

*Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke*

---

**DIE WIRKUNG VON  
URSODEOXYCHOLSÄURE  
AUF DIE  
CHOLESTERIN- UND GALLENsäURE-  
BIOsYNTHESE**

---

*Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München*

*vorgelegt von  
Kai Thiessen  
aus München*

*2006*

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München*

*Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dieter Jüngst*

*Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Th. Lang*

*Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos*

*Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:*

*PD Dr. rer. nat. S. Fischer*

*Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt*

*Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2006*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Die Gallensäure Ursodeoxycholsäure</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Die Cholesterinhomöostase der Leber</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Die Cholesterinbiosynthese nach der Einnahme von         Ursodeoxycholsäure</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4. Gallensäurenbiosynthese nach der Verabreichung von         Ursodeoxycholsäure</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Methoden</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1. Studienprotokoll</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2. Probanden</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3. Studienpräparat</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4. Verwendete Chemikalien und Apparaturen</b> .....	<b>15</b>
<b>3.5. Analytische Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.5.1. Bestimmung der Cholesterinbiosynthese .....	19
3.5.2. Bestimmung der Gallensäurenbiosynthese.....	23
3.5.3. Absoluter und relativer Serumgehalt an Gallensäuren .....	27
3.5.4. Analyse von Proben nach dem Lipidgehalt.....	32
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1. Cholesterinbiosynthese</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2. Lipidwerte</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4. Gallensäurenbiosynthese</b> .....	<b>40</b>
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1. Cholesterinbiosynthese</b> .....	<b>42</b>
<b>5.2. Cholesterinstoffwechsel</b> .....	<b>44</b>
<b>5.3. Gallensäurenbiosynthese</b> .....	<b>47</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>55</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>56</b>
<b>Abkürzungen:</b> .....	<b>56</b>
<b>Veränderungen der Stuhlgewohnheiten</b> .....	<b>56</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>62</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>77</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>78</b>

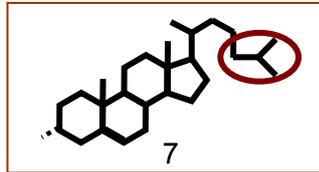
## 1. EINFÜHRUNG

Die menschliche Blasengalle besteht im Wesentlichen aus einem Pool der fünf Gallensäuren: Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure, Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure. Die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure werden durch bakterielle  $7\alpha$ -Dehydroxylation anteilig in die sekundären Gallensäuren Deoxycholsäure bzw. Lithocholsäure umgewandelt. Aus der Chenodeoxycholsäure entsteht über eine  $3\alpha$ -OH Zwischenstufe der Lithocholsäure bzw. 7-Keto-Lithocholsäure dann tertiär Ursodeoxycholsäure.

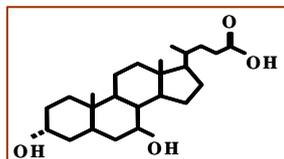
Diese Arbeit beschäftigt sich mit den metabolischen Auswirkungen einer medikamentösen Erhöhung des Anteils von Ursodeoxycholsäure, die in der menschlichen Galle physiologisch nur zu einem Anteil von ca 1 % vorkommt (2).

### 1.1. Die Gallensäure Ursodeoxycholsäure

Ursodeoxycholsäure (UDCS,  $C_{24}H_{40}O_4$ ) ist eine Dihydroxy-Gallensäure, die über einige vorgeschaltete Syntheseschritte aus Cholesterin entsteht.



