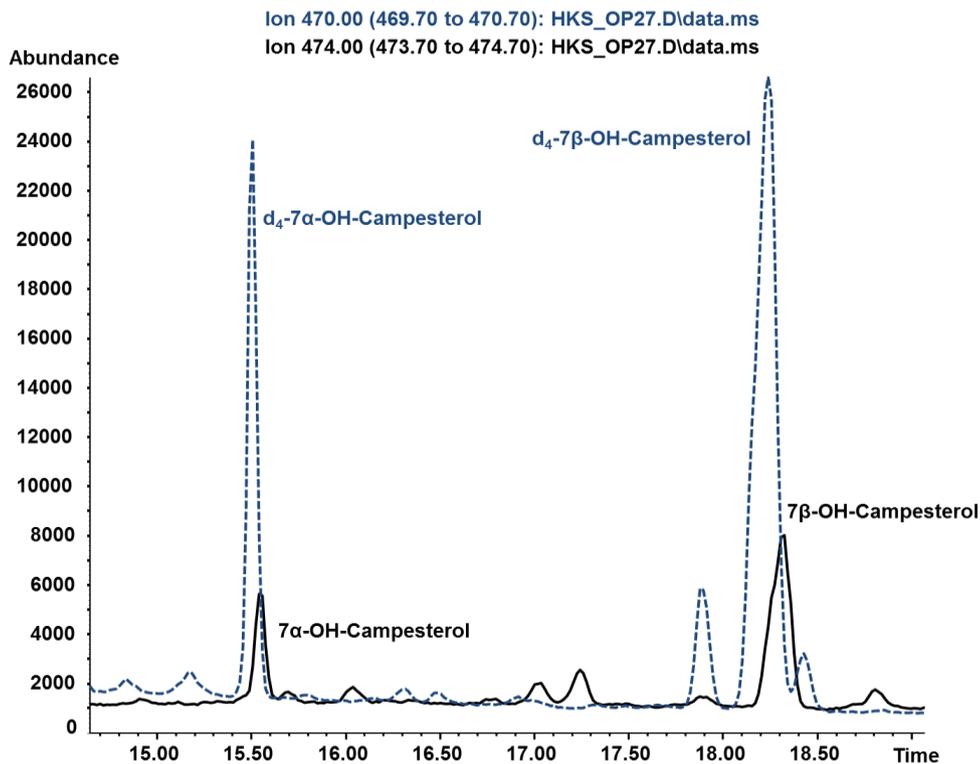


Abbildung 13: GC-MS Chromatograph einer authentischen Herzklappenprobe im SIM-Modus von 7 α -OH-Campesterol und d4-7 α -OH-Campesterol sowie 7 β -OH-Campesterol und d4-7 β -OH-Campesterol.

Die Validierung der Messmethode der Oxyphytosterole erfolgte nach Husche et al.⁴¹ und zeigte, dass die Methode empfindlich, genau und präzise war sowie geeignet für die vorliegenden Messungen.

Für die **Identifizierung** der jeweiligen Substanzen wurde die Identität der Massenspektren aller Substanzen mit den Massenspektren der authentischen Referenzsubstanzen verglichen und bestätigt. Substanzen bei denen keine eindeutige gaschromatographische Trennung möglich war, konnten auf Basis ihrer spezifischen Massen voneinander differenziert und nachfolgend quantifiziert werden. Für die Überprüfung der **Linearität**, der **Spannweite** sowie **Quantifizierungsgrenze** (QG) jeder einzelnen Substanz ergaben sich die folgenden Charakteristika:

Oxyphytosterole	Kalibrierungskurve	R ²	Spannweite [ng/mL]	QG [pg/mL]
7 α -OH-Campesterol	$y = 0.690x + 0.202$	0.9987	0.005 - 1.302	23
7 α -OH-Sitosterol	$y = 0.467x + 0.236$	0.9995	0.009 - 2.423	34
7 β -OH-Campesterol	$y = 0.230x + 0.201$	0.9995	0.035 - 6.919	53
7 β -OH-Sitosterol	$y = 0.198x + 0.226$	0.9988	0.014 - 4.075	51
7-Keto-Campesterol	$y = 0.212x + 0.256$	0.9953	0.017 - 5.018	591
7-Keto-Sitosterol	$y = 0.054x + 0.180$	0.9938	0.065 - 42.17	812

Tabelle 5: Eichgeradeparameter und Nachweisgrenzen, modifiziert nach⁴¹.

3.2.6 Evaluierung einer begleitenden KHK

Vor dem operativen Aortenklappenersatz mussten sich die Patienten einer Reihe von diagnostischen Verfahren unterziehen. Die Koronarangiographie diente der Beurteilung einer gleichzeitig bestehenden koronaren Herzkrankheit. Als pathologisch wurden Gefäße mit einer mindestens 50%igen Stenose diagnostiziert. Der Schweregrad der KHK (Ein-, Zwei- oder Dreigefäßerkrankung) wurde anhand des Koronarangiogramms bewertet.

3.2.7 Evaluierung des Ausmaßes einer Aortenklappenstenose

Für die Evaluation des Schweregrads der Aortenklappenstenose wurde im präoperativen Verlauf die Klappenöffnungsfläche mithilfe der Echokardiographie bestimmt. Die Kontinuitätsgleichung diente der Berechnung der Öffnungsfläche der Aortenklappe⁹⁸.

3.2.8 Statistische Methoden

Die dargestellten Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung des Unterschieds zwischen zwei Gruppen wurde mithilfe des ungepaarten, zweiseitigen Student-t-Tests erhoben. Die Testung auf Unterschiedlichkeit zwischen mehr als zwei Gruppen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgender Korrektur nach Bonferroni. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson diente der Quantifikation von Korrelationen zweier Variablen. Alle statistischen Verfahren wurden unter Verwendung des Statistikprogramms - IBM SPSS Statistics 21 (Chicago, Illinois, USA) - vorgenommen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Patientencharakteristika

In die vorliegende Studie wurden im Beobachtungszeitraum von April 2011 bis August 2012 105 Patienten einbezogen. Eine Patientin konnte aufgrund ihres erheblich von der Grundgesamtheit der Studienpopulation abweichenden Lipidprofils nicht berücksichtigt werden und wurde aus der Analyse ausgeschlossen. Die Charakteristika der Studienpopulation sind in Tabelle 6 dargestellt.

Patientenkollektiv n = 104	
Demografische Daten	
Alter [in Jahren]	69,8 ± 10,3
Geschlecht	
Frauen	36 (34,6%)
Männer	68 (65,4%)
Risikofaktoren	
Arterieller Hypertonus	85 (81,7%)
Diabetes mellitus	
Typ I	2 (1,9%)
Typ II	26 (25,0%)
Koronare Herzkrankheit	46 (44,2%)
Eingefäßerkrankung	17 (16,3%)
Zweigefäßerkrankung	15 (14,4%)
Dreigefäßerkrankung	14 (13,5%)
Rauchen	48 (46,2%)
Body Mass Index [kg/m ²]	28,4 ± 6,2
Positive Familienanamnese	22 (21,2%)
Kreatinin [mg/dL]	1,1 ± 0,4
Lipidmodifizierende Medikamente	
Statine	68 (65,4%)
Keine Statine	36 (34,6%)
Kardiale Parameter	
Klappenöffnungsfläche [cm ²]	0,77 ± 0,22
Peak-to-Peak-Gradient [mmHg]	51,9 ± 22,3
Delta P max [mmHg]	77,4 ± 24,8
Delta P mean [mmHg]	46,5 ± 15,2

Tabelle 6: Patientencharakteristika - „Gesamtpopulation der Studie“.

4.2 Messparameter und Quotienten

Mithilfe der gaschromatographischen Flammenionisationsdetektion und massenselektiven Detektion wurden Cholesterol, Cholesterolvorstufen, Phytosterole sowie Oxyphytosterole im Plasma und den Aortenklappen der Studienteilnehmer bestimmt.

Eine Übersicht über die quantifizierten Messparameter sowie berechneten Quotienten inklusive Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 7 in Abhängigkeit von Plasma und Klappe aufgeführt.

Parameter	Plasma		Klappe	
	Mittelwert ± Standardabweichung		Mittelwert ± Standardabweichung	
Gesamtcholesterol	187,4 ± 42,3	mg/dL	28,645 ± 14,587	µg/mg
Cholestanol	0,397 ± 0,120	mg/dL	65,208 ± 34,641	ng/mg
Lathosterol	0,175 ± 0,131	mg/dL	18,727 ± 12,117	ng/mg
Campesterol	0,366 ± 0,222	mg/dL	54,863 ± 37,741	ng/mg
Sitosterol	0,252 ± 0,150	mg/dL	42,573 ± 28,389	ng/mg
7α-OH-Campesterol	0,140 ± 0,184	ng/mL	0,058 ± 0,035	ng/mg
7α-OH-Sitosterol	0,066 ± 0,044	ng/mL	0,011 ± 0,006	ng/mg
7β-OH-Campesterol	0,220 ± 0,096	ng/mL	0,478 ± 0,030	ng/mg
7β-OH-Sitosterol	0,514 ± 0,190	ng/mL	0,018 ± 0,010	ng/mg
7-Keto-Campesterol	0,920 ± 0,339	ng/mL	0,271 ± 0,098	ng/mg
7-Keto-Sitosterol	2,486 ± 0,863	ng/mL	0,392 ± 0,126	ng/mg
Σ-OH-Campesterol	1,281 ± 0,485	ng/mL	0,376 ± 0,126	ng/mg
Σ-OH-Sitosterol	3,067 ± 1,044	ng/mL	0,422 ± 0,135	ng/mg
Σ-Oxyphytosterole	4,347 ± 1,433	ng/mL	0,798 ± 0,260	ng/mg

(A) Mittelwert und Standardabweichung der quantifizierten Messparameter in Plasma und Klappe

Quotienten	Plasma		Klappe	
	Mittelwert ± Standardabweichung		Mittelwert ± Standardabweichung	
Campesterol/Cholesterol	1,975 ± 1,120	µg/mg	1,927 ± 1,066	ng/µg
Sitosterol/ Cholesterol	1,354 ± 0,695	µg/mg	1,500 ± 0,699	ng/µg
Cholestanol/ Cholesterol	2,131 ± 0,437	µg/mg	2,339 ± 0,481	ng/µg
Campesterol/Lathosterol	3,585 ± 3,949	mg/mg	3,738 ± 3,531	ng/ng
Sitosterol/Lathosterol	2,426 ± 2,580	mg/mg	2,851 ± 2,377	ng/ng
Cholestanol/Lathosterol	3,711 ± 3,023	mg/mg	4,421 ± 2,620	ng/ng
7α-OH-Campesterol/ Cholesterol	0,077 ± 0,118	ng/mg	2,315 ± 1,534	ng/mg
7α-OH-Sitosterol/ Cholesterol	0,036 ± 0,022	ng/mg	0,461 ± 0,249	ng/mg
7β-OH-Campesterol/ Cholesterol	0,122 ± 0,057	ng/mg	1,861 ± 1,223	ng/mg
7β-OH-Sitosterol/ Cholesterol	0,285 ± 0,113	ng/mg	0,702 ± 0,338	ng/mg
7-Keto-Campesterol/ Cholesterol	0,507 ± 0,177	ng/mg	11,945 ± 7,096	ng/mg
7-Keto-Sitosterol/ Cholesterol	1,377 ± 0,500	ng/mg	16,771 ± 8,552	ng/mg
Σ OH-Campesterol/ Cholesterol	0,705 ± 0,264	ng/mg	16,120 ± 8,887	ng/mg
Σ OH-Sitosterol/ Cholesterol	1,698 ± 0,608	ng/mg	17,934 ± 8,853	ng/mg
Σ Oxyphytosterol/ Cholesterol	2,403 ± 0,818	ng/mg	34,055 ± 17,361	ng/mg

(B) Mittelwert und Standardabweichung der Quotienten der quantifizierten Messparameter in Plasma und Klappe

Tabelle 7: Übersicht über die quantifizierten Messparameter (A) und berechneten Quotienten (B).

4.3 Zusammenhang zwischen Phytosterolen und Oxyphytosterolen in Plasma und Klappe

Die Bestimmung der Konzentrationen von Sterolen und Oxyphytosterolen in der Aortenklappe erfolgte nach Separation der verkalkten Anteile der atherosklerotischen Plaques. Mithilfe dieser Calcium-Trenntechnik konnte gezeigt werden, dass Cholesterol- und Phytosterolkonzentrationen (pro Gewicht) in verkalkten Anteilen der atherosklerotischen Plaques etwa 25-88% niedriger sind im Vergleich zum Klappengewebe. Der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen verschiedener Phytosterole im Plasma, in der Klappe sowie zwischen Plasma und Klappe, ebenso wie der Zusammenhang der Phytosterole zu ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten, wurde mithilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt.

4.3.1 Zusammenhang der Phytosterole zwischen Plasma und Klappe

In der Untersuchungsstichprobe ließ sich im Plasma der Patienten eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen von Campesterol und Sitosterol beobachten ($r = 0,911$, $p < 0,001$; Abb.14A). Des Weiteren zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Campesterol- und Sitosterolkonzentrationen in der Aortenklappe ($r = 0,945$, $p < 0,001$; Abb.14B).

Zwischen Plasma und Klappe zeigte sich eine schwache Korrelation der Phytosterole (Campesterol: $r = 0,488$, $p < 0,001$; Sitosterol: $r = 0,350$, $p < 0,001$; Abb.14C/D).

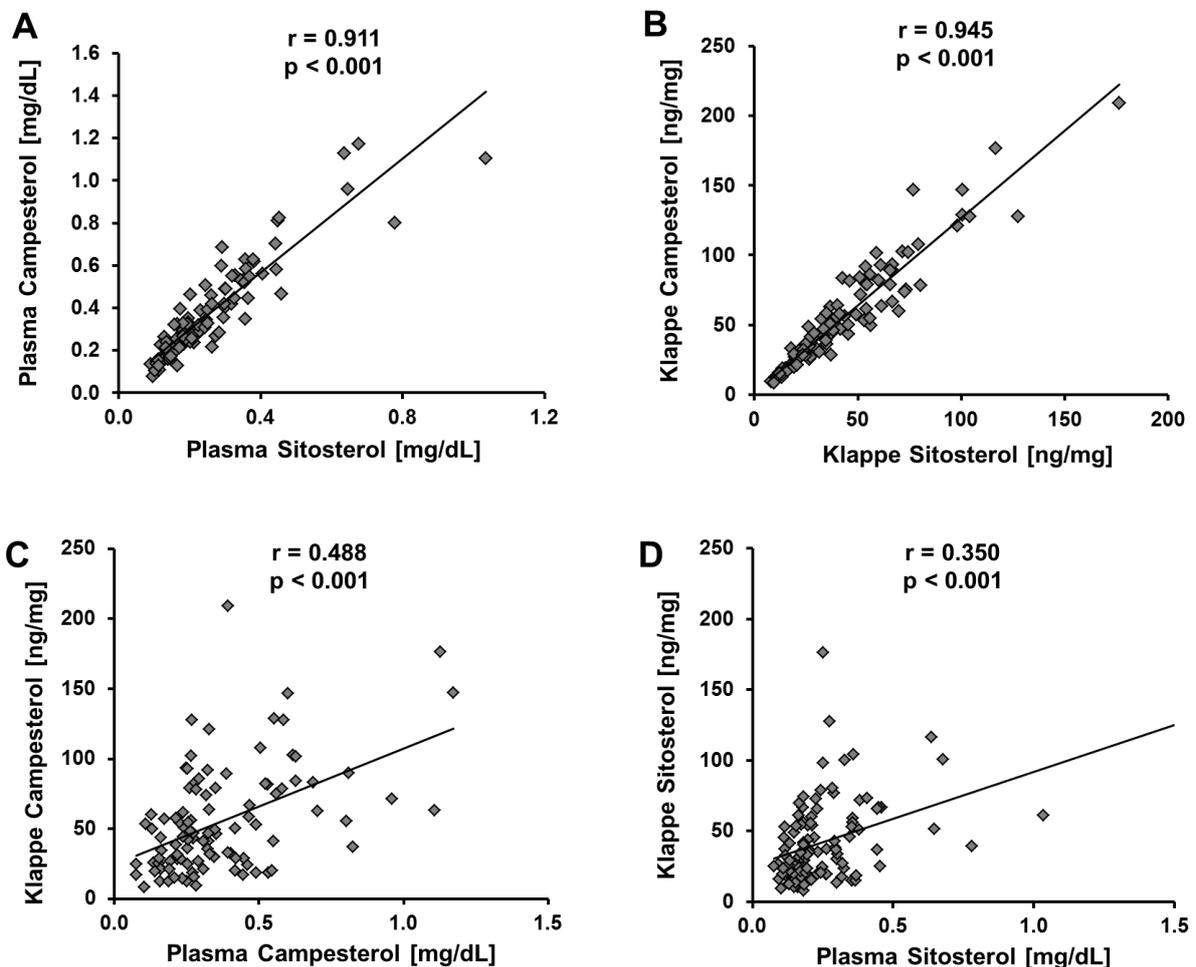


Abbildung 14: Korrelationen von Campesterol und Sitosterol im Plasma (A) und in der Klappe (B); Korrelationen von Campesterol zwischen Plasma und Klappe (C) und Sitosterol zwischen Plasma und Klappe (D).

4.3.2 Zusammenhang der Oxyphytosterole zwischen Plasma und Klappe

In den Aortenklappen der Untersuchungsstichprobe war eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen von Campesterol und der Summe der oxidierten Campesterole festzustellen ($r = 0,712$, $p < 0,001$, Abb.15A). Dabei lagen im Einzelnen die Korrelationen zwischen Campesterol und 7α -OH-Campesterol bei $r = 0,602$ ($p < 0,001$), 7β -OH-Campesterol bei $r = 0,629$ ($p < 0,001$) und 7-Keto-Campesterol bei $r = 0,637$ ($p < 0,001$). Die Korrelation der Sitosterolkonzentrationen mit der Summe der korrespondierenden Oxyphytosterole war ebenfalls signifikant ($r = 0,706$, $p < 0,001$; Abb.15B) und lag im Bereich von $r = 0,600$ ($p < 0,001$) für 7α -OH-Sitosterol, $r = 0,726$ ($p < 0,001$) für 7-Keto-Sitosterol und $r = 0,673$ ($p < 0,001$) für 7β -OH-Sitosterol.

Ein schwacher Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Campesterol und der Summe der oxidierten Campesterole war im Plasma zu beobachten ($r = 0,243$, $p < 0,05$; Abb.15C). Zwischen der Sitosterolkonzentration und den korrespondierenden Oxidationsprodukten ließ sich im Plasma lediglich eine schwache Korrelation feststellen. (Sitosterol: $r = 0,317$, $p < 0,05$; Abb.15D). Es zeigte sich keine Korrelation der Summe der oxidierten Campesterole zwischen Plasma und Klappe (Σ -OH-Campesterole: $r = 0,128$, $p = 0,199$, Abb. 15E). Lediglich eine schwache Korrelation war für die Summe der oxidierten Sitosterole zwischen Plasma und Klappe zu beobachten (Σ -OH-Sitosterole: $r = 0,215$, $p < 0,05$; Abb.15F).

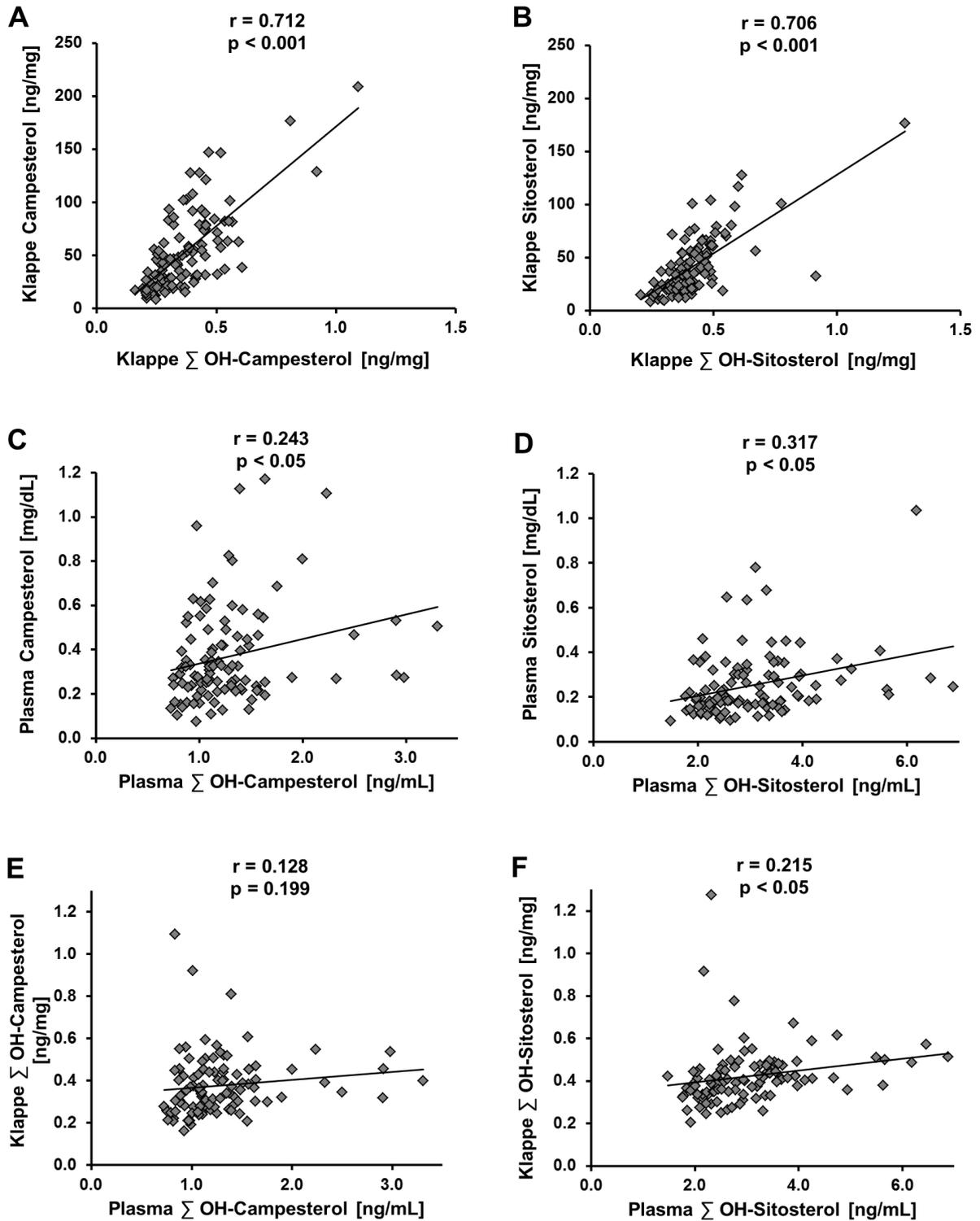


Abbildung 15: Korrelation der Phytosterole mit den korrespondierenden Oxyphytoosterolen in der Klappe (A,B) und im Plasma (C,D); Korrelation der Oxyphytoosterole zwischen Plasma und Klappe (E,F).

4.4 Beziehung zwischen Plasmacholesterol und Statinen

Die Analyse der Mittelwerte mittels Student-t-Test zeigte bei Patienten mit Statineinnahme im Vergleich zu Patienten ohne Statineinnahme eine 21,4 % geringere Cholesterolkonzentration im Plasma (Statine: $174,49 \pm 38,30$ vs. ohne Statine $211,75 \pm 38,97$; $t = 4,69$, $df = 102$, $p < 0,001$; Abb.16).

Für das Vorläufermolekül Lathosterol konnte eine 52,2 % geringere Plasmakonzentration bei Patienten mit Statinmedikation beobachtet werden (Statine: $0,14 \pm 0,11$ vs. ohne Statine: $0,23 \pm 0,14$; $t = 3,35$, $df = 102$, $p = 0,001$).

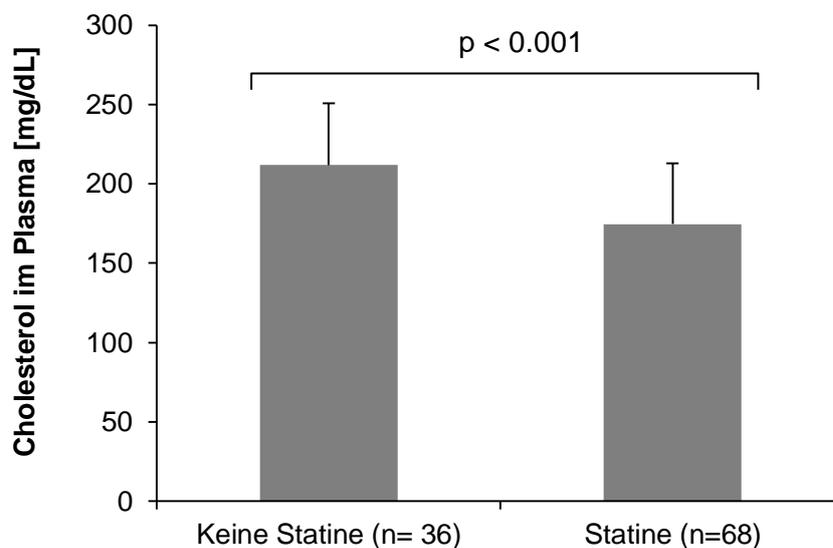


Abbildung 16: Cholesterolkonzentration im Plasma [mg/dL] in Abhängigkeit von der Medikation.

Um die Ergebnisse der Analyse unabhängig von dem Einfluss der Statinmedikation beurteilen zu können, wurde neben der Betrachtung der Gesamtpopulation der Studie eine Subgruppenanalyse der Patienten ohne Statine durchgeführt.

Die Patientencharakteristika der Subgruppe - „Patienten ohne Statine“ sind in Tabelle 8 dargestellt.

Patienten ohne Statine (n =36)	
Demografische Daten	
Alter [in Jahren]	67,56 ± 11,0
Geschlecht	
Frauen	16 (44,4%)
Männer	20 (55,6%)
Risikofaktoren	
Arterieller Hypertonus	26 (72,2%)
Diabetes mellitus	
Typ I	0 (0%)
Typ II	7 (19,4%)
Koronare Herzkrankheit	7 (19,4%)
Eingefäßerkrankung	2 (5,6%)
Zweigefäßerkrankung	2 (5,6%)
Dreigefäßerkrankung	3 (8,3%)
Rauchen	15 (41,7%)
Body Mass Index [kg/m ³]	28,1 ± 4,5
Positive Familienanamnese	9 (25,0%)
Kreatinin [mg/dL]	1,0 ± 0,4
Kardiale Parameter	
Klappenöffnungsfläche [cm ²]	0,77 ± 0,29
Peak-to-Peak-Gradient [mmHg]	54,6 ± 24,0
Delta P max [mmHg]	78,6 ± 33,7
Delta P mean [mmHg]	47,6 ± 19,5

Tabelle 8: Patientencharakteristika der Subgruppe - „Patienten ohne Statine“.

4.5 Beziehung zwischen koronarer Herzkrankheit und Phytosterolen sowie Oxyphytosterolen

Die Beziehung zwischen KHK und Phytosterol- sowie Oxyphytosterolkonzentrationen im Plasma und in der Klappe wurden mittels Student-t-Test für unabhängige Stichproben analysiert.

Bei 46 (von 104) Patienten der Untersuchungsstichprobe wurde präoperativ mittels Angiografie eine begleitende KHK diagnostiziert. Bei 17 Patienten lag eine koronare Eingefäßerkrankung zugrunde, 15 Patienten hatten eine koronare Zweigefäßerkrankung und weitere 14 Patienten eine koronare Dreigefäßerkrankung (Tabelle 6).

In der Gruppe der „Patienten ohne Statine“ wurde bei 7 (von 36) Patienten eine koronare Herzkrankheit diagnostiziert. Bei 2 Patienten lag eine koronare Eingefäßerkrankung

zugrunde, 2 Patienten hatten eine koronare Zweigefäßerkrankung und weitere 3 Patienten eine koronare Dreigefäßerkrankung (Tabelle 8).

4.5.1 Phytosterole

Die Plasmakonzentrationen der Phytosterole lagen bei Patienten mit begleitender KHK im Trend höher als bei Patienten ohne KHK. Dieser Effekt war in der Gesamtpopulation der Studie (Campesterol: KHK: $0,39 \pm 0,25$ vs. keine KHK: $0,35 \pm 0,20$, $p = 0,438$; Sitosterol KHK: $0,26 \pm 0,17$ vs. keine KHK: $0,25 \pm 0,13$, $p = 0,789$) sowie bei Patienten ohne Statine (Campesterol: KHK: $0,51 \pm 0,42$ vs. ohne KHK: $0,37 \pm 0,23$, $p = 0,436$; Sitosterol KHK: $0,37 \pm 0,34$ vs. keine KHK: $0,28 \pm 0,17$, $p = 0,507$) zu beobachten. Die Unterschiede zeigten jedoch keine statistische Signifikanz (Abb.17A/B).

In der Aortenklappe lagen in der Gesamtpopulation höhere Campesterolkonzentrationen (KHK: $65,00 \pm 42,84$ vs. keine KHK: $46,82 \pm 31,25$; $p = 0,018$) und Sitosterolkonzentrationen (KHK: $48,93 \pm 32,47$ vs. keine KHK: $37,53 \pm 23,78$; $p = 0,041$) bei Patienten mit begleitender KHK vor. Dies entsprach einer 38,8 % höheren Konzentration für Campesterol und einer 30,4 % höheren Konzentration für Sitosterol bei Patienten mit KHK im Vergleich zu Patienten ohne KHK (Abb.17C). In der Subgruppenanalyse der Patienten ohne Statine ließ sich dieser Trend ebenfalls bestätigen, wenn auch ohne relevante Signifikanz (Abb.17D).

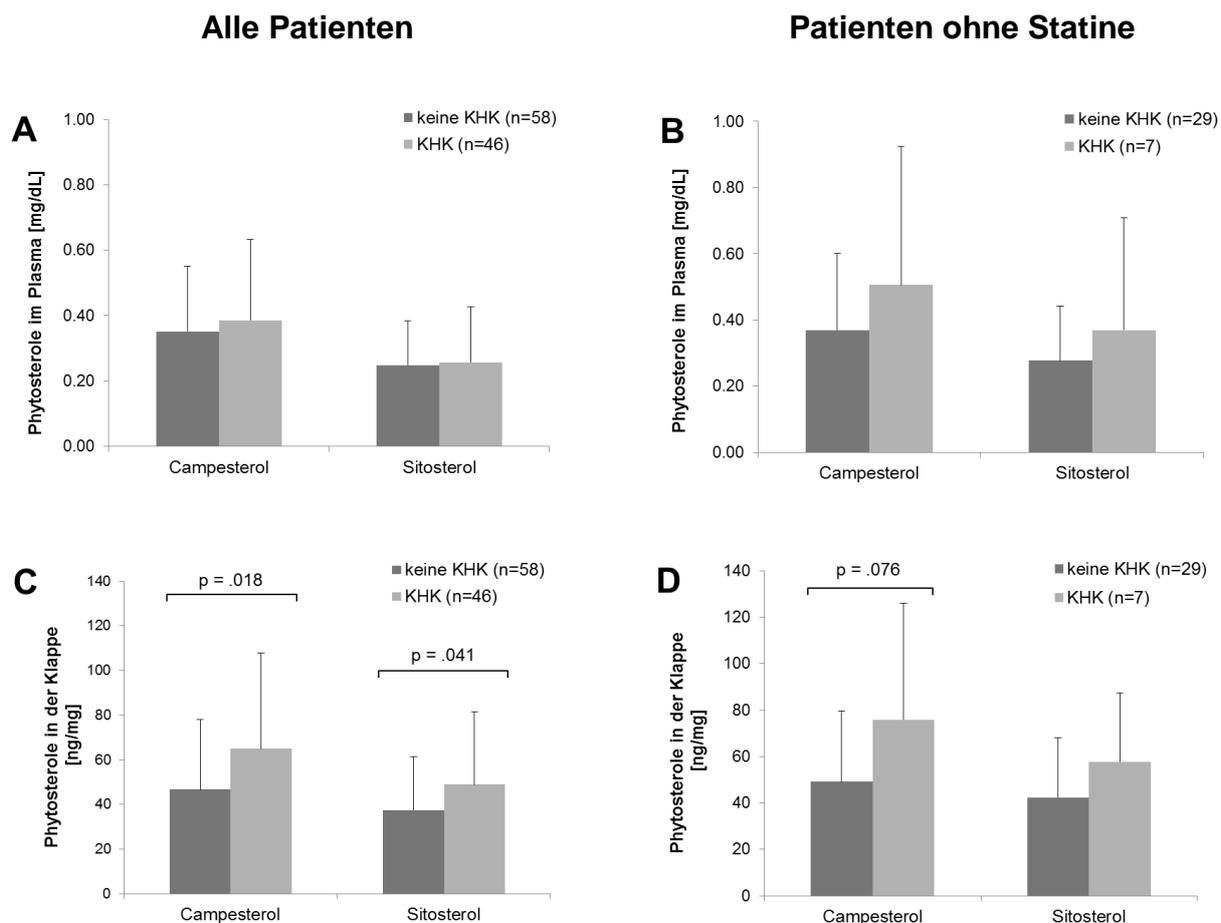


Abbildung 17: Phytosterolkonzentrationen im Plasma [mg/dL] (A,B) und der Klappe [ng/mg] (C,D) in Abhängigkeit einer begleitenden KHK - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.5.2 Verhältnisse der Phytosterole zu Lathosterol

Für die Beurteilung der Verhältnisse der pflanzlichen Sterole zu Lathosterol, wurde der Quotient aus Campesterol zu Lathosterol ebenso wie Sitosterol zu Lathosterol bestimmt. Dabei gilt Lathosterol, ein Vorläufer der Cholesterolsynthese, als Marker der hepatischen Syntheserate⁵⁹. Serumkonzentrationen von Campesterol sowie Sitosterol dienen hingegen der Quantifizierung der intestinalen Cholesterolresorption⁶⁵.

In Bezug auf Lathosterol waren in der Gesamtpopulation signifikant geringere Plasmakonzentrationen bei Patienten mit KHK zu beobachten (KHK: $0,13 \pm 0,11$ vs. keine KHK: $0,21 \pm 0,14$, $p = 0,003$). Die Subgruppenanalyse der Patienten ohne Statine ließ die gleiche Tendenz erkennen. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht beobachtet werden. Für die Lathosterolkonzentration in den Aortenklappen ließen sich zwischen Patienten mit und ohne begleitender KHK keine signifikante Unterschiede dokumentieren.

Das Plasmaverhältnis von Campesterol zu Lathosterol war in der Gesamtpopulation der Studie bei Patienten mit begleitender KHK signifikant höher als im Vergleich zu Patienten ohne KHK (KHK: $4,95 \pm 5,07$ vs. keine KHK: $2,50 \pm 2,28$; $p = 0,004$). Dies entsprach einem 98,0 % höheren Quotienten für Patienten mit KHK. Das Verhältnis von Sitosterol zu Lathosterol war im Plasma ebenfalls signifikant erhöht (KHK: $3,23 \pm 3,25$ vs. keine KHK: $1,79 \pm 1,65$, $p = 0,008$) und entsprach einem 80,4 % höheren Quotienten für Patienten mit KHK im Vergleich zu Patienten ohne KHK (Abb.18A). Die gleiche Tendenz ließ sich auch bei Patienten ohne Statine (Abb.18B) feststellen, allerdings ohne statistische Signifikanz.

In der Aortenklappe waren die Phytosterol zu Lathosterol Quotienten bei Patienten mit KHK höher als bei Patienten ohne KHK. Dabei lag der Campesterol zu Lathosterol Quotient in der Gesamtpopulation bei Patienten mit KHK 29,0 % höher (KHK: $4,27 \pm 4,50$ vs. keine KHK: $3,31 \pm 2,48$, $p = 0,170$), der Sitosterol zu Lathosterol Quotient 23,6 % höher (KHK: $3,19 \pm 3,06$ vs. keine KHK: $2,58 \pm 1,63$, $p = 0,196$; Abb. 18C) im Vergleich zu Patienten ohne KHK. Der gleiche Trend ließ sich in der Subgruppe erkennen (Abb. 18D). Die Unterschiede in der Klappe waren allerdings nicht signifikant.

Der Intergruppenvergleich für KHK ergab in der Gesamtpopulation im Plasma einen signifikanten Unterschied des Verhältnisses von Campesterol zu Lathosterol ($p < 0,001$) hinsichtlich des Ausmaßes der atherosklerotischen Läsionen im Koronararteriensystem. Dabei waren höhere Plasmalevel bei Patienten mit KHK Grad III im Vergleich zu Patienten ohne KHK ($p < 0,001$) sowie bei Patienten mit KHK Grad III im Vergleich zu KHK Grad I ($p = 0,048$; Abb.18E) zu beobachten. In Bezug auf den Sitosterol zu Lathosterol Quotienten im Plasma zeigte der Intergruppenvergleich ebenfalls signifikant höhere Level bei Patienten mit KHK Grad III im Gegensatz zu Patienten ohne KHK ($p = 0,001$; Abb.18F). Diese Beziehungen waren auf die signifikant geringere Plasma-Lathosterolkonzentration bei Patienten mit KHK Grad III im Vergleich zu Patienten ohne KHK zurückzuführen ($p = 0,001$). Auch in der Subgruppenanalyse zeigte sich ein höherer Plasmaspiegel des Campesterol/Lathosterol-Quotienten bei Patienten mit KHK Grad III im Vergleich zu Patienten ohne KHK ($p = 0,029$). Die gleiche Tendenz war im Plasma für den Sitosterol/Lathosterol-Quotienten ohne statistische Signifikanz zu beobachten.