Cholesterin



Ursodeoxycholsäure

Die namentliche Erwähnung als Ursodeoxycholsäure (ursus=lat. Bär) findet sich erstmalig 1927 durch den Japaner Shoda, der die Gallensalze des chinesischen Schwarzbären untersuchte und bei dieser Species einen vermehrten Anteil dieser Gallensäure entdeckte [104]. Als erster Europäer isolierte der schwedische Biochemiker Olaf Hammarsten Tauroursodeoxycholsäure vor über 100 Jahren aus der Galle des Polarbären [29], [30]. Doch bereits im alten China besaß getrocknete Bärengalle eine therapeutische Bedeutung bei der Behandlung von Lebererkrankungen. Li Shizhen (1518-1593 n. Chr.) beschreibt im Bencao Gangmu, übersetzt dem „Grundlegenden Leitfaden der Drogenkunde“, Bärengalle als Therapeutikum. Dieses Werk wurde 1596 erstmals veröffentlicht. Hier werden mehrere frühere Quellen zitiert, in denen Bärengalle erwähnt wird. Die frühesten dieser schriftlichen Belege stammen aus der Tang-Zeit (618-905 n. Chr.). Sicher war die Bärengalle schon in Gebrauch, bevor sie in Texten auftrat. Allerdings wird in Drogenwerken, die vor der Tang-Zeit datierbar sind, dem Shen-nong Bencao Jing und im Shen nong Bencao Jing Jizhu des Tao Hongjing (452-536), nur Bärenfett, nicht aber Bärengalle beschrieben (5). Auch wenn die Schlüsse unsicher sind, so mag vielleicht daraus abzuleiten sein, daß zur Zeit von Tao Hongjing Gallensalze nicht als Therapeutikum bekannt waren oder nicht als solches galten und daß sie im sechsten Jahrhundert therapeutisch eingesetzt wurden. 1975 berichtete eine japanische Forschungsgruppe, daß Ursodeoxycholsäure Gallensteine erfolgreich auflöst [58]. 1981 behandelte Leuschner Gallensteinpatienten mit chronischer Leberentzündung mit 8-11 mg/ kg Ursodeoxycholsäure. Allmählich erhielt das Gallensalz seinen Einzug in eine bis dahin vorherrschende Domäne der Chirurgie, der Behandlung von Gallensteinleiden. Aufgrund ihrer cholesterinsenkenden Wirkung konnte sich Ursodeoxycholsäure als noninvasive Methode zur Auflösung von Gallensteinen gegenüber großen Fortschritten in der Mikrochirurgie als status of the art halten. Die medizinische Nutzung dieser Gallensäure stellt auch am Anfang des 21. Jahrhundert, so Paumgartner, „einen der wichtigsten Fortschritte der modernen Hepatologie dar“ (3). Heute wird Ursodeoxycholsäure in der Behandlung der Gallenstein-assoziierten flatulenten Dyspepsie, schon länger bei Gallenrefluxgastritis

und aufgrund ihrer zytoprotektiven, apoptosehemmenden und antifibrotischen Wirkung zur Behandlung der primär biliären Zirrhose verwendet (3), [40]. Normalerweise überwiegen in der Galle Cholsäure, Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure, welche auch in dieser Reihenfolge in ihrer Hydrophobizität, Detergenzienwirkung und Zytotoxizität zunehmen [36], [75]. Die vielfältigen Wirkungen von Ursodeoxycholsäure kommen vermehrt zur Geltung, wenn ihre Konzentration erhöht wird und sich dadurch das Gallensäuremuster in Richtung hydrophilerer Gallensäuren verschiebt, wodurch sich die relativ zytotoxischeren Gallensäuren Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure verringern [28]. Eine wesentliche physikalische Eigenschaft der Gallensäuren ist ihre amphiphile Struktur. Diese birgt die Gefahr, sich mit ihrer lipophilen, apolaren Seite an Lipide der Zellmembranen anlagern zu können, während ihre polare Seite die Integrität von Membranen stören kann (3). Andererseits liegt die Hydroxylgruppe von Ursodeoxycholsäure im Unterschied zur sonst strukturformelgleichen Chenodeoxycholsäure am C7-Atom nicht in  $\alpha$ -, sondern in  $\beta$ -Position, wodurch sie polarer und somit weniger lipophil ist. Da Zelltoxizität umgekehrt mit der Polarität der Gallensäuren korreliert, ist Ursodeoxycholsäure für biologische Membranen und Cholangiozyten protektiver [28], [75].

Weitere Wirkungen wie eine fragliche LDL-Cholesterin und VLDL-Triglyzeride senkende Wirkungen wurden diskutiert [5], [34], [115]. Möglicherweise ist die therapeutische Potenz von Ursodeoxycholsäure gerade in der Kombination aus in der Galle cholesterinsenkenden und antientzündlicher Wirkung begründet, da neuste Forschung darauf hinweist, daß die Genese von Gallensteinen auf entzündlichem Zellmilieu verbesserte Wachstumsvoraussetzungen findet (persönliche Kommunikation mit Prof. Jüngst, demnächst publizierte Ergebnisse).