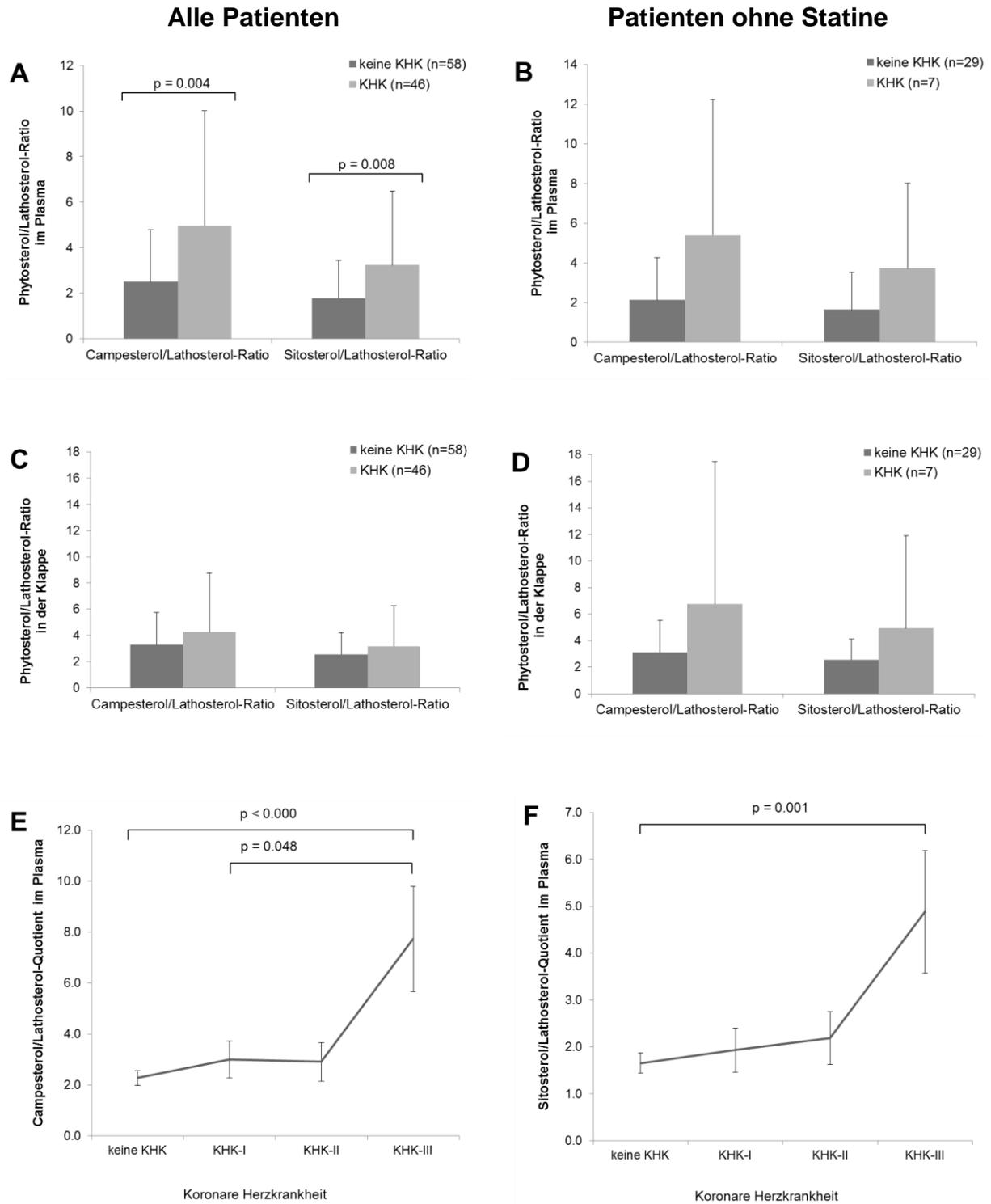


Abbildung 18: Phytosterol/Lathosterol-Quotienten im Plasma (A,B) und in der Klappe (C,D) in Abhängigkeit einer begleitenden KHK - in der Gesamtpopulation der Studie und der Subgruppe der Patienten ohne Statine; Campesterol/Lathosterol-Quotient (E) und Sitosterol/Lathosterol-Quotient (F) im Plasma in Abhängigkeit des Schweregrades der KHK - in der Gesamtpopulation.

4.5.3 Verhältnisse der Phytosterole zu Cholesterol

In Bezug auf die Plasmacholesterolspiegel zeigten sich bei Patienten mit begleitender KHK in der Gesamtpopulation geringere Konzentrationen (KHK: $172,52 \pm 40,70$ vs. keine KHK: $199,18 \pm 40,02$, $p = 0,001$). Die Subgruppenanalyse der Patienten ohne Statine ließ die gleiche Tendenz erkennen. Signifikante Unterschiede konnten allerdings nicht dokumentiert werden. Für die Cholesterolkonzentration in den Aortenklappen waren in keiner der beiden Gruppen zwischen Patienten mit und ohne KHK signifikante Unterschiede zu beobachten.

Das Verhältnis von Campesterol zu Cholesterol im Plasma war in der Gesamtpopulation der Studie bei Patienten mit begleitender KHK höher als im Vergleich zu Patienten ohne KHK (KHK: $2,23 \pm 1,28$ vs. keine KHK: $1,77 \pm 0,94$, $p = 0,041$). Dies entsprach einem 26,0 % höheren Quotienten für Patienten mit KHK (Abb.19A). Die gleiche Tendenz konnte auch für das Plasmaverhältnis von Sitosterol zu Cholesterol in der Gesamtpopulation festgestellt werden, wenn auch ohne statistische Relevanz (Abb.19B).

In der Aortenklappe waren die Phytosterol zu Cholesterol Quotienten bei Patienten mit KHK höher als bei Patienten ohne KHK. Dabei lag der Campesterol zu Cholesterol Quotient in der Gesamtpopulation bei Patienten mit KHK 14,9 % höher (KHK: $2,08 \pm 1,32$ vs. keine KHK: $1,81 \pm 0,80$, $p = 0,209$), der Sitosterol zu Cholesterol Quotient 7,6 % höher (KHK: $1,56 \pm 0,89$ vs. keine KHK: $1,45 \pm 0,51$, $p = 0,455$; Abb. 19C). Der gleiche Trend ließ sich in der Subgruppe erkennen (Abb. 19D). Die Unterschiede in der Klappe waren allerdings nicht signifikant.

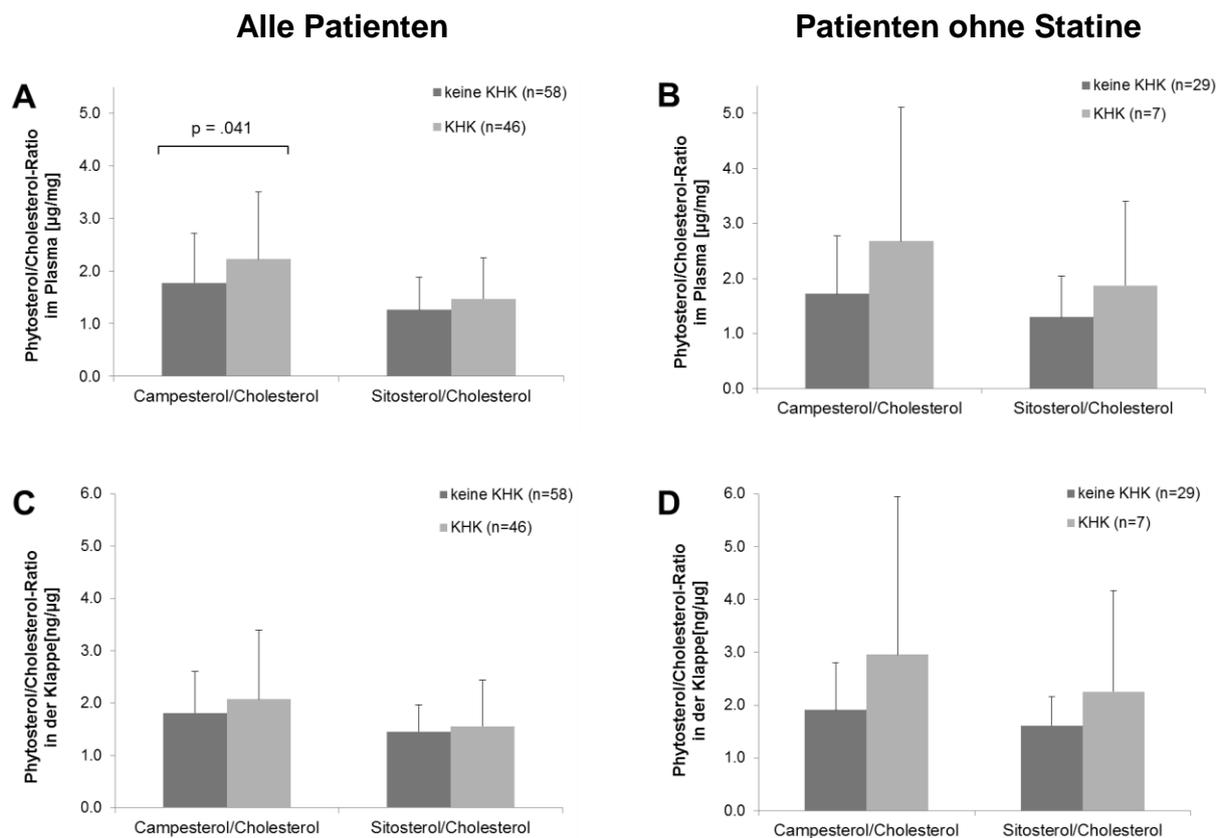


Abbildung 19: Phytosterol/Cholesterol-Quotienten im Plasma [$\mu\text{g}/\text{mg}$] (A,B) und in der Klappe [$\text{ng}/\mu\text{g}$] (C,D) in Abhängigkeit einer begleitenden KHK - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.5.4 Oxyphytosterole

Für die Beurteilung der Beziehung zwischen Oxyphytosterolen und KHK wurden die gemessenen oxidierten Campesterole ($7\alpha\text{-OH-}$, $7\beta\text{-OH-}$, 7-Keto-Campesterol), ebenso wie die oxidierten Sitosterole ($7\alpha\text{-OH-}$, $7\beta\text{-OH-}$, 7-Keto-Sitosterol) in der Summe zusammengefasst. Bei einem Patienten konnten im Plasma keine Oxyphytosterolkonzentrationen quantifiziert werden.

Die Analyse der Oxyphytosterole in der Gesamtpopulation zeigte im Plasma für die Summe der oxidierten Campesterole keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne KHK (KHK: $1,26 \pm 0,51$ vs. keine KHK: $1,29 \pm 0,47$, $p = 0,760$). Hinsichtlich der Summe der oxidierten Sitosterole konnten höhere Konzentrationen bei Patienten mit einer begleitenden KHK dokumentiert werden (KHK: $3,18 \pm 1,21$ vs. keine KHK: $2,98 \pm 0,89$, $p = 0,336$). Dies war sowohl in der Gesamtpopulation als auch bei Patienten ohne Statine festzustellen. Der Effekt zeigte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb.20A/B).

Die Analyse der Oxyphytosterole in der Klappe ergab im Trend höhere Oxyphytosterolkonzentrationen bei Patienten mit begleitender KHK im Vergleich zu

Patienten ohne KHK. Dieser Effekt war für die Summe der oxidierten Campesterole bei allen Patienten signifikant (KHK: $0,41 \pm 0,15$ vs. keine KHK: $0,35 \pm 0,13$; $p = 0,043$) und entsprach einer 17,1 % höheren Konzentration bei Patienten mit KHK (Abb.20C). In der Subgruppenanalyse der Patienten ohne Statine wurde der gleiche Effekt beobachtet, wenn auch ohne relevante Signifikanz (Abb.20D).

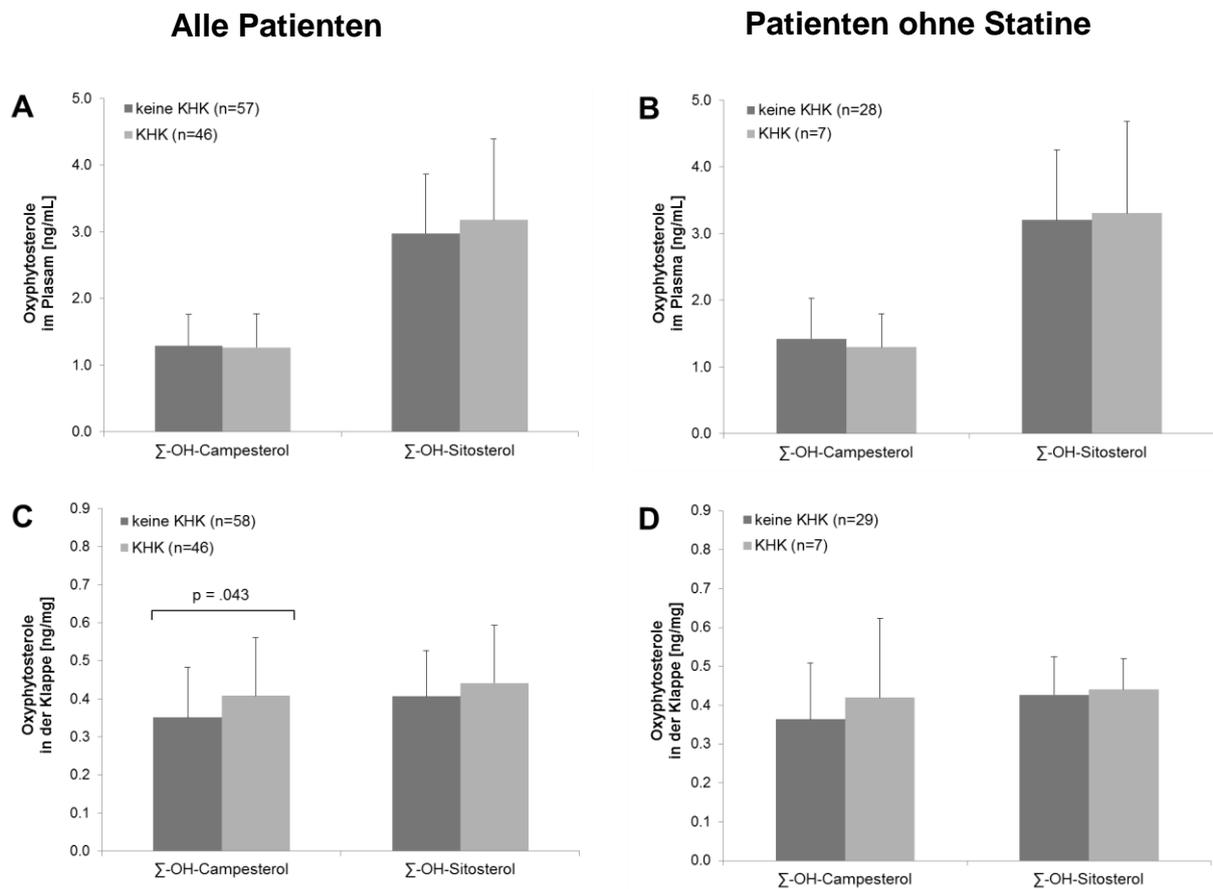


Abbildung 20: Summe der oxidierten Campesterole und Sitosterole in Plasma [ng/mL] (A,B) und in der Klappe [ng/mg] (C,D) in Abhängigkeit einer begleitenden KHK - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.5.5 Verhältnisse der Oxyphytosterole zu Cholesterol

Für die Beurteilung der Beziehung zwischen den Oxyphytosterol/Cholesterol-Quotienten und KHK, wurden die verschiedenen oxidierten Campesterole (7 α -OH-, 7 β -OH-, 7-Keto-Campesterol), ebenso wie die oxidierten Sitosterole (7 α -OH-, 7 β -OH-, 7-Keto-Sitosterol) in der Summe zusammengefasst.

Weder in der Gesamtpopulation noch in der Gruppe der Patienten ohne Statine ließen sich im Plasma signifikante Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses der oxidierten Campesterole zu Cholesterol beobachten.

In der Gesamtpopulation der Studie zeigte sich im Plasma bei Patienten mit KHK ein signifikant höheres Verhältnis der Summe der oxidierten Sitosterole zu Cholesterol (KHK: $1,89 \pm 0,69$ vs. keine KHK: $1,54 \pm 0,49$, $p = 0,003$). Dem zugrunde lagen die signifikant höheren Verhältnisse von 7β -OH-Sitosterol (KHK: $0,32 \pm 0,14$ vs. keine KHK: $0,25 \pm 0,08$, $p = 0,003$) sowie 7-Keto-Sitosterol zu Cholesterol (KHK: $1,53 \pm 0,56$ vs. keine KHK: $1,25 \pm 0,41$, $p = 0,004$) bei Patienten mit KHK (Abb.21A). Dieser Trend war in der Subgruppe der Patienten ohne Statine ebenfalls zu beobachten, wenn auch ohne statistische Relevanz (Abb.21B).

In der Aortenklappe waren in der Gesamtpopulation sowie in der Subgruppenanalyse keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verhältnisse der Oxyphytosterole zu Cholesterol festzustellen (Abb.21C/D).

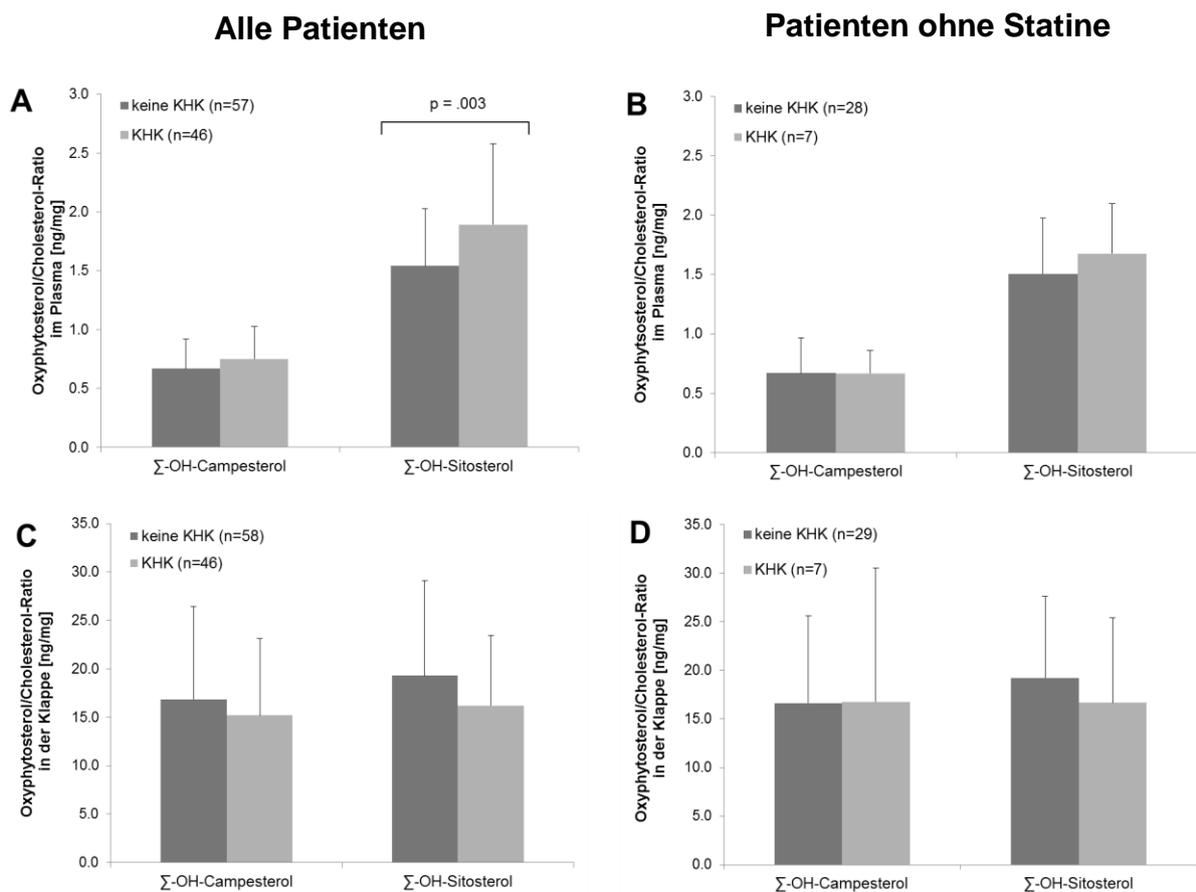


Abbildung 21: Oxyphytosterol/Cholesterol-Quotienten im Plasma [ng/mg] (A,B) und in der Klappe [ng/mg] (C,D) in Abhängigkeit einer begleitenden KHK - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.6 Beziehung zwischen einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen und Phytosterolen sowie Oxyphytosterolen

Die Beziehungen zwischen einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen und den Phytosterol- sowie Oxyphytosterolkonzentrationen wurden mittels Student-t-Test für unabhängige Stichproben analysiert.