Obwohl sich Ursodeoxycholsäure über 1100 Jahre als Medikament bewährt hat, war ihre Wirkweise bislang noch nicht gänzlich geklärt. Ursodeoxycholsäure senkt die Cholesterinsekretion der Leber und die Cholesterinsättigung in der Gallenblase [36], [111]. Trotzdem kommt es nach Verabreichung dieses Pharmakons nicht zu einer Akkumulation der

hepatischen Cholesterinmenge. So war bis vor kurzem die Frage offen, welchen Einfluß diese Gallensäure auf die Cholesterin- und Gallensäurebiosynthese ausübt.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die kurz- und langfristige Wirkung von Ursodeoxycholsäure auf die entscheidenden Stoffwechselwege des Cholesterinstoffwechsels zu klären und damit helfen, die hepatische Cholesterinhomöostase besser zu verstehen. Anhand von Mevalonat, einem Produkt des dafür unabdingbar notwendigen Enzyms HMG-CoA-Reduktase, wird die Biosynthese des Cholesterins bestimmt. Andererseits wird  $7\alpha$ -Hydroxycholestenon gemessen, das Stoffwechselprodukt der  $7\alpha$ -Hydroxylase, die die Umwandlung des Cholesterins in Gallensäuren reguliert.

### **1.2. Die Cholesterinhomöostase der Leber**

Cholesterin ist Hauptbestandteil aller zellulären und intrazellulären Membranen. Es dient als Vorstufe von Steroiden, Vitamin D und Gallensäuren. Auch wenn Cholesterin für den beständigen Bedarf an Membranen und als Grundgerüst der o.g. Stoffe benötigt wird, sind Ablagerungen in Gefäßen und Organen die Folge, falls über einen längeren Zeitraum ein Überschuß von Cholesterin vorliegt. Um so wertvoller erscheint, daß die Leber das einzige Organ ist, das bedeutend zu einer Cholesterinausscheidung beitragen kann. Trotz einer Vielzahl von Cholesterin zuführenden und Cholesterin verringernden Parametern hält sich das Molekül mit dem Janusgesicht in der Leber im Gleichgewicht.

Die Balance wird durch jeweils folgende Stoffwechselwege bestimmt. Die Quellen, aus denen das Cholesterin der Leber gespeist wird, sind [8]:

1. Diätetisches Cholesterin erreicht die Leber zusammen mit biliärem Cholesterin über die Lymphe in Form von sog. Remnants. Die Leber baut die cholesterinreichen Chylomikronreste ab, die aus dem Abbau der triglyzeridreichen Chylomikronen aus dem Darm stammen. Chylomikronen werden mittels ApoE an Rezeptoren (LDL-related protein, LRP) gebunden und endozytiert. Freie Fettsäuren aus Tri- und Diglyzerolen werden durch die Lipoproteinlipase differenziert aufgenommen.
2. Die Aufnahme von Lipiden ist notwendig, da der Mensch kein Enzym zur Resynthese von Cholesterin aus Gallensäuren besitzt und daher auf die Aufnahme von chemischen Vorstufen des Cholesterins angewiesen ist. Die Leber ist Hauptort der LDL-Rezeptor vermittelten Aufnahme von Low-Density-Lipoproteinen. Die rezeptorvermittelte Endozytose ist Hauptlieferant von Cholesterinestern für den zellulären Cholesterinbedarf.
3. Reife High-Density-Partikel nehmen freies Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe auf. HDL-Lipoproteine werden ihrerseits hepatisch mit dem Scavenger-Rezeptor SR-BI aufgenommen.
4. Darüberhinaus wird Cholesterin de-novo in der Leber synthetisiert. Vier Cholesterinausströme aus der Leber können grundsätzlich genannt werden:

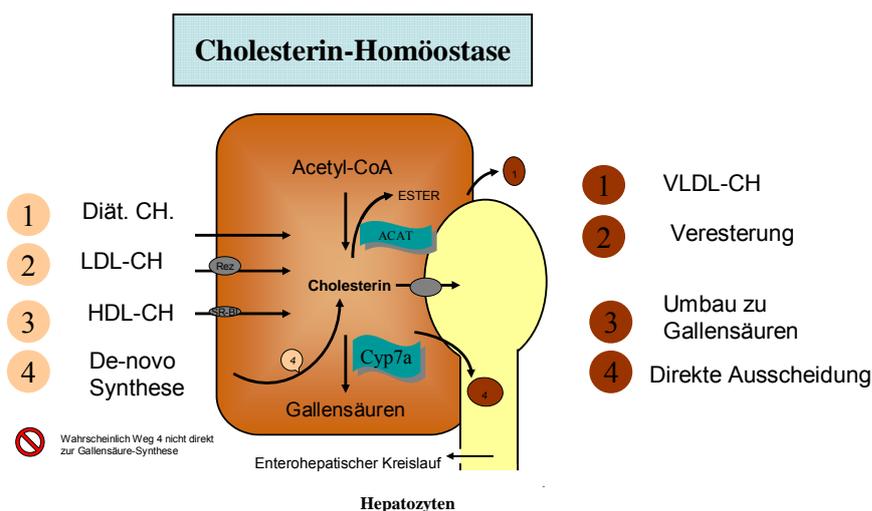
1. Die Leber synthetisiert die triglyzeridreichen Very low density lipoproteine (VLDL). Nicht sofort benötigte Lipide werden mit Apolipoproteinen beladen und in Form von VLDL ins Blut abgegeben.
2. Acetyl-CoA wird mittels Enzym ACAT zu Acylglycerol verestert und dient als Speicherform.
3. Schließlich ermöglicht das Enzym  $7\alpha$ -Hydroxylase den katabolischen Umbau von Cholesterin zu Gallensäuren. Gallensäuren werden nur aus Cholesterin synthetisiert. Der enterohepatische Kreislauf stellt durch Rezirkulation der Gallensäuren deren Reutilisation sicher, um einen Energie- und

## 1. EINFÜHRUNG

Stoffverlust zu vermeiden. Die Umwandlung in Gallensäuren ermöglicht durch eine Detergenzienwirkung eine erneute Lipidaufnahme zu einem späteren Zeitpunkt. Aufgrund des Fehlens entsprechender Enzyme kann der Mensch das einmal in Gallensäuren umgewandelte Cholesterin nur noch durch fäkale Exkretion ausscheiden.

4. Überschüssiges Cholesterin wird direkt in die Galle ausgeschieden. Dort ist eine zu hohe Sättigung an Cholesterin ursächlich für Cholesterinsteine in der Gallenblase verantwortlich.

### Stoffwechselwege in der Übersicht



modifiziert nach:

Kubitz Falk workshop Düsseldorf 27.11.2004, Angelin EIAC 1995; 25, 216 [8], [44].

### **1.3. Die Cholesterinbiosynthese nach der Einnahme von Ursodeoxycholsäure**

Welchen Einfluß hat die Verabreichung von Ursodeoxycholsäure auf die Entstehung von Cholesterin?

Ursodeoxycholsäure beeinflusst laut Angelin die Cholesterinbiosynthese nicht [5], [6], [7]. Andere in der Literatur veröffentlichte Studien kamen, meist an Gallensteinpatienten, allerdings mittels verschiedener Methoden und bei unterschiedlich langer Einnahmedauer zu unterschiedlichen Resultaten. Einwöchige Zuführung von 15 mg Ursodeoxycholsäure/ kg Körpergewicht erhöhte die Cholesterinbiosynthese [15], eine dreiwöchige Ursodeoxycholsäure-Behandlung steigerte die HMG-CoA-Reduktase um bis zu 50 % [22]. Wurde die Cholesterinbiosynthese jedoch bei gleicher Dosierung über vier Wochen untersucht, beobachtete man anders als bei Einnahme von Chenodeoxycholsäure keinen signifikanten Effekt von Ursodeoxycholsäure auf die HMG-CoA-Reduktase [6], [37]. Ferner hatte Ursodeoxycholsäure ebenfalls keine signifikant verändernde Wirkung auf den HDL-Cholesterinspiegel oder Gesamtcholesterin im Serum [7]; Verhältnisse von HDL zu LDL-Cholesterin blieben nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure unverändert [5].