Bei 22 (von 104) Patienten der Gesamtpopulation wurde eine positive Familienanamnese dokumentiert (Tabelle 6). In der Subgruppenanalyse lag bei 9 (von 36) Patienten ohne Statine eine positive Familienanamnese vor (Tabelle 8).

4.6.1 Phytosterole

Die Plasmakonzentrationen der Phytosterole lagen bei Patienten mit positiver Familienanamnese im Trend höher als bei Patienten mit negativer Familienanamnese. Dabei war in der Gesamtpopulation der Studie die Plasmakonzentration der Campesterole bei Patienten mit positiver Familienanamnese 20,0 % höher und in der Subgruppe 45,7 % höher. Diese Unterschiede konnten keine statistische Signifikanz erreichen.

In der Aortenklappe waren bei Patienten mit positiver Familienanamnese im Trend höhere Konzentrationen von Campesterol und Sitosterol festzustellen. Dabei lag in der Gesamtpopulation die Campesterolkonzentration bei Patienten mit positiver Familienanamnese 19,3 % höher und in der Subgruppe 32,6 % höher. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede konnte jedoch nicht dokumentiert werden (Tabelle 9).

		Alle Patienten			Patienten ohne Statine		
Campesterol		n	MW ± SD	p	n	MW ± SD	p
Plasma	FA negativ	71	0,35 ± 0,21	0,236	24	0,35 ± 0,23	0,165
	FA positiv	22	0,42 ± 0,28		9	0,51 ± 0,38	
Klappe	FA negativ	71	50,87 ± 36,95	0,288	24	47,71 ± 27,19	0,260
	FA positiv	22	60,71 ± 40,06		9	63,24 ± 50,20	
Sitosterol		n	MW ± SD	p	n	MW ± SD	p
Plasma	FA negativ	71	0,24 ± 0,13	0,102	24	0,26 ± 0,17	0,155
	FA positiv	22	0,30 ± 0,21		9	0,38 ± 0,30	
Klappe	FA negativ	71	39,27 ± 27,92	0,196	24	40,15 ± 23,22	0,299
	FA positiv	22	48,25 ± 29,25		9	50,81 ± 32,17	

Tabelle 9: Phytosterolkonzentration im Plasma [mg/dL] und in der Klappe [ng/mg] in Abhängigkeit der Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

FA = Familienanamnese, n = Anzahl der Patienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, p = zweiseitiges Signifikanzniveau

4.6.2 Verhältnisse der Phytosterole zu Lathosterol

Für die Konzentration von Lathosterol war in Plasma und Aortenklappen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Patienten mit und ohne positive Familienanamnese zu beobachten. Der Effekt konnte sowohl in der Gruppe aller Patienten, als auch in der Subgruppenanalyse festgestellt werden.

In der Gesamtpopulation der Studie lag das Verhältnis von Campesterol zu Lathosterol im Plasma bei Patienten mit positiver Familienanamnese höher im Vergleich zu Patienten mit negativer Familienanamnese (positiv: $4,18 \pm 4,44$ vs. negativ: $3,15 \pm 2,81$, $p = 0,200$). Dies entsprach einem 32,7 % höheren Quotienten für Patienten mit positiver Familienanamnese. Das Verhältnis von Sitosterol zu Lathosterol war im Plasma bei Patienten mit positiver Familienanamnese 36,4 % höher als bei Patienten mit negativer Anamnese (positiv: $2,85 \pm 2,74$ vs. negativ: $2,09 \pm 1,68$, $p = 0,232$). Für die Gruppe der Patienten ohne Statine konnte die gleiche Tendenz beobachtet werden. Bei den Unterschieden war jedoch kein signifikanter Effekt zu dokumentieren (Abb.22A/B).

In der Aortenklappe konnten ebenfalls höhere Phytosterol zu Lathosterol Quotienten bei Patienten mit positiver Familienanamnese dokumentiert werden. Dabei lag der Campesterol zu Lathosterol Quotient in der Gesamtpopulation 31,6 % höher bei positiver Familienanamnese im Vergleich zu negativer Familienanamnese (positiv: $4,66 \pm 6,13$ vs. negativ: $3,54 \pm 2,52$, $p = 0,219$). Für das Verhältnis von Sitosterol zu Lathosterol zeigte sich bei Patienten mit positiver Familienanamnese ein um 32,7 % höherer Quotient im Vergleich zu Patienten mit negativer Familienanamnese (positiv: $3,57 \pm 4,00$ vs. negativ: $2,69 \pm 1,74$, $p = 0,147$; Abb.22C). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In der Subgruppenanalyse konnte die gleiche Tendenz ebenfalls ohne relevante Signifikanz beobachtet werden (Abb.22D).

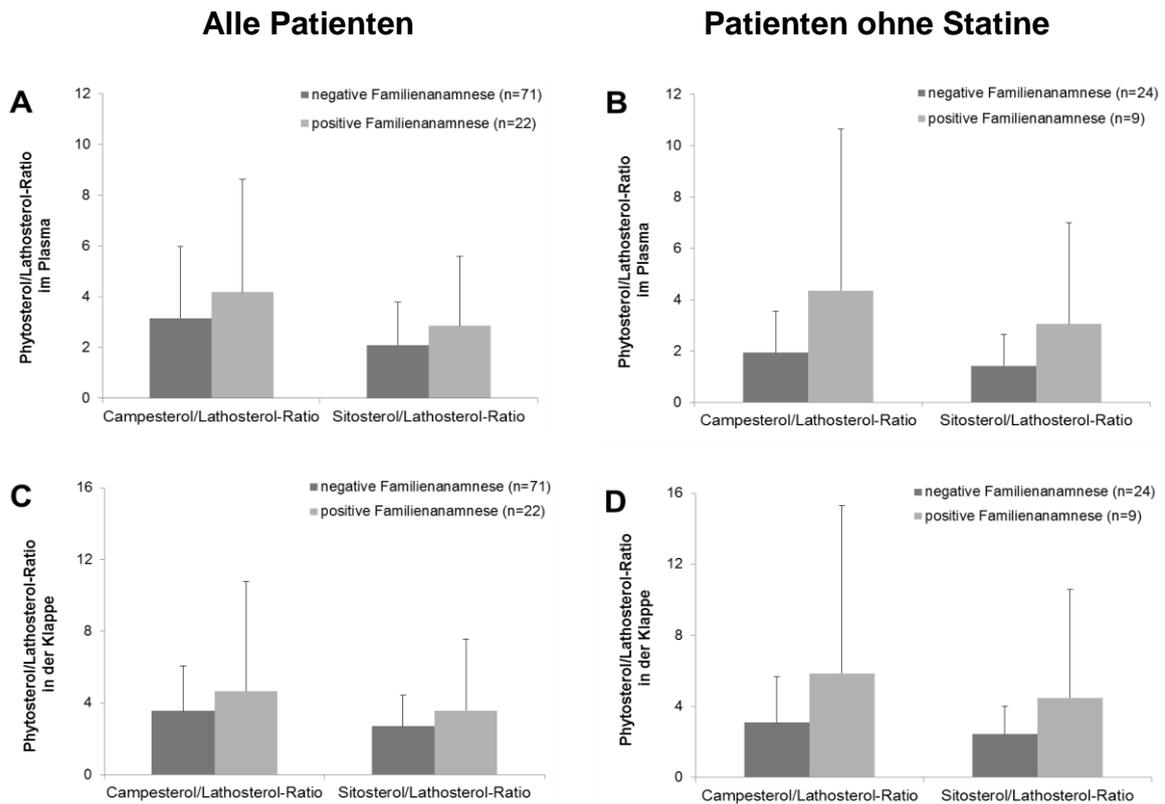


Abbildung 22: Phytosterol/Lathosterol-Quotienten im Plasma (A,B) und in der Klappe (C,D) in Abhängigkeit der Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.6.3 Verhältnisse der Phytosterole zu Cholesterol

Die Cholesterolkonzentrationen in Plasma und Aortenklappen zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Patienten mit und ohne eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen. Dies war im Gesamtkollektiv der Studie sowie in der Subgruppe zu beobachten.

Bezüglich des Verhältnisses von Campesterol zu Cholesterol im Plasma waren weder in der Gesamtpopulation noch in der Gruppe der Patienten ohne Statine signifikante Unterschiede zu dokumentieren. Im Trend konnte jedoch in beiden Gruppen ein höheres Verhältnis für Patienten mit positiver Familienanamnese dokumentiert werden (Abb.23A/B).

In der Aortenklappe ließen sich in der Gesamtpopulation sowie in der Subgruppenanalyse ebenfalls keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die Tendenz zeigte ein höheres Verhältnis der Phytosterole zu Cholesterol bei Patienten mit positiver Familienanamnese (Abb. 23C/D).

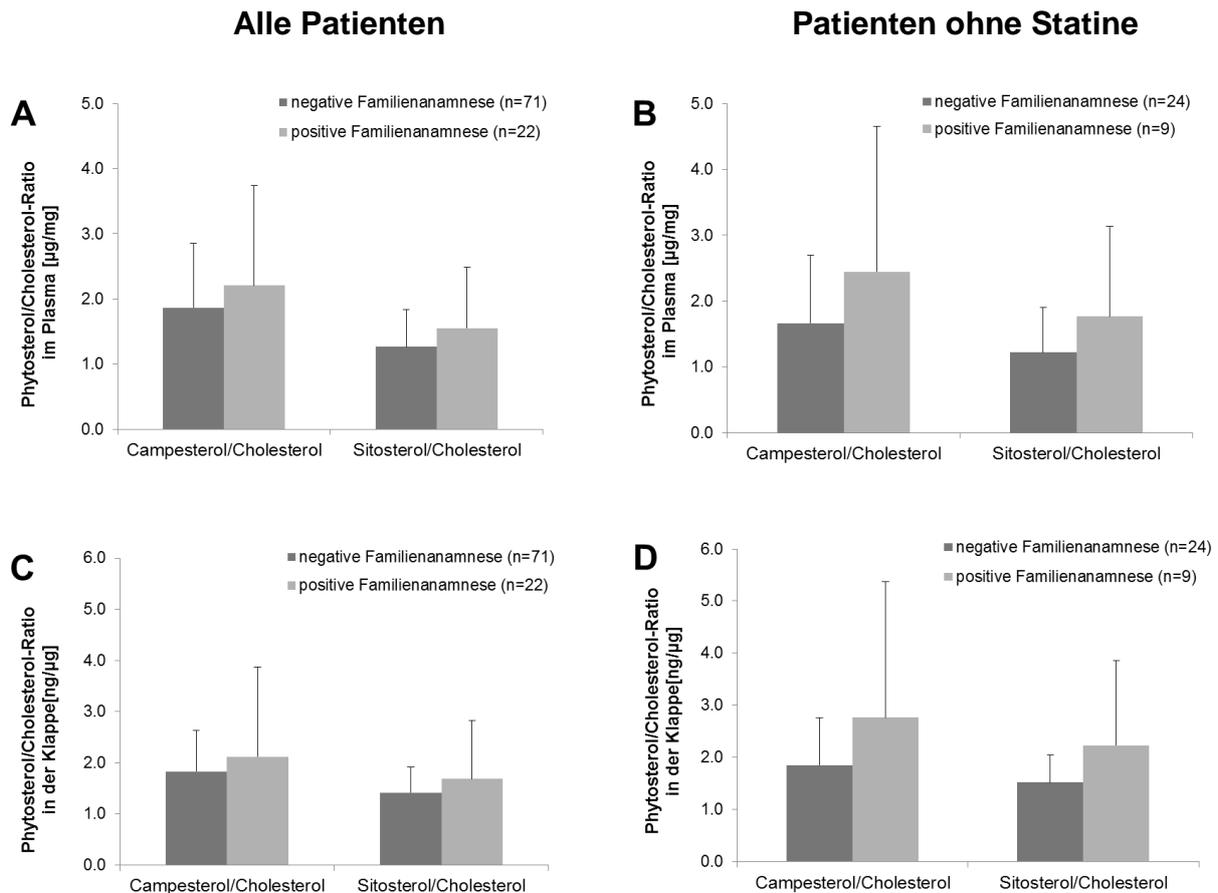


Abbildung 23: Phytosterol/Cholesterol-Quotienten im Plasma [$\mu\text{g}/\text{mg}$] (A,B) und in der Klappe [$\text{ng}/\mu\text{g}$] (C,D) in Abhängigkeit einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.6.4 Oxyphytosterole

Für die Beurteilung der Beziehung zwischen Oxyphytosterolen und positiver Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen, wurden die verschiedenen oxidierten Campesterole ($7\alpha\text{-OH-}$, $7\beta\text{-OH-}$, 7-Keto-Campesterol), ebenso wie die oxidierten Sitosterole ($7\alpha\text{-OH-}$, $7\beta\text{-OH-}$, 7-Keto-Sitosterol) in der Summe zusammengefasst.

Die Plasmakonzentrationen der Summe der Oxyphytosterole waren bei Patienten mit positiver Familienanamnese höher als bei Patienten mit negativer Familienanamnese. Dabei lag in der Gesamtpopulation die Plasmakonzentration der Summe der oxidierten Campesterole bei Patienten mit positiver Familienanamnese 8,8 % höher und in der Subgruppe 12,0 % höher. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede konnte jedoch nicht festgestellt werden.

In der Aortenklappe waren bei Patienten mit positiver Familienanamnese im Trend höhere Konzentrationen der Summe der oxidierten Campesterole und Sitosterole festzustellen.

Dabei lagen in der Gesamtpopulation die oxidierten Campesterolkonzentrationen bei Patienten mit positiver Familienanamnese 8,3 % höher und in der Subgruppe 23,5 % höher. Eine statistische Signifikanz der Unterschiede konnte nicht dokumentiert werden (Tabelle 10).

Σ -OH-Campesterol		Alle Patienten			Patienten ohne Statine		
		n	MW \pm SD	p	n	MW \pm SD	p
Plasma	FA negativ	70	1,25 \pm 0,46	0,348	23	1,33 \pm 0,54	0,480
	FA positiv	22	1,36 \pm 0,59		9	1,49 \pm 0,66	
Klappe	FA negativ	71	0,36 \pm 0,14	0,497	24	0,34 \pm 0,11	0,113
	FA positiv	22	0,39 \pm 0,14		9	0,42 \pm 0,18	
Σ -OH-Sitosterol		N	MW \pm SD	p	n	MW \pm SD	p
Plasma	FA negativ	70	2,99 \pm 1,00	0,219	23	3,18 \pm 1,01	0,451
	FA positiv	22	3,32 \pm 1,25		9	3,53 \pm 1,43	
Klappe	FA negativ	71	0,41 \pm 0,13	0,207	24	0,41 \pm 0,07	0,173
	FA positiv	22	0,45 \pm 0,14		9	0,45 \pm 0,08	

Tabelle 10: Oxyphytosterolkonzentrationen im Plasma [ng/mL] und in der Klappe [ng/mg] in Abhängigkeit der Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

FA = Familienanamnese, n = Anzahl der Patienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, p = zweiseitiges Signifikanzniveau

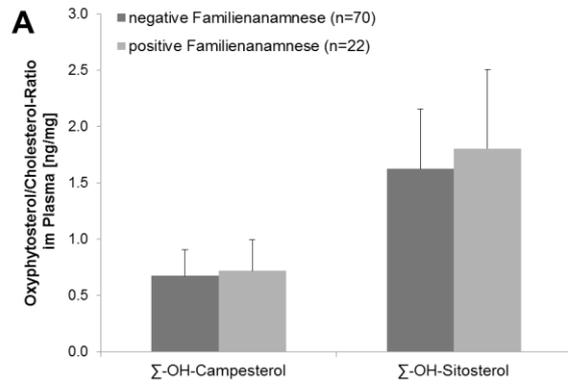
4.6.5 Verhältnisse der Oxyphytosterole zu Cholesterol

Für die Beurteilung der Beziehungen zwischen den Oxyphytosterol/Cholesterol-Quotienten und der positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen, wurden die verschiedenen oxidierten Campesterole (7 α -OH-, 7 β -OH-, 7-Keto-Campesterol), ebenso wie die oxidierten Sitosterole (7 α -OH-, 7 β -OH-, 7-Keto-Sitosterol) in der Summe zusammengefasst.

Hinsichtlich des Verhältnisses der oxidierten Campesterole zu Cholesterol ließen sich im Plasma weder in der Gesamtpopulation noch in der Gruppe der Patienten ohne Statine signifikante Unterschiede beobachten. Im Trend konnte jedoch in beiden Gruppen ein höheres Verhältnis für Patienten mit positiver Familienanamnese dokumentiert werden (Abb.24A/B).

In der Aortenklappe waren in der Gesamtpopulation sowie in der Subgruppenanalyse keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die Tendenz zeigte ein höheres Verhältnis der oxidierten Phytosterole zu Cholesterol bei Patienten mit positiver Familienanamnese (Abb.24C/D).

Alle Patienten



Patienten ohne Statine

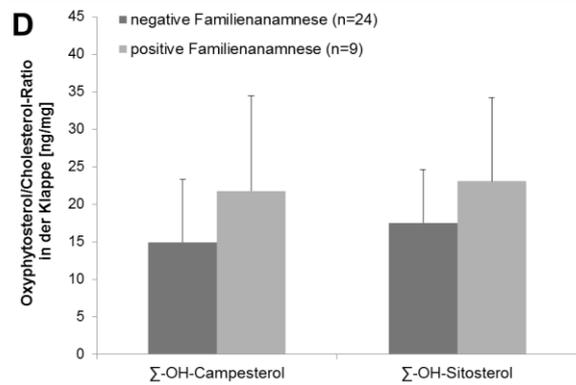
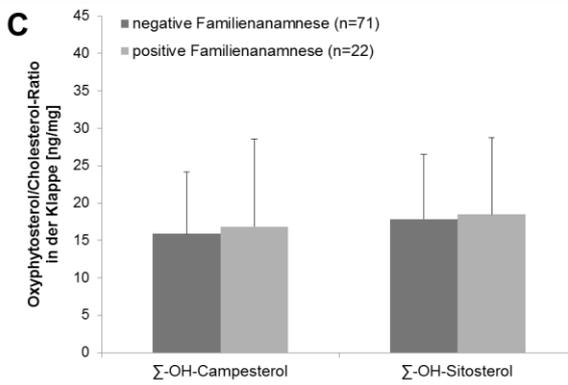
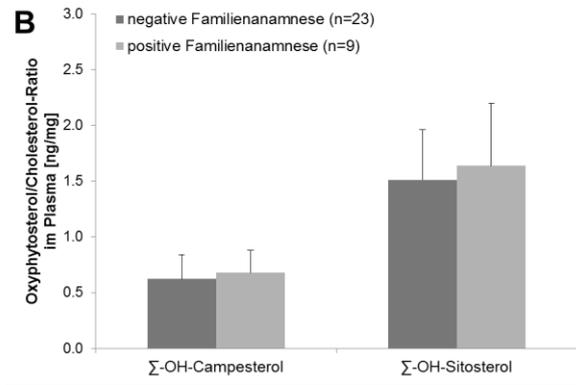


Abbildung 24: Oxyphytosterol/Cholesterol-Quotienten im Plasma [ng/mg] (A,B) und in der Klappe [ng/mg] (C,D) in Abhängigkeit der Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

4.7. Verhältnis von Cholestanol zu Cholesterol

Die Beziehung zwischen der Höhe des Cholestanol-Cholesterol-Quotienten und dem Vorliegen einer begleitenden KHK sowie einer positiven Familienanamnese wurde mittels Student-t-Test für unabhängige Stichproben analysiert.