1. EINFÜHRUNG

<b>Autor</b>	<b>Verabreichung</b>	<b>Probanden</b>	<b>Methodik</b>	<b>Cholesterinbiosynthese</b>
Angelin [5]	7,5 mg/ kg Ursodeoxycholsäure 4-6 Wochen	Gallensteinpatienten Hypertriglyzeridämie Gesunde	Biopsie	unverändert
Angelin [6]	15 mg/ kg Ursodeoxycholsäure 4 Wochen	Gallensteinpatienten	Biopsie	unverändert
Carulli [15]	15 mg/ kg Ursodeoxycholsäure 1 Woche	Gallensteinpatienten	Radioaktiv Essay Goldfarb/ Pitot	Steigerung +100 %
Einarsson [22]	15 mg/ kg Ursodeoxycholsäure 3 Wochen	Gallensteinpatienten	Mikrosomal in Leberbiopsien	Steigerung +50 %
Einarsson [8], [22]	15 mg/ kg Ursodeoxycholsäure 4 Woche	Gallensteinpatienten	Radiochemisch	Kein sign. Effekt
Maton [62]	4,5-7,2 mg/ kg Ursodeoxycholsäure 1-6 Monate	Gallensteinpatienten	Enzymatisch in Leberbiopsien	Absinken -40 %

### 1.4. Gallensäurenbiosynthese nach der Verabreichung von Ursodeoxycholsäure

Welche Auswirkungen eine Veränderung des Gallensäurepools durch Verabreichung von Ursodeoxycholsäure auf die Gallensäurenbiosynthese hatte, war laut Datenlage nicht eindeutig:

<b>Autor</b>	<b>Verabreichung</b>	<b>Probanden</b>	<b>Gallensäurenbiosynthese</b>
Angelin [7]	7,5 mg/ kg	11 Hypertriglyzeridämie	Anstieg +39 % Cholsäure Absinken -13 % CDCA
Angelin [7]	15 mg/ kg	11 Hypertriglyzeridämie	Anstieg +76 % Cholsäure bzw. +8 % CDCA
Axelson [10]	15 mg/ kg 3-4 Wochen	6 Gallensteinpatienten	Unverändert
Beuers [12]	13-15 mg/ kg	4 Gesunde	Unveränderte Syntheserate
Beuers [12]	13-15 mg/ kg	3 Patienten mit PBC 2 Patienten mit PSC	Unveränderte Syntheserate
Frenkiel [25]	10 mg/ kg	26 Gallensteinpatienten	Sinken um -49 %
Mazzella [64]	10 mg/ kg	Hypercholesterinämie	Absinken um -36 %
Mazzella [65]	10 mg/ kg	9 Patienten mit PBC	Anstieg +11- 22 %
Nilsell [70]	15 mg/ kg	12 Gesunde	Anstieg um +43- 73 % je nach Dauer UDCA-Gabe
Okamoto [72]	600 mg/ Tag	10 Gallensteinpatienten	Kein sign. Effekt
Roda [82]	12 mg/ kg	7 Gallensteinpatienten	Sinken um -36 %
Rudolph [84]	11 mg/ kg	6 Patienten mit PBC	Anstieg um +30 CDCA bis + 68 % Cholsäure
Rust [88]	12-15mg/ kg	4 Gesunde	Anstieg nach 4-6 Tagen

## **2.FRAGESTELLUNG**

Diese Studie untersuchte die metabolischen Folgen der Einnahme von Ursodeoxycholsäure auf den Cholesterinstoffwechsel und Gallensäurestoffwechsel. Laut bestehenden Studien reduziert die Verabreichung von Ursodeoxycholsäure die hepatische Sekretion von Cholesterin in die Galle. Der Cholesteringehalt der Galle sinkt nachweislich. Trotz geringerer Ausscheidung bleibt der Lebercholesterinspiegel nach der Verabreichung von Ursodeoxycholsäure gleich [111]. Wir gingen auf Grund der Literatur davon aus, daß nur drei Möglichkeiten in Frage kamen, das Cholesteringleichgewicht zu beeinflussen: Veränderung der Cholesterinbiosynthese, des Lipidstoffwechsels oder der Gallensäurebiosynthese. Anhand von Stoffwechselprodukten wurden indirekt die zwei unabdingbar notwendigen Enzyme, sog. Schlüsselenzyme, bestimmt: Die HMG-CoA-Reduktase reguliert die de-novo Synthese von Cholesterin. Die  $7\alpha$ -Hydroxylase regelt den Cholesterinabbau zu Gallensäuren.