Die Analyse der Konzentration von Cholestanol im Plasma und den Klappen ergab keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit KHK im Vergleich zu Patienten ohne KHK, ebenso wie bei Patienten mit positiver Familienanamnese im Vergleich zu negativer Familienanamnese.

In der untersuchten Studienpopulation konnten für Patienten mit KHK im Vergleich zu Patienten ohne KHK keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Cholestanol/Cholesterol-Quotienten herausgestellt werden. Weder im Plasma noch in der Klappe ließen sich Unterschiede beobachten. Dies konnte auch in der Subgruppenanalyse der Patienten ohne Statine bestätigt werden.

Hinsichtlich des Vergleichs von Patienten mit und ohne positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des Quotienten aus Cholestanol zu Cholesterol zu dokumentieren. Dies war im Plasma und den Klappen der Gesamtpopulation der Studie sowie Patienten ohne Statine festzustellen (Tabelle 11).

		Alle Patienten			Patienten ohne Statine		
KHK		n	MW ± SD	p	n	MW ± SD	p
Plasma	KHK positiv	46	2,19 ± 0,50	0,220	7	2,27 ± 0,75	0,550
	KHK negativ	58	2,08 ± 0,37		29	2,09 ± 0,42	
Klappe	KHK positiv	46	2,25 ± 0,43	0,098	7	2,32 ± 0,66	0,889
	KHK negativ	58	2,41 ± 0,51		29	2,35 ± 0,49	
Positive Familienanamnese		n	MW ± SD	p	n	MW ± SD	p
Plasma	FA positiv	22	2,24 ± 0,50	0,136	9	2,22 ± 0,50	0,438
	FA negativ	71	2,08 ± 0,41		24	2,07 ± 0,48	
Klappe	FA positiv	22	2,50 ± 0,55	0,070	9	2,56 ± 0,48	0,108
	FA negativ	71	2,29 ± 0,44		24	2,24 ± 0,51	

Tabelle 11: Cholestanol/Cholesterol-Quotient im Plasma [$\mu\text{g}/\text{mg}$] und in der Klappe [$\text{ng}/\mu\text{g}$] in Abhängigkeit einer begleitenden KHK und einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen - in der Gesamtpopulation der Studie und bei Patienten ohne Statine.

KHK = koronare Herzkrankheit, FA = Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen, n = Anzahl der Patienten, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, p = zweiseitiges Signifikanzniveau

5. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der **Zusammenhang zwischen Phytosterolen sowie ihren Oxidationsprodukten im Plasma und der Aortenklappe** bei Patienten mit operationspflichtiger Aortenklappenstenose untersucht. Die Daten zeigen eine Anreicherung von oxidierten Phytosterolen in verkalkten Aortenklappen. Phytosterole zeigen eine signifikante Korrelation mit ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten in den Aortenklappen, hingegen lediglich schwache Korrelationen im Plasma. Darüber hinaus konnten allenfalls schwache Korrelationen der oxidierten Phytosterole zwischen Plasma und Klappe festgestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Dissertationsarbeit war die Untersuchung der Beziehung zwischen Phytosterolen/Oxyphytosterolen sowie den Markern der Cholesterollhomöostase und dem Vorliegen einer **begleitenden koronaren Herzkrankheit**. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass erhöhte Phytosterol zu Lathosterol Quotienten im Plasma bei Patienten mit AS in Assoziation mit einer begleitenden KHK stehen. In der Gesamtpopulation konnte im Plasma sowohl für die Campesterol zu Lathosterol Quotienten als auch Sitosterol zu Lathosterol Quotienten höhere Werte bei Patienten mit KHK beobachtet werden. Des Weiteren zeigte sich eine Assoziation zwischen erhöhten Phytosterolkonzentrationen im Aortenklappengewebe bei Patienten mit AS und einer begleitenden KHK. Diese Effekte bestätigten sich in der Subgruppenanalyse als nicht signifikante Trends.

Darüber hinaus wurden Phytosterole/Oxyphytosterole und Marker der Cholesterollhomöostase in Beziehung zu dem Vorliegen einer **positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen** gesetzt. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu höheren Phytosterol- und Oxyphytosterolkonzentrationen ebenso wie zu höheren Phytosterol/Lathosterol-Quotienten und Phytosterol/Cholesterol-Quotienten bei Patienten mit positiver Familienanamnese. Dies konnte sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der Subgruppenanalyse dokumentiert werden.

Ferner wurde die Beziehung zwischen Cholestanol sowie dem Cholestanol/Cholesterol-Quotienten und Patienten mit KHK und einer positiven Familienanamnese untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie konnten weder für die Absolutwerte von Cholestanol, noch für das Verhältnis zu Cholesterol in Plasma und Aortenklappen eine Assoziation mit einer begleitenden KHK oder positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen feststellen. Dies galt sowohl für die Gruppe aller Patienten, also auch für die Gruppe der Patienten ohne Statinbehandlung. Damit unterstreichen die Daten die Ergebnisse früher publizierter Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe¹²⁹ und stehen im Widerspruch zur

Hypothese, dass Cholestanol, bzw. der Quotient aus Cholestanol/Cholesterol mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist^{94, 95, 120}.

5.1 Zusammenhang zwischen Phytosterolen und Oxyphytosterolen in Plasma und Klappe

Inflammatorische Prozesse ausgelöst durch Verkalkung und Steroleinlagerung spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiation und Progression der Atherosklerose⁵⁵. Folge dessen ist eine atherosklerotische Arterienverkalkung in Form von KHK, pAVK sowie Verkalkung der Aorta²⁵. Zum ersten Mal konnten Sterol- und Oxyphytosterolkonzentrationen im Aortenklappengewebe nach Separation der verkalkten Anteile der atherosklerotischen Plaques bestimmt werden. Vorausgegangene Daten - basierend auf der Auswertung von kalzifiziertem Gewebe - zeigen eine große Variation der Konzentrationen der einzelnen Proben sowie geringere Sterolkonzentrationen bezogen auf das Trockengewicht⁹¹. Die hochsignifikanten Korrelationen von Sitosterol und Campesterol im Plasma, den Aortenklappen sowie zwischen Plasma und Aortenklappen bestätigen die Ergebnisse vorausgegangener Studien^{37, 126}. Dies untermauert die Hypothese, dass Phytosterole im Aortenklappengewebe aus diätischen Sterolen stammen, welche über die Nahrung aufgenommen werden. Dabei gelangen Phytosterole analog zu Cholesterol als Komponenten von Chylomikronen und VLDL in die Blutbahn und ins Gewebe^{9, 39}. Interessanterweise korrelieren bei Patienten mit hochgradiger AS Phytosterole mit ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten in der Klappe, allerdings nur schwach im Plasma. Darüber hinaus konnten allenfalls schwache Korrelationen der Oxyphytosterole zwischen Plasma und Aortenklappen festgestellt werden. Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Oxidation von Sterolen im kardiovaskulären Gewebe einem lokalen Prozess unterliegt, der unabhängig von der Statinbehandlung abläuft. Einen denkbaren, wenn auch spekulativen, Erklärungsansatz dieser Ergebnisse kann das stabile, abgegrenzte Milieu innerhalb des von der atherosklerotischen Plaque umgebenen Klappengewebes darstellen. Dies könnte nach Ablagerung der Phytosterole im Laufe des Lebens zu höheren Korrelationen der Phytosterole mit ihren zugehörigen Oxidationsprodukten führen. Darüber hinaus herrschen im Plasma eine Reihe verschiedener Einflussfaktoren vor, darunter Stoffwechselprodukte, Entzündungsmediatoren, weitere Lipidfraktionen sowie Wechselwirkungsprozesse mit Sauerstoff und Kohlendioxid. Es ist annehmbar, dass diese plasmatischen Variablen einerseits eine reduzierte Oxidationsbereitschaft der Phytosterole bedingen können oder andererseits zu einem vermehrten Abbau der Oxyphytosterole aber auch Phytosterole im Plasma führen können.

5.2 Beziehung zwischen Phytosterolen und kardiovaskulären Erkrankungen

5.2.1 Phytosterole

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass ein erhöhter Phytosterol zu Lathosterol Quotient im Plasma - im Sinne einer vermehrten Cholesterolesorption und verminderten Cholesterolsynthese - bei Patienten mit AS in Assoziation mit einer begleitenden KHK steht. So wurden in der Gesamtpopulation der Studie für das Verhältnis von Campesterol zu Lathosterol und das Verhältnis von Sitosterol zu Lathosterol höhere Plasmalevel bei Patienten mit begleitender KHK dokumentiert. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse des Vergleichs der einzelnen KHK-Ausprägungen in der Gesamtpopulation. Dieser ergab signifikant höhere Phytosterol zu Lathosterol Quotienten bei Patienten mit einer koronaren Dreigefäßerkrankung im Vergleich zu Patienten ohne KHK. Zu beachten ist die in der Gesamtpopulation der Studie verminderte Lathosterolkonzentration im Plasma bei Patienten mit KHK. Dies ist auf die Statintherapie der Patienten mit begleitender KHK zurückzuführen, die eine verminderte Cholesterolsynthese und damit eine Verminderung der Vorläufermoleküle des Cholesterols bedingt. Nichtsdestotrotz lässt sich nach Abzug der Statinwirkung in der Subgruppe der Patienten ohne Statine ein nicht signifikanter Trend zu höheren Phytosterol zu Lathosterol Quotienten feststellen und der in der Gesamtpopulation beobachtete Effekt erkennen. Dies konnte sowohl im Plasma als auch in der Klappe beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass die fehlende Signifikanz der geringen Fallzahl der Subgruppe geschuldet sein könnte.

Hinsichtlich der Aortenklappe zeigten sich in der Gesamtpopulation höhere Phytosterolkonzentrationen bei Patienten mit KHK im Gegensatz zu Patienten ohne KHK. Auch in der Subgruppe war der gleiche, wenn auch nicht signifikante, Trend zu beobachten. Patienten mit positiver Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen zeigten im Plasma und Aortenklappen einen nicht signifikanten Trend zu höheren Phytosterolkonzentrationen ebenso wie zu höheren Phytosterol/Lathosterol-Quotienten und Phytosterol/Cholesterol-Quotienten. Dies war für die Gesamtpopulation der Studie sowie für Patienten ohne Einnahme von Statinen festzustellen.

5.2.1.1 Phytosterole - Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen

5.2.1.1.1 Klinische Studien

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit dargestellten Daten sind vergleichbar mit den zu erwartenden Werten früherer Studien. Dabei wurden bereits in vorausgegangenen Arbeiten erhöhte Phytosterolkonzentrationen ebenso wie eine veränderte Cholesterolumöostase in Assoziation mit koronarer Herzkrankheit, kardiovaskulären Ereignissen bis hin zu erhöhter Mortalität gesetzt.

Die hohe Konzentration zirkulierender Phytosterole ebenso wie die frühzeitige - häufig letal verlaufende - Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit **Sitosterolämie**, hat zu Untersuchungen der Beziehung zwischen Phytosterolen im physiologischen Bereich und dem Risiko für KHK geführt¹⁰⁴. Es konnte erstmals in einer klinischen Studie von Glueck und Kollegen eine Assoziation zwischen erhöhten Phytosterolkonzentrationen und einem Anstieg im kardiovaskulären Risiko bei Patienten ohne Sitosterolämie gezeigt werden³³.

Ferner zeigten Rajaratman et al.⁸³ in einer multivariaten Analyse an **postmenopausalen Frauen** eine unabhängige Assoziation zwischen Phytosterolen und KHK. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Prävalenz einer KHK bei postmenopausalen Frauen unabhängig und positiv mit der Ratio aus Campesterol zu Cholesterol sowie Sitosterol zu Cholesterol und invers mit Lathosterol assoziiert ist. Diese Ergebnisse konnten durch eine weitere klinische Studie von Sutherland et al.¹⁰⁵ bestätigt werden, welche Frauen und Männer jeder Altersklasse mit einbezog.

Sudhop et al.¹⁰³ untersuchten die Beziehung zwischen einer **positiven Familienanamnese** für kardiovaskuläre Erkrankungen und den Serumkonzentrationen der Phytosterole bei Patienten mit KHK. Sowohl Campesterol und Sitosterol, als auch die Ratio zu Cholesterol waren bei Patienten mit positiver Familienanamnese signifikant erhöht. Für die Cholesterolvorläufer, Cholestanol sowie die Ratio aus Cholestanol zu Cholesterol konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Weiterhin untersuchten Matthan et al.⁵⁷ in einer klinischen Fall-Kontroll-Studie an 459 Teilnehmern der Framingham Offspring Studie (6. Zyklus) die **Beziehung zwischen der Cholesterolumöostase und KHK** sowie dem kardiovaskulären Risiko. Die Ergebnisse dieser Studie deuteten darauf hin, dass Veränderungen in der Cholesterolumöostase im Sinne einer erhöhten Cholesterolabsorption (Plasma Campesterol, Sitosterol und Cholestanol Konzentrationen) und einer verminderten Cholesterolsynthese (Plasma Desmosterol und Lathosterolkonzentrationen) mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind. Darüber hinaus stellten die Ergebnisse einer Fall-Kontroll-

Analyse der PROCAM-Studie heraus, dass bei Männern mit bereits erhöhtem Risiko für eine koronare Herzkrankheit erhöhte Sitosterolkonzentrationen sowie erhöhte Sitosterol/Cholesterol-Quotienten mit einem dreifach höheren Anstieg des Risikos für koronare Ereignisse assoziiert sind⁴. Außerdem konnte in einer prospektiven Analyse einer Folgeuntersuchung der LURIC Studie von Silbernagel et al.⁹⁶ gezeigt werden, dass eine erhöhte Resorption und verminderte Synthese von Cholesterol als Prädiktor einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität dient. Dies wurde durch die Ergebnisse einer weiteren Studie von Silbernagel et al.⁹⁷ unterstützt, in der eine Assoziation zwischen der erhöhten Schwere der KHK und einer erhöhten Cholesterolresorption / verminderten Cholesterolsynthese beobachtet wurde. In einer vorausgegangenen klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte demonstriert werden, dass Patienten, die mit Phytosterolestern angereicherte Margarine konsumierten, über eine fünffach erhöhte Sterolkonzentration im Aortenklappengewebe verfügten¹²⁶. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen einer weiteren Studie, deren Untersuchungsgegenstand die Veränderungen des Cholesterolmetabolismus in Bezug auf vaskuläre Erkrankungen war. Anhand dieser Studie konnte unsere Arbeitsgruppe¹²⁹ zeigen, dass eine gesteigerte Absorption (gemessen an Campesterol) und eine verminderte Synthese von Cholesterol (gemessen an Lathosterol) im Zusammenhang steht mit einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen und dem Vorliegen einer begleitenden koronaren Herzkrankheit bei Patienten mit Aortenklappenstenose.

Zusätzlich war es möglich bei Patienten mit chronischer **Niereninsuffizienz** festzustellen, dass eine veränderte Cholesterolhomöostase im Sinne einer vermehrten Cholesterolresorption und einer verminderten Cholesterolsynthese mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität assoziiert ist⁸⁶.

5.2.1.1.2 Tierexperimentelle Studien

Neben den Ergebnissen klinischer Studien deuten einige tierexperimentelle Untersuchungen auf die pro-atherogene Wirkung von Phytosterolen hin. In einer experimentellen Studie an Mäusen beobachtete unsere Arbeitsgruppe¹²⁸ einen Anstieg der pro-atherogenen Monozytensubpopulation ebenso wie eine verminderte Reduktion atherosklerotischer Läsionen bei Mäusen, die eine mit Phytosterolester-angereicherte im Gegensatz zu Phytostanolester-reichen Nahrung erhielten. Dies führte zu Vermutungen, dass Phytosterole aufgrund ihrer additiv proinflammatorischen Wirkung einen Beitrag zur Atherosklerose leisten. Zusätzlich zeigte unsere Arbeitsgruppe¹²⁶ in einer experimentellen Untersuchung an ApoE -/- Mäusen, dass eine diätische Supplementierung mit Phytosterolestern zur Induktion

endothelialer Dysfunktionen und einem Anstieg des ischämischen Areal nach Verschluss der Arteria cerebri media bei Wild-Typ-Mäusen - im Vergleich zu Ezetimib bei vergleichbarem Serumcholesterol - führte.

5.2.1.1.3 Molekulargenetische Studien

In einer Studie von Teupser und Kollegen¹⁰⁷ konnte an mehr als 27.000 Patienten erstmals eine direkte Beziehung zwischen den für den transmembranen Transport von Phytosterolen zuständigen Genen und dem Risiko für koronare Herzkrankheit beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass drei Polymorphismen auf den Genloci ABCG8 und AB0, die mit Phytosterolkonzentrationen assoziiert sind, in unabhängiger Assoziation mit koronarer Herzkrankheit stehen.

Obwohl diese Vielzahl von Hinweisen in Form von klinischen Studien, epidemiologischen Ergebnissen und auch experimentellen Untersuchungen stark auf die pro-atherogenen Effekte von pflanzlichen Sterolen und einer veränderten Cholesterolumöostase hindeuten, ist die Datenlage weiterhin nicht eindeutig.

5.2.1.2 Phytosterole - keine Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen

Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse einiger Studien, die keine Assoziation zwischen erhöhten Phytosterolkonzentrationen und Atherosklerose nachweisen konnten. Die systematische Beurteilung sowie Metanalyse von Genser und Kollegen³² - basierend auf 17 Studien unterschiedlichen Studiendesigns konnte keinen Zusammenhang zwischen dem pflanzlichen Sterollevel und kardiovaskulären Erkrankungen feststellen. Die Dallas Heart Studie, eine Fall-Kontroll-Studie von Wilund et al.¹³¹, konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Cholesterolabsorptionsmarker bei Patienten mit und ohne positive Familienanamnese feststellen. Zu beachten ist, dass die Charakterisierung der Teilnehmer dieser Studie nicht auf Basis der persönlichen Krankengeschichte erfolgte, sondern anhand der Familienanamnese für koronare Herzkrankheit. Darüber hinaus wurde nicht bei allen Patienten ein Kalzifikationsscore der Koronararterien erhoben, was die Aussagekraft der Studie reduziert. Des Weiteren war das durchschnittliche Alter der Studienteilnehmer jünger als bei vorausgehenden Arbeiten. Demzufolge sind Ausmaß und

Schwere der kardiovaskulären Erkrankung als niedriger zu erwarten und ein möglicher Erklärungsansatz für die fehlende Assoziation.

Die Ergebnisse der LASA Studie²⁷ unterstellen Phytosterolen darüber hinaus neutrale bis protektive Effekten bezüglich der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit. Ebenso berichten Escuriol und Kollegen²⁴, für die Kohorte der spanischen EPIC Studie⁷⁶ eine atheroprotektive Wirksamkeit der Phytosterole. Die Heterogenität der Baseline-Kriterien der vorliegenden Studien - wie mittleres Alter oder Lipoproteinprofil im Plasma - sind als kritisch zu bewerten. Es ist anzunehmen, dass Unterschiede dieser Charakteristika und „confounding factors“ Einfluss auf das Stadium der Erkrankung haben und sich in Folge dessen im Ausmaß und Richtung beobachteter Beziehungen auswirken¹²⁷.

5.2.1.3 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass in der Gesamtpopulation der Studie erhöhte Phytosterol zu Lathosterol Quotienten im Plasma sowie erhöhte Phytosterolkonzentrationen im Aortenklappengewebe bei Patienten mit AS in Assoziation mit einer begleitenden KHK stehen. Diese Effekte bestätigten sich in der Subgruppenanalyse als nicht signifikante Trends. Außerdem zeigten Patienten mit einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen im Gegensatz zu Patienten mit einer negativen Familienanamnese einen nicht signifikanten Trend zu höheren Phytosterolkonzentrationen ebenso wie zu höheren Phytosterol/Lathosterol-Quotienten und Phytosterol/Cholesterol-Quotienten im Plasma und Aortenklappen.

Der genaue Stellenwert der potenziell pro-atherogenen Wirkung der Phytosterole einerseits und der cholesterolsenkenden Effekte andererseits ist im Hinblick auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen derzeit noch umstritten und bedarf in Zukunft weiterer prospektiv klinischer Studien^{120, 121}.

5.3 Beziehung zwischen Oxyphytosterolen und kardiovaskulären Erkrankungen

5.3.1 Oxyphytosterole

Die Erkenntnis, dass Patienten mit Sitosterolämie einerseits über ein ausgeprägtes atherosklerotische Profil verfügen und andererseits über erhöhte Oxidationsprodukte der Phytosterole im Plasma, rückte das Interesse der oxidierten Phytosterolen als pro-

atherogener Mediator des kardiovaskulären Risikos zunehmend ins Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen^{78, 89}. Aufgrund ihrer chemischen Struktur sind Phytosterole anfällig für die Oxidation in verschiedenen Bereichen ihres Sterolgerüsts mit der Folge der Entstehung verschiedener pflanzlicher Steroloxidationsprodukte (POP)³¹. Inwieweit erhöhte Oxyphytosterolkonzentrationen eine Verbindung zwischen erhöhten Phytosterolkonzentrationen und einem erhöhten atherosklerotischen Profil darstellen, bleibt zentrales Thema vieler Debatten³¹.

Neben dem Zusammenhang der Phytosterol- sowie Oxyphytosterolkonzentrationen zwischen Plasma und Aortenklappe, wurde in der vorliegenden Arbeit die Beziehung zwischen Oxyphytosterolen und KHK sowie einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass eine Assoziation zwischen KHK und erhöhten Konzentrationen oxidiertes Campesterole in der Aortenklappe der Gesamtpopulation besteht. Dies ließ sich in einem nicht signifikanten Trend auch für die Subgruppe der Patienten ohne Statine erkennen. Darüber hinaus zeigte sich in der Gruppe aller Patienten eine Beziehung zwischen dem erhöhten Plasmaverhältnis der oxidierten Sitosterole zu Cholesterol und einer begleitenden KHK. In der Subgruppenanalyse ließ sich dieser Effekt ebenfalls im Trend bestätigen, jedoch ohne Signifikanz. In Bezug auf eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen war ein nicht signifikanter Trend zu erhöhten Oxyphytosterolkonzentrationen und erhöhten Verhältnissen der Oxyphytosterole zu Cholesterol in Plasma und Aortenklappe der Gesamtpopulation und Subgruppe festzustellen.

Der Großteil der Erkenntnisse bezüglich der Oxidationsprozesse von pflanzlichen Sterolen beruht - aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten - auf Studien zur Erforschung von Oxysterolen⁹⁹. Der zytotoxische Einfluss von oxidiertem Cholesterol sowie seine zentrale Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen konnte bisher in einer Vielzahl von Studien belegt werden^{8, 11, 53, 55}. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielfalt möglicher biologischer Wirkungen, einschließlich der Modulation der Cholesterolhomöostase, anti-inflammatorische sowie anti-kanzerogene Aktivitäten und anti-diabetische Eigenschaften in Verbindung mit spezifischen Oxyphytosterolen gebracht³⁹. Hinsichtlich der potentiell schädlichen Effekte pflanzlicher Oxidationsprodukte wie Atherogenität oder Toxizität sind in der Literatur bislang widersprüchliche Ergebnisse zu finden⁴¹.

5.3.2. Oxyphytosterole - Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen

Eine Reihe von experimentellen Studien deutet auf die potenziell schädlichen Effekte der Oxyphytosterole sowie die Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen hin.

So zeigten Plat und Kollegen in einer experimentellen Studie an weiblichen LDLR +/- Mäusen, dass der Verzehr von Oxyphytosterolen - ebenso wie der Verzehr von Oxysterolen - das Ausmaß schwerer atherosklerotischer Läsionen steigert⁸². Weiterhin zeigten Grandgirard und Kollegen³⁴ in einer tierexperimentellen Untersuchung an Hamstern, dass oxidierte Phytosterole in unterschiedlichen Gewebe wie Plasma, Aorta, Leber, Nieren und Herz aufgenommen werden und dort dosisabhängig akkumulieren. Die Zytotoxizität von Oxyphytosterolen im Vergleich zu Oxysterolen wurde zudem in einer experimentellen Studie von Adcox und Kollegen² untersucht. Vor dem Hintergrund, dass Lipid-beladene Schaumzellen (Makrophagen) frühe Vorstufen atherosklerotischer Läsionen bilden, wurde das Experiment auf Basis der kultivierten Makrophagen Zellreihen C57BL/6 durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass Oxidationsprodukte von β -Sitosterol sowie β -Campesterol das Wachstum kultivierter Makrophagen inhibieren und ein ähnliches Toxizitätsmuster wie Oxysterole aufweisen. Diese Ergebnisse legten die Überlegung nahe Lebensmittel mit hohen Phytosterolkonzentrationen hinsichtlich ihres potenziellen Beitrags als ernährungsbedingte Risikofaktoren sowie hinsichtlich des Überkonsums von assoziierten ölhaltigen Lebensmittel und deren Oxidationsprodukten zu überwachen.

Neben der potenziell proatherogenen Wirkung der Oxyphytosterole konnten weitere zytotoxische Effekte wie die Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen, die Induktion der Apoptose ebenso wie die Reduktion des Glutathionspiegels beobachtet werden^{56 49, 87}.

Inwieweit die beschriebenen zytotoxischen Effekte eine Rolle in der Entstehung von Atherosklerose spielen, ist derzeit noch nicht geklärt und muss in weiteren experimentellen sowie prospektiv klinischen Studien gezeigt werden.

5.3.3. Oxyphytosterole - keine Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen

Eine Reihe weiterer Studien konnte im Gegensatz dazu keine Assoziation zwischen Oxyphytosterole und kardiovaskulären Erkrankungen darstellen.

So konnte eine Studie von Vejux et al.¹¹⁵ an menschlichen Monozyten (U937) weder für Phytosterole noch für Oxyphytosterole Oxysterol-ähnliche Effekte feststellen. Ein „in vivo“ Experiment von Abramson-Zetterberg und Kollegen¹ hatte bei Mäusen, die mit oxidierten Phytosterolen angereichertes Futter erhielten, keine genotoxische Wirkung durch

Oxyphytosterole verzeichnen können. Eine Studie von Tomoyori et al.¹⁰⁸ zeigte in einer tierexperimentellen Untersuchung an ApoE defizienten Mäusen, dass exogen zugeführte POP aus der Nahrung gut resorbiert werden und in erheblichem Maß im Gewebe akkumulieren. Für die Entstehung von Atherosklerose konnten jedoch keine Hinweise gefunden werden. Zu beachten ist allerdings, dass die Effekte der Oxyphytosterole mit denen von Phytosterolen verglichen wurden und nicht mit einer atherogenen Kontrolldiät. Darüber hinaus war die Dauer der Studie im Vergleich zu der Untersuchung von Plat und Kollegen⁸² wesentlich kürzer, was die Vergleichbarkeit ebenso wie die Aussagekraft dieser Studie einschränkt.

5.3.4 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Assoziation zwischen erhöhten Konzentrationen oxidiertes Campesterole in Aortenklappen von Patienten mit AS und kardiovaskulären Erkrankungen hin. Weiterhin sprechen die Befund für die Beziehung zwischen erhöhten Quotienten oxidiertes Sitosterole zu Cholesterol im Plasma und dem Vorliegen einer KHK. Diese Effekte zeigten sich in der Gesamtpopulation der Studie und bestätigten sich in der Subgruppenanalyse als nicht signifikanter Trend. Ferner deuten die Ergebnisse auf einen nicht signifikanten Trend zu höheren Oxyphytosterolkonzentrationen im Plasma und Aortenklappen bei Patienten mit AS und einer positiven Familienanamnese hin. Bislang gibt es nur limitierte Daten bezüglich der Effekte von Oxyphytosterol-angereicherter Nahrung auf Atherosklerose. Die Ergebnisse verschiedener Studien in Zusammenschau mit der erhöhten Oxyphytosterolkonzentration bei Patienten mit Sitosterolämie lassen jedoch Spekulationen über pro-atherogene Effekte pflanzlicher Oxidationsprodukte zu. Um eine genaue Aussage über die biologischen Effekte von oxidierten Phytosterolen treffen zu können, bedarf es - neben „in vitro“ Experimenten an humanen Zellen - prospektive klinische Studien, die Informationen über die langfristigen Auswirkungen von physiologisch relevanten POP-Konzentrationen bei Menschen ohne Sitosterolämie aufzeigen.

5.4 Verhältnis von Cholestanol zu Cholesterol

Cholestanol stellt die 5 α -gesättigte-Form des Cholesterols⁹ dar und wird als Marker der intestinalen Cholesterolaufnahme beschrieben⁶⁴.

Silbernagel et al.⁹⁴ untersuchten in einer kürzlich veröffentlichten Studie die Cholestanol zu Cholesterol Ratio in Bezug auf die Assoziation mit 6 Einzelnukleotid-Polymorphismen in

ABCG8 und APOB und in Bezug auf die Assoziation mit CVD in einer Meta-Analyse. Sie suggerierten, dass eine hohe Cholesterolaufnahme, gemessen an der Cholestanol-zu-Cholesterol-Ratio, eher als zirkulierende Phytosterole, signifikant mit dem Risiko für CVD assoziiert ist. Diese Beziehung konnte lediglich an einer kleinen Anzahl von vier Beobachtungsstudien festgestellt werden. In diesen epidemiologischen Studien ist das Studiendesign ebenso wie die Anpassung von Störvariablen als heterogen zu bewerten. Auffällig war insbesondere, dass erhebliche Unterschiede in den Phytosterolkonzentrationen zwischen den einzelnen Studien zu sehen waren, die am ehesten auf unterschiedliche Messmethoden zurückzuführen sind¹²⁰. Ohne eine standardisierte Messmethode der Phytosterole sind vergleichende Studien sowie Meta-Analysen bisher publizierter Studien daher kritisch zu bewerten¹²⁰.

In einer Fall-Kontroll-Studie von Sudhop et al.¹⁰³ wurde die Beziehung zwischen einer positiven Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen und den Serum Phytosterolkonzentrationen im Plasma bei Patienten mit KHK untersucht. Für die Cholesterolvorstufen, Cholestanol sowie die Ratio aus Cholestanol zu Cholesterol konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten weder für die Absolutwerte von Cholestanol, noch für das Verhältnis zu Cholesterol in Plasma und Aortenklappen eine Assoziation mit einer begleitenden koronaren Herzkrankheit feststellen. Dies gilt sowohl für die Gruppe aller Patienten, also auch für die Gruppe der Patienten ohne Statinbehandlung. Weiterhin ließ sich keine Assoziation des Cholestanol zu Cholesterol Quotienten mit positiver Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen dokumentieren.

5.5 Limitationen der Studienergebnisse

Die vorliegende Studie bringt einige Limitationen mit sich. Zu Beginn der Studie wurden die Essgewohnheiten der Studienteilnehmer nicht detailliert kontrolliert. Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in den Ernährungsgewohnheiten zu Veränderungen der Konzentrationen der Phytosterole sowie Oxyphytosterole führen. Des Weiteren besteht die vorliegende Studienpopulation aus Patienten mit einer operationspflichtigen mittel- bis schwergradigen Aortenklappenstenose. Möglicherweise gelten die aufgezeigten Beziehungen lediglich für das untersuchte Patientenkollektiv und lassen sich nicht auf die gesunde Gesamtbevölkerung übertragen.

Zum Schutz vor Autoxidationsprodukten wurden Antioxidantien (BHT) den Proben hinzugefügt. Dennoch war kein hundertprozentiger Ausschluss von Autoxidationsprozessen

möglich, da die Aufbereitung und Bearbeitung der Proben nicht unter völligem Ausschluss von Sauerstoff erfolgte.

5.6 Potentielle klinische Bedeutung der Befunde und Ausblick

Abschließend ist festzuhalten, dass in der Gesamtpopulation der Studie eine vermehrte Cholesterolresorption und eine verminderte Cholesterolsynthese - gemessen durch den Plasmaquotienten aus Campesterol zu Lathosterol sowie Sitosterol zu Lathosterol - mit einer begleitenden KHK bei Patienten mit operationspflichtiger AS assoziiert sind. Dies bestätigte sich in der Subgruppenanalyse im Plasma als nicht signifikanter Trend. Die mögliche klinische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse besteht zum einen in der diagnostischen Verwendung und zum anderen in der differenzierten Behandlung von Patienten in Abhängigkeit ihres Cholesterolhomöostase-Profiles. So wäre es denkbar - insbesondere bei kardiovaskulären Risikopatienten - das Verhältnis aus Campesterol zu Lathosterol als Standardparameter für die Abschätzung der Resorptions- und Syntheseleistung hinsichtlich des Cholesterols zu verwenden^{124, 125}. Auf Basis dieser Abschätzung könnten individuelle Behandlungskonzepte - abgestimmt auf den Metabolismus jedes einzelnen Patienten - entwickelt werden. Patienten mit vermehrter intestinaler Cholesterolresorption könnten so neben der Standardmedikation der Cholesterolsenker zusätzlich auf Wirksubstanzen der Cholesterolresorption zurückgreifen.

Die Rolle der Phytosterole hinsichtlich atherosklerotischer Prozesse wird in der Literatur derzeit noch kontrovers diskutiert. Der Nettoeffekt des Phytosterolkonsums in Bezug auf die Cholesterolsenkung in Kombination mit der Erhöhung der Phytosterolkonzentrationen im Plasma ist aktuell unzureichend geklärt. Die Effekte der Phytosterole müssen in Studien mit klinisch relevanten Endpunkten untersucht und aufgezeigt werden¹⁷.

Bevor eine Aussage über potentielle klinische Bedeutungen der Oxyphytosterole im kardiovaskulären Gewebe gemacht werden kann, ist es erforderlich einige zentrale Fragestellungen zu klären. Zunächst wäre zu beantworten ob und in welchem Ausmaß dieser lokale Prozess an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist. Darüber hinaus sind plasmatische sowie lokale Faktoren herauszustellen, die einen Einfluss auf die Oxidation der Phytosterole durch eine Steigerung oder Inhibition haben. In einem weiteren Schritt wäre wichtig zu klären, welche genetischen Grundlagen diesem Prozess zugrunde liegen. Experimentelle Studien bevorzugt an humanen Zellen und Gewebe, klinische prospektive Langzeitstudien sowie epidemiologische Untersuchungen sind notwendig um eine adäquate Beantwortung einer Reihe noch ungeklärter Fragen zu ermöglichen.

Die weitere Verbreitung der Phytosterol-angereicherten Nahrungsmittel fordert die Aufklärung und Evaluation der biologischen Effekte der Oxyphytosterole, die über unterschiedliche Stoffwechselwege aus Phytosterolen gebildet werden. Da oxidierte Phytosterole auf der einen Seite in Assoziation mit pro-atherogenen Effekten stehen und auf der anderen Seite in Relation zu potenziell positiven Effekten beschrieben werden, ist es von großer Bedeutung dem Nettoeffekt aller möglichen Wirkungen besonderes Augenmerk zu schenken. Insbesondere prospektiv randomisierte klinische Langzeitstudien müssen die Rolle der Oxyphytosterole im menschlichen Organismus für ein besseres Verständnis der biologischen in vivo Effekte und Auswirkungen auf den Metabolismus klären. Da eine Reihe von Studien Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme, des Metabolismus und der Akkumulation der verschiedenen Oxyphytosterole aufgezeigt haben, muss eine differenzierte Betrachtung in Bezug auf mögliche toxische Wirkungen erfolgen^{6, 108}. Um dies zu gewährleisten, müssen zunächst Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der POP in Nahrungsmitteln, diätischen Produkten sowie biologischen Proben in Einklang gebracht werden. Eine Standardisierung der Quantifikation der Oxyphytosterole macht eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien möglich und gewährleistet eine sensitive, genaue Methodik zur Erhebung von zuverlässigen, reproduzierbaren Daten für die Basisuntersuchungen in Agrarwissenschaften, Ernährungswissenschaften sowie klinischer Forschungen¹²⁰.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der dargestellten Studie starke Korrelationen der Phytosterole mit ihren korrespondierenden Oxidationsprodukten in den Aortenklappen, hingegen lediglich schwache Korrelationen im Plasma. Für die Konzentrationen der Oxyphytosterole lassen sich allenfalls schwache Korrelationen zwischen Plasma und Aortenklappen beobachten. Schlussfolgernd deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die lokale Entstehung oder Akkumulation von Oxyphytosterolen im kardiovaskulären Gewebe hin.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 L. Abramsson-Zetterberg, M. Svensson, and L. Johnsson, 'No Evidence of Genotoxic Effect in Vivo of the Phytosterol Oxidation Products Triols and Epoxides', *Toxicol Lett*, 173 (2007), 132-9.
- 2 C. Adcox, L. Boyd, L. Oehrl, J. Allen, and G. Fenner, 'Comparative Effects of Phytosterol Oxides and Cholesterol Oxides in Cultured Macrophage-Derived Cell Lines', *J Agric Food Chem*, 49 (2001), 2090-5.
- 3 M. Aikawa, 'Effects of Statin Therapy on Vascular Dysfunction', *Coron Artery Dis*, 15 (2004), 227-33.
- 4 G. Assmann, P. Cullen, J. Erbey, D. R. Ramey, F. Kannenberg, and H. Schulte, 'Plasma Sitosterol Elevations Are Associated with an Increased Incidence of Coronary Events in Men: Results of a Nested Case-Control Analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (Procam) Study', *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 16 (2006), 13-21.
- 5 C. Baigent, A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, T. Sourjina, R. Peto, R. Collins, R. Simes, and Collaborators Cholesterol Treatment Trialists, 'Efficacy and Safety of Cholesterol-Lowering Treatment: Prospective Meta-Analysis of Data from 90,056 Participants in 14 Randomised Trials of Statins', *Lancet*, 366 (2005), 1267-78.
- 6 H. J. Bang, C. Arakawa, M. Takada, M. Sato, and K. Imaizumi, 'A Comparison of the Potential Unfavorable Effects of Oxysterol and Oxyphytosterol in Mice: Different Effects, on Cerebral 24s-Hydroxychoelsterol and Serum Triacylglycerols Levels', *Biosci Biotechnol Biochem*, 72 (2008), 3128-33.
- 7 A. K. Bhattacharyya, and W. E. Connor, 'Beta-Sitosterolemia and Xanthomatosis. A Newly Described Lipid Storage Disease in Two Sisters', *J Clin Invest*, 53 (1974), 1033-43.
- 8 I. Bjorkhem, and U. Diczfalusy, 'Oxysterols: Friends, Foes, or Just Fellow Passengers?', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (2002), 734-42.
- 9 K. M. Boberg, and S. Skrede, 'Content of Sitosterol, Cholestanol, and Cholesterol in Very Low Density Lipoproteins of Rat Liver Perfusate', *Scand J Gastroenterol*, 23 (1988), 442-8.
- 10 P. G. Bradford, and A. B. Awad, 'Phytosterols as Anticancer Compounds', *Mol Nutr Food Res*, 51 (2007), 161-70.
- 11 C. J. Brooks, W. A. Harland, and G. Steel, 'Squalene, 26-Hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol in Human Atheromatous Plaques', *Biochim Biophys Acta*, 125 (1966), 620-2.
- 12 C.J.W. Brooks, McKenna, R.M., Cole, W.J., MacLachlan, L., Lawrie, T.D.V., 'Profile Analysis of Oxygenated Sterols in Plasma and Serum', *Biochem. Soc. Trans.*, 11 (1983), 700-07.
- 13 J. M. Brown, T. A. Bell, 3rd, H. M. Alger, J. K. Sawyer, T. L. Smith, K. Kelley, R. Shah, M. D. Wilson, M. A. Davis, R. G. Lee, M. J. Graham, R. M. Croke, and L. L. Rudel, 'Targeted Depletion of Hepatic Acat2-Driven Cholesterol Esterification Reveals a Non-Biliary Route for Fecal Neutral Sterol Loss', *J Biol Chem*, 283 (2008), 10522-34.
- 14 G. Brufau, F. Kuipers, Y. Lin, E. A. Trautwein, and A. K. Groen, 'A Reappraisal of the Mechanism by Which Plant Sterols Promote Neutral Sterol Loss in Mice', *PLoS One*, 6 (2011), e21576.