Wenn sich nach der Einnahme von Ursodeoxycholsäure die Cholesterinausfuhr in die Galle reduziert und die Cholesterinsättigung in der Gallenblase sinkt, aber die Cholesterinkonzentration gleichzeitig in der Leber nicht steigt, sollte das hepatische Cholesterin aufgrund folgender Thesen nicht zunehmen [5], [111]:

## 2.FRAGESTELLUNG

These 1:

Ursodeoxycholsäure beeinflusst die Cholesterinbiosynthese nicht.  
Die Cholesterinbiosynthese bleibt gleich.

These 2:

Ursodeoxycholsäure steigert die Gallensäurenbiosynthese.  
Cholesterin wird vermehrt in Gallensäuren umgewandelt, so daß dadurch  
einem Cholesterinüberschuß in der Leber entgegengewirkt wird.

Für die Steuerung der Gallensäurenbiosynthese ist die Beschaffenheit des  
Gallensäurepools bedeutsam. Der vorhandene Gallensäurepool hat  
Rückwirkungen auf das Schlüsselenzym der Gallensäurenbiosynthese, die  
7 $\alpha$ -Hydroxylase [21], [60], [117].

These 3:

Während der Verbreichung von Ursodeoxycholsäure wird der absolute und  
relative Gehalt dieser Gallensäure im Serum zunehmen und damit ihre  
charakteristischen Eigenschaften im Verhältnis mehr zur Geltung kommen  
als dies im nativen Zustand der Fall ist.

## **3.METHODEN**

### **3.1. Studienprotokoll**

Acht gesunde Freiwillige, drei Frauen und fünf Männer im Alter von 24-44 Jahren (Median 31 Jahre), nahmen an der Studie teil. Sie waren über Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis, die zur Gallensteinauflösung gewöhnliche und bereits in vorausgegangenen Studien verwendete gewichtsadaptierte Dosis von 2–4 Kapseln pro Tag, d.h. 8-14 mg/ kg über 40 Tage hinweg einzunehmen. Jederzeit bestand die Möglichkeit der telefonischen Rücksprache oder eines Studienausstieges ohne Angabe von Gründen. Keine der Probandinnen war zum Zeitpunkt der Studie schwanger. Weitere Medikamente wurden nicht eingenommen. Es wurde Nüchternserum und Urin gesammelt: Über Nacht sammelten die Probanden Urin für 12 Stunden von 19.00 bis 7.00 Uhr in ein von der Klinik gestelltes, wenig lichtdurchlässiges Spezialgefäß. Die letzte Blasenentleerung fand vor Beginn der zwölfstündigen Sammelzeit um 19.00 Uhr statt. Es wurden zwei Vorwerte pro Proband unmittelbar vor Einnahme ermittelt. An den Tagen Tag -1 und Tag 0, sowie den Tagen 1, 3, 5, 10, 20, 30 und 40 nach der ersten Einnahme des Präparates wurde in nüchternem Zustand 30 ml Blut entnommen. Außerdem stellten die Probanden weitere Proben an den Tagen 42, 47 und 54 sowie drei zusätzliche Vergleichswerte drei Monate nach der letzten Einnahme von Ursodeoxycholsäure zur Verfügung. Am Ende der Studie wurde den Teilnehmern ein Studienentgelt überwiesen. Die Studienleitung oblag Herrn Prof. Dr. med. Jüngst und PD Dr. Fischer. Im Anhang ist der Aufklärungsbogen zur Studie beigelegt. Zwischenzeitlich wurde die Arbeit publiziert [94].

### 3.2. Probanden

Im Überblick stellte sich das Probandenkollektiv wie folgt dar:

Proband	Alter (J.)	Geschlecht	Gewicht (kg)	BMI (kg/ m <sup>2</sup> )
1	31	M	78	21,38
2	31	M	85	23,46
3	27	M	81	24,47
4	36	W	95	30,67
5	27	M	74	22,09
6	26	M	76	22,94
7	44	W	64	25,64
8	24	W	54	22,77