- 15 European Heart Network and European Society of Cardiology, 'European Cardiovascular Disease Statistics', *European Heart Network and European Society of Cardiology*, 2012 Edition (2012), 1-129.
- 16 W. P. Castelli, 'Epidemiology of Coronary Heart Disease: The Framingham Study', *Am J Med*, 76 (1984), 4-12.
- 17 P. Clifton, 'Lowering Cholesterol - a Review on the Role of Plant Sterols', *Aust Fam Physician*, 38 (2009), 218-21.
- 18 P. M. Clifton, M. Noakes, D. Ross, A. Fassoulakis, M. Cehun, and P. Nestel, 'High Dietary Intake of Phytosterol Esters Decreases Carotenoids and Increases Plasma Plant Sterol Levels with No Additional Cholesterol Lowering', *J Lipid Res*, 45 (2004), 1493-9.
- 19 E. De Smet, R. P. Mensink, and J. Plat, 'Effects of Plant Sterols and Stanols on Intestinal Cholesterol Metabolism: Suggested Mechanisms from Past to Present', *Mol Nutr Food Res*, 56 (2012), 1058-72.
- 20 I. Demonty, R. T. Ras, H. C. van der Knaap, G. S. Duchateau, L. Meijer, P. L. Zock, J. M. Geleijnse, and E. A. Trautwein, 'Continuous Dose-Response Relationship of the Ldl-Cholesterol-Lowering Effect of Phytosterol Intake', *J Nutr*, 139 (2009), 271-84.
- 21 P. C. Dutta, 'Studies on Phytosterol Oxides. I: Effect of Storage on the Content in Potato Chips Prepared in Different Vegetable Oils', *JAOCs*, 74 (1997), 647-57.
- 22 EFSA, 'Efsa Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (Nda): Scientific Opinion on the Substantiation of a Health Claim Related to 3 G/Day Plant Stanols as Plant Stanol Esters and Lowering Blood Ldl Cholesterol and Reduced Risk of (Coronary) Heart Disease Pursuant to Article 14 of Regulation (Ec)', *EFSA Journal* (2012), 10(5):2692.
- 23 EFSA, 'Scientific Opinion on the Substantiation of a Health Claim Related to 3 G/Day Plant Sterols/Stanol and Lowering Blood Ldl-Cholesterol and Reduced Risk of (Coronary) Heart Disease Pursuant to Article 19 of Regulation (Ec)', *EFSA Journal* (2012), 10 (5): 2693.
- 24 V. Escuriol, M. Cofan, C. Moreno-Iribas, N. Larranaga, C. Martinez, C. Navarro, L. Rodriguez, C. A. Gonzalez, D. Corella, and E. Ros, 'Phytosterol Plasma Concentrations and Coronary Heart Disease in the Prospective Spanish Epic Cohort', *J Lipid Res*, 51 (2010), 618-24.
- 25 Prevention European Association for Cardiovascular, Rehabilitation, Z. Reiner, A. L. Catapano, G. De Backer, I. Graham, M. R. Taskinen, O. Wiklund, S. Agewall, E. Alegria, M. J. Chapman, P. Durrington, S. Erdine, J. Halcox, R. Hobbs, J. Kjekshus, P. P. Filardi, G. Riccardi, R. F. Storey, D. Wood, E. S. C. Committee for Practice Guidelines, and Committees, 'Esc/Eas Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (Esc) and the European Atherosclerosis Society (Eas)', *Eur Heart J*, 32 (2011), 1769-818.
- 26 Evaluation Expert Panel on Detection, and Adults Treatment of High Blood Cholesterol in, 'Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (Ncep) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel Iii)', *JAMA*, 285 (2001), 2486-97.
- 27 K. Fassbender, D. Lutjohann, M. G. Dik, M. Bremmer, J. Konig, S. Walter, Y. Liu, M. Letiembre, K. von Bergmann, and C. Jonker, 'Moderately Elevated Plant Sterol Levels Are Associated with Reduced Cardiovascular Risk--the Lasa Study', *Atherosclerosis*, 196 (2008), 283-8.
- 28 F. Fuentes, J. Lopez-Miranda, A. Garcia, P. Perez-Martinez, J. Moreno, M. Cofan, J. Caballero, J. A. Paniagua, E. Ros, and F. Perez-Jimenez, 'Basal Plasma Concentrations of Plant Sterols Can Predict Ldl-C Response to Sitosterol in Patients with Familial Hypercholesterolemia', *Eur J Clin Nutr*, 62 (2008), 495-501.

- 29 C. Gagne, H. E. Bays, S. R. Weiss, P. Mata, K. Quinto, M. Melino, M. Cho, T. A. Musliner, B. Gumbiner, and Group Ezetimibe Study, 'Efficacy and Safety of Ezetimibe Added to Ongoing Statin Therapy for Treatment of Patients with Primary Hypercholesterolemia', *Am J Cardiol*, 90 (2002), 1084-91.
- 30 A. Gallino, M. Stuber, F. Crea, E. Falk, R. Corti, J. Lekakis, J. Schwitter, P. Camici, O. Gaemperli, M. Di Valentino, J. Prior, H. M. Garcia-Garcia, C. Vlachopoulos, F. Cosentino, S. Windecker, G. Pedrazzini, R. Conti, F. Mach, R. De Caterina, and P. Libby, '"In Vivo" Imaging of Atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 224 (2012), 25-36.
- 31 G. Garcia-Llatas, and M. T. Rodriguez-Estrada, 'Current and New Insights on Phytosterol Oxides in Plant Sterol-Enriched Food', *Chem Phys Lipids*, 164 (2011), 607-24.
- 32 B. Genser, G. Silbernagel, G. De Backer, E. Bruckert, R. Carmena, M. J. Chapman, J. Deanfield, O. S. Descamps, E. R. Rietzschel, K. C. Dias, and W. Marz, 'Plant Sterols and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Eur Heart J*, 33 (2012), 444-51.
- 33 C. J. Glueck, J. Speirs, T. Tracy, P. Streicher, E. Illig, and J. Vandegrift, 'Relationships of Serum Plant Sterols (Phytosterols) and Cholesterol in 595 Hypercholesterolemic Subjects, and Familial Aggregation of Phytosterols, Cholesterol, and Premature Coronary Heart Disease in Hyperphytosterolemic Proband and Their First-Degree Relatives', *Metabolism*, 40 (1991), 842-8.
- 34 A. Grandgirard, J. Demaison-Meloche, C. Cordelet, and L. Demaison, 'Incorporation of Oxyphytosterols in Tissues of Hamster', *Reprod Nutr Dev*, 44 (2004), 599-608.
- 35 M. A. Hartmann, 'Plant Sterols and the Membrane Environment', *Trends in Plants Sci*, 3 (1998), 170-75.
- 36 Group Heart Protection Study Collaborative, 'Mrc/Bhf Heart Protection Study of Antioxidant Vitamin Supplementation in 20,536 High-Risk Individuals: A Randomised Placebo-Controlled Trial', *Lancet*, 360 (2002), 23-33.
- 37 S. Helske, T. Miettinen, H. Gylling, M. Mayranpaa, J. Lommi, H. Turto, K. Werkkala, M. Kupari, and P. T. Kovanen, 'Accumulation of Cholesterol Precursors and Plant Sterols in Human Stenotic Aortic Valves', *J Lipid Res*, 49 (2008), 1511-8.
- 38 H. F. Hendriks, J. A. Weststrate, T. van Vliet, and G. W. Meijer, 'Spreads Enriched with Three Different Levels of Vegetable Oil Sterols and the Degree of Cholesterol Lowering in Normocholesterolaemic and Mildly Hypercholesterolaemic Subjects', *Eur J Clin Nutr*, 53 (1999), 319-27.
- 39 E. Hovenkamp, I. Demonty, J. Plat, D. Lutjohann, R. P. Mensink, and E. A. Trautwein, 'Biological Effects of Oxidized Phytosterols: A Review of the Current Knowledge', *Prog Lipid Res*, 47 (2008), 37-49.
- 40 C. Husche, 'Standard Operating Procedure (Sop) for Determination of Oxyphytosterols in Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry', 1 (2011), 1-17.
- 41 C. Husche, O. Weingartner, H. Pettersson, T. Vanmierlo, M. Bohm, U. Laufs, and D. Lutjohann, 'Validation of an Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Analysis of 7-Oxygenated Campesterol and Sitosterol in Human Serum', *Chem Phys Lipids*, 164 (2011), 425-31.
- 42 S. John, A. V. Sorokin, and P. D. Thompson, 'Phytosterols and Vascular Disease', *Curr Opin Lipidol*, 18 (2007), 35-40.
- 43 L. Johnsson, and P. C. Dutta, 'Determination of Phytosterol Oxides in Some Food Products by Using an Optimized Transesterification Method', *Food Chem*, 97 (2006), 606-13.

- 44 W. B. Kannel, W. P. Castelli, T. Gordon, and P. M. McNamara, 'Serum Cholesterol, Lipoproteins, and the Risk of Coronary Heart Disease. The Framingham Study', *Ann Intern Med*, 74 (1971), 1-12.
- 45 M. B. Katan, S. M. Grundy, P. Jones, M. Law, T. Miettinen, R. Paoletti, and Participants Stresa Workshop, 'Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels', *Mayo Clin Proc*, 78 (2003), 965-78.
- 46 S. Kidambi, and S. B. Patel, 'Sitosterolaemia: Pathophysiology, Clinical Presentation and Laboratory Diagnosis', *J Clin Pathol*, 61 (2008), 588-94.
- 47 K. Kuhlmann, O. Lindtner, A. Bauch, G. Ritter, B. Woerner, and B. Niemann, 'Simulation of Prospective Phytosterol Intake in Germany by Novel Functional Foods', *Br J Nutr*, 93 (2005), 377-85.
- 48 U. Laufs, C. Hamm, and M. Bohm, 'Statintherapie Bei Koronarer Herzkrankheit', *Deutsches Ärzteblatt*, 103 (2006), 2714-18.
- 49 Y. T. Liang, W. T. Wong, L. Guan, X. Y. Tian, K. Y. Ma, Y. Huang, and Z. Y. Chen, 'Effect of Phytosterols and Their Oxidation Products on Lipoprotein Profiles and Vascular Function in Hamster Fed a High Cholesterol Diet', *Atherosclerosis*, 219 (2011), 124-33.
- 50 J. K. Liao, and U. Laufs, 'Pleiotropic Effects of Statins', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45 (2005), 89-118.
- 51 P. Libby, 'Inflammation in Atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012), 2045-51.
- 52 P. Libby, 'Inflammation in Atherosclerosis', *Nature*, 420 (2002), 868-74.
- 53 P. Libby, M. DiCarli, and R. Weissleder, 'The Vascular Biology of Atherosclerosis and Imaging Targets', *J Nucl Med*, 51 Suppl 1 (2010), 33S-37S.
- 54 A. H. Lichtenstein, L. J. Appel, M. Brands, M. Carnethon, S. Daniels, H. A. Franch, B. Franklin, P. Kris-Etherton, W. S. Harris, B. Howard, N. Karanja, M. Lefevre, L. Rudel, F. Sacks, L. Van Horn, M. Winston, and J. Wylie-Rosett, 'Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement from the American Heart Association Nutrition Committee', *Circulation*, 114 (2006), 82-96.
- 55 A. J. Lusis, 'Atherosclerosis', *Nature*, 407 (2000), 233-41.
- 56 L. Maguire, M. Konoplyannikov, A. Ford, A. R. Maguire, and N. M. O'Brien, 'Comparison of the Cytotoxic Effects of Beta-Sitosterol Oxides and a Cholesterol Oxide, 7beta-Hydroxycholesterol, in Cultured Mammalian Cells', *Br J Nutr*, 90 (2003), 767-75.
- 57 N. R. Matthan, M. Pencina, J. M. LaRocque, P. F. Jacques, R. B. D'Agostino, E. J. Schaefer, and A. H. Lichtenstein, 'Alterations in Cholesterol Absorption/Synthesis Markers Characterize Framingham Offspring Study Participants with Chd', *J Lipid Res*, 50 (2009), 1927-35.
- 58 R. P. Mensink, A. de Jong, D. Lutjohann, G. R. Haenen, and J. Plat, 'Plant Stanols Dose-Dependently Decrease Ldl-Cholesterol Concentrations, but Not Cholesterol-Standardized Fat-Soluble Antioxidant Concentrations, at Intakes up to 9 G/D', *Am J Clin Nutr*, 92 (2010), 24-33.
- 59 T. A. Miettinen, 'Detection of Changes in Human Cholesterol Metabolism', *Ann Clin Res*, 2 (1970), 300-20.
- 60 T. A. Miettinen, and H. Gylling, 'Effect of Statins on Noncholesterol Sterol Levels: Implications for Use of Plant Stanols and Sterols', *Am J Cardiol*, 96 (2005), 40D-46D.

- 61 T. A. Miettinen, H. Gylling, T. Strandberg, and S. Sarna, 'Baseline Serum Cholestanol as Predictor of Recurrent Coronary Events in Subgroup of Scandinavian Simvastatin Survival Study. Finnish 4s Investigators', *BMJ*, 316 (1998), 1127-30.
- 62 T. A. Miettinen, P. Puska, H. Gylling, H. Vanhanen, and E. Vartiainen, 'Reduction of Serum Cholesterol with Sitostanol-Ester Margarine in a Mildly Hypercholesterolemic Population', *N Engl J Med*, 333 (1995), 1308-12.
- 63 T. A. Miettinen, T. E. Strandberg, and H. Gylling, 'Noncholesterol Sterols and Cholesterol Lowering by Long-Term Simvastatin Treatment in Coronary Patients: Relation to Basal Serum Cholestanol', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (2000), 1340-6.
- 64 T. A. Miettinen, R. S. Tilvis, and Y. A. Kesaniemi, 'Serum Cholestanol and Plant Sterol Levels in Relation to Cholesterol Metabolism in Middle-Aged Men', *Metabolism*, 38 (1989), 136-40.
- 65 T. A. Miettinen, R. S. Tilvis, and Y. A. Kesaniemi, 'Serum Plant Sterols and Cholesterol Precursors Reflect Cholesterol Absorption and Synthesis in Volunteers of a Randomly Selected Male Population', *Am J Epidemiol*, 131 (1990), 20-31.
- 66 J. A. Milner, 'Functional Foods: The Us Perspective', *Am J Clin Nutr*, 71 (2000), 1654S-9S; discussion 74S-5S.
- 67 K. Musa-Veloso, T. H. Poon, J. A. Elliot, and C. Chung, 'A Comparison of the Ldl-Cholesterol Lowering Efficacy of Plant Stanols and Plant Sterols over a Continuous Dose Range: Results of a Meta-Analysis of Randomized, Placebo-Controlled Trials', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 85 (2011), 9-28.
- 68 J. Nourooz-Zadeh, and L. A. Appelqvist, 'Isolation and Quantitative Determination of Sterol Oxides in Plant-Based Foods: Soybean Oil and Wheat Flour', *JAOCS*, 69 (1992), 288-93.
- 69 F. H. O'Neill, T. A. Sanders, and G. R. Thompson, 'Comparison of Efficacy of Plant Stanol Ester and Sterol Ester: Short-Term and Longer-Term Studies', *Am J Cardiol*, 96 (2005), 29D-36D.
- 70 A. Otaegui-Arrazola, M. Menendez-Carreno, D. Ansorena, and I. Astiasaran, 'Oxysterols: A World to Explore', *Food Chem Toxicol*, 48 (2010), 3289-303.
- 71 M. D. Patel, and P. D. Thompson, 'Phytosterols and Vascular Disease', *Atherosclerosis*, 186 (2006), 12-9.
- 72 S. B. Patel, G. Salen, H. Hidaka, P. O. Kwiterovich, A. F. Stalenhoef, T. A. Miettinen, S. M. Grundy, M. H. Lee, J. S. Rubenstein, M. H. Polymeropoulos, and M. J. Brownstein, 'Mapping a Gene Involved in Regulating Dietary Cholesterol Absorption. The Sitosterolemia Locus Is Found at Chromosome 2p21', *J Clin Invest*, 102 (1998), 1041-4.
- 73 T. Pearson, M. Denke, P. McBride, W. P. Battisti, W. E. Brady, and J. Palmisano, 'Effectiveness of the Addition of Ezetimibe to Ongoing Statin Therapy in Modifying Lipid Profiles and Attaining Low-Density Lipoprotein Cholesterol Goals in Older and Elderly Patients: Subanalyses of Data from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial', *Am J Geriatr Pharmacother*, 3 (2005), 218-28.
- 74 J. Perk, G. De Backer, H. Gohlke, I. Graham, Z. Reiner, W. M. Verschuren, C. Albus, P. Benlian, G. Boysen, R. Cifkova, C. Deaton, S. Ebrahim, M. Fisher, G. Germano, R. Hobbs, A. Hoes, S. Karadeniz, A. Mezzani, E. Prescott, L. Ryden, M. Scherer, M. Syvanne, W. J. Scholte Op Reimer, C. Vrints, D. Wood, J. L. Zamorano, F. Zannad, Cardiology Fifth Joint Task Force of the European Society of, Practice Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical, Prevention European Association for Cardiovascular, and Rehabilitation, 'European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease

- Prevention in Clinical Practice (Constituted by Representatives of Nine Societies and by Invited Experts)', *Atherosclerosis*, 223 (2012), 1-68.
- 75 D. W. Peterson, 'Effect of Soybean Sterols in the Diet on Plasma and Liver Cholesterol in Chicks', *Proc Soc Exp Biol Med*, 78 (1951), 143-7.
- 76 S. Pinedo, M. N. Vissers, K. von Bergmann, K. Elharchaoui, D. Lutjohann, R. Luben, N. J. Wareham, J. J. Kastelein, K. T. Khaw, and S. M. Boekholdt, 'Plasma Levels of Plant Sterols and the Risk of Coronary Artery Disease: The Prospective Epic-Norfolk Population Study', *J Lipid Res*, 48 (2007), 139-44.
- 77 J. Plat, M. C. Bragt, and R. P. Mensink, 'Common Sequence Variations in Abcg8 Are Related to Plant Sterol Metabolism in Healthy Volunteers', *J Lipid Res*, 46 (2005), 68-75.
- 78 J. Plat, H. Brzezinka, D. Lutjohann, R. P. Mensink, and K. von Bergmann, 'Oxidized Plant Sterols in Human Serum and Lipid Infusions as Measured by Combined Gas-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry', *J Lipid Res*, 42 (2001), 2030-8.
- 79 J. Plat, D. Mackay, S. Baumgartner, P. M. Clifton, H. Gylling, and P. J. Jones, 'Progress and Prospective of Plant Sterol and Plant Stanol Research: Report of the Maastricht Meeting', *Atherosclerosis*, 225 (2012), 521-33.
- 80 J. Plat, and R. P. Mensink, 'Effects of Plant Stanol Esters on Ldl Receptor Protein Expression and on Ldl Receptor and Hmg-Coa Reductase Mrna Expression in Mononuclear Blood Cells of Healthy Men and Women', *FASEB J*, 16 (2002), 258-60.
- 81 J. Plat, and R. P. Mensink, 'Plant Stanol and Sterol Esters in the Control of Blood Cholesterol Levels: Mechanism and Safety Aspects', *Am J Cardiol*, 96 (2005), 15D-22D.
- 82 J. Plat, E. Theuwissen, C. Husche, D. Lutjohann, M. J. Gijbels, M. Jeurissen, R. Shiri-Sverdlov, I. van der Made, and R. P. Mensink, 'Oxidised Plant Sterols as Well as Oxysterols Increase the Proportion of Severe Atherosclerotic Lesions in Female Ldl Receptor+/- Mice', *Br J Nutr*, 111 (2014), 64-70.
- 83 R. A. Rajaratnam, H. Gylling, and T. A. Miettinen, 'Independent Association of Serum Squalene and Noncholesterol Sterols with Coronary Artery Disease in Postmenopausal Women', *J Am Coll Cardiol*, 35 (2000), 1185-91.
- 84 'Randomised Trial of Cholesterol Lowering in 4444 Patients with Coronary Heart Disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4s)', *Lancet*, 344 (1994), 1383-9.
- 85 H. Renz-Polster, and S. Krautzig, 'Basislehrbuch Innere Medizin', *Elsevier GmbH, URBAN & FISCHER Verlag, München*, 4 (2008), 67.
- 86 K. S. Rogacev, T. Pinsdorf, O. Weingartner, M. K. Gerhart, E. Welzel, K. van Bentum, J. Popp, A. Menzner, D. Fliser, D. Lutjohann, and G. H. Heine, 'Cholesterol Synthesis, Cholesterol Absorption, and Mortality in Hemodialysis Patients', *Clin J Am Soc Nephrol*, 7 (2012), 943-8.
- 87 E. Ryan, J. Chopra, F. McCarthy, A. R. Maguire, and N. M. O'Brien, 'Qualitative and Quantitative Comparison of the Cytotoxic and Apoptotic Potential of Phytosterol Oxidation Products with Their Corresponding Cholesterol Oxidation Products', *Br J Nutr*, 94 (2005), 443-51.
- 88 F. M. Sacks, A. M. Tonkin, J. Shepherd, E. Braunwald, S. Cobbe, C. M. Hawkins, A. Keech, C. Packard, J. Simes, R. Byington, and C. D. Furberg, 'Effect of Pravastatin on Coronary Disease Events in Subgroups Defined by Coronary Risk Factors: The Prospective Pravastatin Pooling Project', *Circulation*, 102 (2000), 1893-900.
- 89 G. Salen, I. Horak, M. Rothkopf, J. L. Cohen, J. Speck, G. S. Tint, V. Shore, B. Dayal, T. Chen, and S. Shefer, 'Lethal Atherosclerosis Associated with Abnormal Plasma and

- Tissue Sterol Composition in Sitosterolemia with Xanthomatosis', *J Lipid Res*, 26 (1985), 1126-33.
- 90 P. Salo, and I. Wester, 'Low-Fat Formulations of Plant Stanols and Sterols', *Am J Cardiol*, 96 (2005), 51D-54D.
- 91 H. F. Schott, A. Luister, C. Husche, H. J. Schafers, M. Bohm, J. Plat, D. Lutjohann, U. Laufs, and O. Weingartner, 'The Relationships of Phytosterols and Oxyphytosterols in Plasma and Aortic Valve Cusps in Patients with Severe Aortic Stenosis', *Biochem Biophys Res Commun* (2014).
- 92 Group Sharp Collaborative, 'Study of Heart and Renal Protection (Sharp): Randomized Trial to Assess the Effects of Lowering Low-Density Lipoprotein Cholesterol among 9,438 Patients with Chronic Kidney Disease', *Am Heart J*, 160 (2010), 785-94 e10.
- 93 J. Shepherd, S. M. Cobbe, I. Ford, C. G. Isles, A. R. Lorimer, P. W. MacFarlane, J. H. McKillop, and C. J. Packard, 'Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group', *N Engl J Med*, 333 (1995), 1301-7.
- 94 G. Silbernagel, M. J. Chapman, B. Genser, M. E. Kleber, G. Fauler, H. Scharnagl, T. B. Grammer, B. O. Boehm, K. M. Makela, M. Kahonen, R. Carmena, E. R. Rietzschel, E. Bruckert, J. E. Deanfield, T. A. Miettinen, O. T. Raitakari, T. Lehtimaki, and W. Marz, 'High Intestinal Cholesterol Absorption Is Associated with Cardiovascular Disease and Risk Alleles in Abcg8 and Abo: Evidence from the Luric and Yfs Cohorts and from a Meta-Analysis', *J Am Coll Cardiol* (2013).
- 95 G. Silbernagel, M. J. Chapman, B. Genser, M. E. Kleber, G. Fauler, H. Scharnagl, T. B. Grammer, K. M. Makela, M. Kahonen, R. Carmena, E. R. Rietzschel, E. Bruckert, J. E. Deanfield, O. T. Raitakari, T. Lehtimaki, and W. Marz, 'Reply to Letter to the Editor: "High Intestinal Cholesterol Absorption Is Associated with Cardiovascular Disease and Risk Alleles in Abcg8 and Abo: Evidence from the Luric and Yfs Cohorts and from a Meta-Analysis"', *J Am Coll Cardiol* (2013).
- 96 G. Silbernagel, G. Fauler, M. M. Hoffmann, D. Lutjohann, B. R. Winkelmann, B. O. Boehm, and W. Marz, 'The Associations of Cholesterol Metabolism and Plasma Plant Sterols with All-Cause and Cardiovascular Mortality', *J Lipid Res*, 51 (2010), 2384-93.
- 97 G. Silbernagel, G. Fauler, W. Renner, E. M. Landl, M. M. Hoffmann, B. R. Winkelmann, B. O. Boehm, and W. Marz, 'The Relationships of Cholesterol Metabolism and Plasma Plant Sterols with the Severity of Coronary Artery Disease', *J Lipid Res*, 50 (2009), 334-41.
- 98 T. Skjaerpe, L. Hegrenaes, and L. Hatle, 'Noninvasive Estimation of Valve Area in Patients with Aortic Stenosis by Doppler Ultrasound and Two-Dimensional Echocardiography', *Circulation*, 72 (1985), 810-8.
- 99 L. L. Smith, 'Review of Progress in Sterol Oxidations: 1987-1995', *Lipids*, 31 (1996), 453-87.
- 100 H. C. Sary, A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler, 'A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Circulation*, 92 (1995), 1355-74.
- 101 H. C. Sary, A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler, 'A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Arterioscler Thromb*, 14 (1994), 840-56.

- 102 T. E. Strandberg, R. S. Tilvis, K. H. Pitkala, and T. A. Miettinen, 'Cholesterol and Glucose Metabolism and Recurrent Cardiovascular Events among the Elderly: A Prospective Study', *J Am Coll Cardiol*, 48 (2006), 708-14.
- 103 T. Sudhop, B. M. Gottwald, and K. von Bergmann, 'Serum Plant Sterols as a Potential Risk Factor for Coronary Heart Disease', *Metabolism*, 51 (2002), 1519-21.
- 104 T. Sudhop, and K. von Bergmann, 'Sitosterolemia--a Rare Disease. Are Elevated Plant Sterols an Additional Risk Factor?', *Z Kardiol*, 93 (2004), 921-8.
- 105 W. H. F. Sutherland, M. J. A. Williams, E. R. Nye, N. J. Restieaux, S. A. De Jong, and H. L. Walker, 'Associations of Plasma Non-Cholesterol Sterol Levels with Severity of Coronary Artery Disease', *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 8 (1998), 386-91.
- 106 R. Talati, D. M. Sobieraj, S. S. Makanji, O. J. Phung, and C. I. Coleman, 'The Comparative Efficacy of Plant Sterols and Stanols on Serum Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis', *J Am Diet Assoc*, 110 (2010), 719-26.
- 107 D. Teupser, R. Baber, U. Ceglarek, M. Scholz, T. Illig, C. Gieger, L. M. Holdt, A. Leichtle, K. H. Greiser, D. Huster, P. Linsel-Nitschke, A. Schafer, P. S. Braund, L. Tiret, K. Stark, D. Raaz-Schrauder, G. M. Fiedler, W. Wilfert, F. Beutner, S. Gielen, A. Grosshennig, I. R. Konig, P. Lichtner, I. M. Heid, A. Kluttig, N. E. El Mokhtari, D. Rubin, A. B. Ekici, A. Reis, C. D. Garlachs, A. S. Hall, G. Matthes, C. Wittekind, C. Hengstenberg, F. Cambien, S. Schreiber, K. Werdan, T. Meitinger, M. Loeffler, N. J. Samani, J. Erdmann, H. E. Wichmann, H. Schunkert, and J. Thiery, 'Genetic Regulation of Serum Phytosterol Levels and Risk of Coronary Artery Disease', *Circ Cardiovasc Genet*, 3 (2010), 331-9.
- 108 H. Tomoyori, Y. Kawata, T. Higuchi, I. Ichi, H. Sato, M. Sato, I. Ikeda, and K. Imaizumi, 'Phytosterol Oxidation Products Are Absorbed in the Intestinal Lymphatics in Rats but Do Not Accelerate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice', *J Nutr*, 134 (2004), 1690-6.
- 109 A. Tonello, and G. Poli, 'Serum Phytosterols Not Only from Dietary Intake', *Br J Nutr*, 96 (2006), 791-2.
- 110 E. Turchetto, G. Lercker, and R. Bortolomeazzi, 'Oxisterol Determination in Selected Coffees', *Toxicol Ind Health*, 9 (1993), 519-27.
- 111 'Umsatz Mit Functional Food in Deutschland', *Deutscher Fachverlag Lebensmittelzeitung*, 03 (2011), 34. gefunden via Statista
[http://de.statista.com/statistik/daten/studie/173289/umfrage/Functional-Food---Umsatz-in-Deutschland-\(Zeitreihe\)/](http://de.statista.com/statistik/daten/studie/173289/umfrage/Functional-Food---Umsatz-in-Deutschland-(Zeitreihe)/)
- 112 J. N. van der Veen, T. H. van Dijk, C. L. Vrans, H. van Meer, R. Havinga, K. Bijsterveld, U. J. Tietge, A. K. Groen, and F. Kuipers, 'Activation of the Liver X Receptor Stimulates Trans-Intestinal Excretion of Plasma Cholesterol', *J Biol Chem*, 284 (2009), 19211-9.
- 113 T. Vanmierlo, C. Husche, H. F. Schott, H. Pettersson, and D. Lutjohann, 'Plant Sterol Oxidation Products--Analogues to Cholesterol Oxidation Products from Plant Origin?', *Biochimie*, 95 (2013), 464-72.
- 114 T. Vanmierlo, O. Weingartner, S. van der Pol, C. Husche, A. Kerksiek, S. Friedrichs, E. Sijbrands, H. Steinbusch, M. Grimm, T. Hartmann, U. Laufs, M. Bohm, H. E. de Vries, M. Mulder, and D. Lutjohann, 'Dietary Intake of Plant Sterols Stably Increases Plant Sterol Levels in the Murine Brain', *J Lipid Res*, 53 (2012), 726-35.
- 115 A. Vejux, T. Montange, L. Martine, A. Zarrouk, J. M. Riedinger, and G. Lizard, 'Absence of Oxysterol-Like Side Effects in Human Monocytic Cells Treated with Phytosterols and Oxyphytosterols', *J Agric Food Chem*, 60 (2012), 4060-6.
- 116 K. von Bergmann, T. Sudhop, and D. Lutjohann, 'Cholesterol and Plant Sterol Absorption: Recent Insights', *Am J Cardiol*, 96 (2005), 10D-14D.

- 117 N. J. Wald, and M. R. Law, 'Serum Cholesterol and Ischaemic Heart Disease', *Atherosclerosis*, 118 Suppl (1995), S1-5.
- 118 J. L. Weihrauch, and J. M. Gardner, 'Sterol Content of Foods of Plant Origin', *J Am Diet Assoc*, 73 (1978), 39-47.
- 119 N. Weingartner, 'Assoziation Der Cholesterinhomöostase Mit Koronarer Herzerkrankung Bei Patienten Mit Aortenklappenstenose', *Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes* (2011).
- 120 O. Weingartner, I. Bjorkhem, and D. Lutjohann, 'Intestinal Cholesterol Absorption and Cardiovascular Risk', *J Am Coll Cardiol*, 63 (2014), 695-6.
- 121 O. Weingartner, M. Bohm, and U. Laufs, 'Controversial Role of Plant Sterol Esters in the Management of Hypercholesterolaemia', *Eur Heart J*, 30 (2009), 404-9.
- 122 O. Weingartner, M. Bohm, and U. Laufs, 'Plant Sterols as Dietary Supplements for the Prevention of Cardiovascular Diseases', *Dtsch Med Wochenschr*, 133 (2008), 1201-4.
- 123 O. Weingartner, and U. Laufs, '[Primary and Secondary Prevention of the Acute Coronary Syndrome]', *Hamostaseologie*, 26 (2006), 158-66; quiz 67-8.
- 124 O. Weingartner, D. Lutjohann, M. Bohm, and U. Laufs, 'Cholesterol Homeostasis and Cardiovascular Risk', *Dtsch Med Wochenschr*, 136 (2011), 34-8.
- 125 O. Weingartner, D. Lutjohann, M. Bohm, and U. Laufs, 'Relationship between Cholesterol Synthesis and Intestinal Absorption Is Associated with Cardiovascular Risk', *Atherosclerosis*, 210 (2010), 362-5.
- 126 O. Weingartner, D. Lutjohann, S. Ji, N. Weisshoff, F. List, T. Sudhop, K. von Bergmann, K. Gertz, J. König, H. J. Schafers, M. Endres, M. Bohm, and U. Laufs, 'Vascular Effects of Diet Supplementation with Plant Sterols', *J Am Coll Cardiol*, 51 (2008), 1553-61.
- 127 O. Weingartner, D. Lutjohann, T. Vanmierlo, S. Müller, L. Günther, W. Herrmann, M. Bohm, U. Laufs, and M. Herrmann, 'Markers of Enhanced Cholesterol Absorption Are a Strong Predictor for Cardiovascular Diseases in Patients without Diabetes Mellitus', *Chem Phys Lipids*, 164 (2011), 451-6.
- 128 O. Weingartner, C. Ulrich, D. Lutjohann, K. Ismail, S. H. Schirmer, T. Vanmierlo, M. Bohm, and U. Laufs, 'Differential Effects on Inhibition of Cholesterol Absorption by Plant Stanol and Plant Sterol Esters in Apoe^{-/-} Mice', *Cardiovasc Res*, 90 (2011), 484-92.
- 129 O. Weingartner, N. Weingartner, B. Scheller, D. Lutjohann, S. Graber, H. J. Schafers, M. Bohm, and U. Laufs, 'Alterations in Cholesterol Homeostasis Are Associated with Coronary Heart Disease in Patients with Aortic Stenosis', *Coron Artery Dis*, 20 (2009), 376-82.
- 130 P. E. Westerweel, M. C. Verhaar, and T. J. Rabelink, '[Pleiotropic Effects of Statins]', *Ned Tijdschr Geneesk*, 148 (2004), 1431-5.
- 131 K. R. Wilund, L. Yu, F. Xu, G. L. Vega, S. M. Grundy, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs, 'No Association between Plasma Levels of Plant Sterols and Atherosclerosis in Mice and Men', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 (2004), 2326-32.
- 132 T. A. Woyengo, V. R. Ramprasath, and P. J. Jones, 'Anticancer Effects of Phytosterols', *Eur J Clin Nutr*, 63 (2009), 813-20.
- 133 H. L. Zhao, A. H. Houweling, C. A. Vanstone, S. Jew, E. A. Trautwein, G. S. Duchateau, and P. J. Jones, 'Genetic Variation in Abc G5/G8 and Npc111 Impact Cholesterol Response to Plant Sterols in Hypercholesterolemic Men', *Lipids*, 43 (2008), 1155-64.

7. PUBLIKATIONEN

PUBLIKATION:

H.-F. Schött¹, **A. Luister**¹, C. Husche, H.-J. Schäfers, M. Böhm, J. Plat, D. Lütjohann, U. Laufs, O. Weingärtner. The relationships of phytosterols and oxyphytosterols in plasma and aortic valve cusps in patients with severe aortic stenosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014; 446, 3: 805-810

ABSTRACTS:

H.-F. Schött, **A. Luister**, C. Husche, H.-J. Schäfers, M. Böhm, J. Plat, U. Laufs, D. Lütjohann, O. Weingärtner. Phytosterol and oxyphytosterol levels in plasma and aortic valves in patients with severe aortic stenosis.

Poster (P 15): 3rd ENOR Symposium, 19.09.-20.09.2013, Swansea, United Kingdom

H.-F. Schött, **A. Luister**, C. Husche, H.-J. Schäfers, M. Böhm, J. Plat, U. Laufs, D. Lütjohann, O. Weingärtner. Phytosterol and oxyphytosterol levels in plasma and aortic valves in patients with severe aortic stenosis.

Poster (32): Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Atheroskleroseforschung e.V., 13.03.-15.03.2014, Gießen, Deutschland

A. Luister, H.-F. Schött, C. Husche, H.-J. Schäfers, M. Böhm, J. Plat, D. Lütjohann, U. Laufs, O. Weingärtner. The relationships of phytosterols and oxyphytosterols in plasma and aortic valve cusps in patients with severe aortic stenosis.

Vortrag (V 857): 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 23.04.-26.04.2014, Mannheim, Deutschland

O. Weingärtner, H.-F. Schött, **A. Luister**, C. Husche, H.-J. Schäfers, M. Böhm, J. Plat, U. Laufs, D. Lütjohann. Phytosterol and oxyphytosterol levels in plasma and aortic valve cusps in patients with severe aortic stenosis.

Poster (200): 82nd European Arteriosclerosis Society Congress, 31.05.-03.06.2014, Madrid, Spanien

8. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Ulrich Laufs für die Überlassung des spannenden Themas und die Möglichkeit der wissenschaftlichen Tätigkeit in seiner Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die konstruktive Kritik und die freundliche Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Weingärtner für die exzellente Betreuung. Oliver stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat sich stets für das Gelingen meiner Dissertationsarbeit eingesetzt.

Bei Professor Dr. med. Michael Böhm bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Dissertation in der Klinik der Inneren Medizin III der Universitätsklinik des Saarlandes durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Professor Dr. med. Hans-Joachim Schäfers und den Mitarbeitern der Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Gräber für die Unterstützung im Rahmen der statistischen Auswertung.

Besonderen Dank möchte ich Professor Dr. Dr. rer. nat. Dieter Lütjohann und Hans-Frieder Schött für die Durchführung der GC-FID / MSD-Messungen zusprechen. Vielen Dank für die Bereitschaft jederzeit aufkommende Fragen zu beantworten.

Ein herzlicher Dank gilt schließlich meinen Eltern für die moralische Unterstützung und den nötige Rückhalt, die sie mir im Laufe meines Studiums und meiner Dissertationsarbeit entgegen gebracht haben.