### 3.3. Studienpräparat

Als Studienpräparat wurde das handelsübliche „Ursofalk“ der Firma Dr. FALK Pharma, Freiburg, in der gewichtsadaptierten empfohlenen Dosierung von drei Kapseln à 250 mg Ursodeoxycholsäure verwendet. Es handelt sich um ca. 1 cm lange, rot-braune Kapseln. Die Originalverpackung wurde jedem Probanden vom Klinikbestand ausgehändigt. Das Medikament wurde in der Klinik seit vielen Jahren verwendet und war in seinem möglichen Nebenwirkungsspektrum bekannt. Zugelassene Indikationen des Medikamentes waren die Auflösung von röntgennegativen Cholesterin-Gallensteinen ( $\leq 15$  mm) bei funktionsfähiger Gallenblase, Gallenrefluxgastritis, Rezidivprophylaxe von Cholesterinsteinen nach erfolgter Lysetherapie, cholestatische Lebererkrankungen, insbesondere die primär biliäre Zirrhose, solange keine dekompensierte Zirrhose vorlag (2), (3). Langzeituntersuchungen an Maus und Ratte hatten keine Hinweise auf ein tumorerzeugendes Potential von Ursodeoxycholsäure ergeben (3). Das erste Trimenon der Schwangerschaft sowie die Stillzeit galt als Gegenanzeige. Zwar bestanden tierexperimentelle Hinweise auf fruchtschädigende Wirkungen in der frühen Trächtigkeit, doch entsprach die potentiell schädigende Dosis von 2000 mg/ kg Körpergewicht etwa 560 Kapseln pro Tag (2). Weitere Kontraindikationen waren der

### 3.METHODEN

Verschuß der Gallenwege, eine röntgenologisch nicht darstellbare Gallenblase, kalzifizierte Gallensteine, eine gestörte Kontraktionsfähigkeit der Gallenblase sowie häufige Gallencholiken. Nebenwirkungen waren insgesamt als selten beschrieben worden, gelegentlich wurde das Auftreten von breiigen Stühlen beobachtet [93]. In Einzelfällen kommt es laut Herstellerangaben zum Anstieg der Leberenzyme. Wechselwirkungen mit Medikamenten, die das Pharmakon binden und damit seine Resorption und Wirksamkeit einschränken, sind möglich [87]. Abhängig vom Körpergewicht wurde zur Auflösung von Cholesterin-Gallensteinen und bei der primär biliären Zirrhose eine Dosierung zwischen 2 und 6 Kapseln à 250 mg Ursodeoxycholsäure entsprechend etwa 10 bis 15 mg/ kg Körpergewicht empfohlen. Nach oraler Einnahme zirkuliert Ursodeoxycholsäure im enterohepatischen Kreislauf [36].

Wichtige chemische Daten der Ursodeoxycholsäure sind nachfolgend zusammengefaßt [67]:

<b>Chemischer Name:</b>	3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-Säure
<b>Summenformel:</b>	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>
<b>Rel. Formelmasse:</b>	392,58 u
<b>Beschreibung:</b>	weißes, geruchloses, kristallines Pulver mit bitterem Geschmack.
<b>Löslichkeit:</b>	gut löslich in Ethanol und Eisessig, sehr gering in Wasser. Mizellenbildung ca. bei pH 8
<b>Pharmakokinetik:</b>	Absorptionsrate: 60-80 %, First Pass Clearance: bis 60 %, Halbwertszeit: 3,5-5,8 Tage, AUC 30,5 mmol/ l, C <sub>max</sub> ca 800 ng/ ml, t <sub>max</sub> ca 2 h [67]

### 3.4. Verwendete Chemikalien und Apparaturen

#### Reagenzien

##### **Für die Kreatininbestimmung**

Methode nach Jaffé, Hofmann La Roche Diagnostik

##### **Für die Mevalonatbestimmung**

Ethylacetat, Reinheit 99,5 % , Merck Darmstadt

Natronlauge p.a., Merck Darmstadt

Aceton p.a., Merck Darmstadt

Dimethylformamid p.a. , Reinheit 99,5 % , Merck Darmstadt

Isooctan p.a., Reinheit 99,5 % , Merck Darmstadt

Imidazol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103

Trärgas Helium, Linde Gas, München

MBDSTFA (N-Methyl-N- tert-Butyldimethylsilyl-trifluor-acetamid),  
Fluka Chemie, Neu-Ulm

##### **Für die Cholestenonbestimmung**

Aqua ad injectabilia, Braun Melsungen

Aqua bidest.

Aqua für Chromatographie, LiChrosolv, Merck Darmstadt

NaCl 0,9 %

MeOH/ CHCl<sub>3</sub> 1:1 (vol/ vol)

MeOH/ H<sub>2</sub>O 65:35 (vol/ vol)

Hexan / CHCl<sub>3</sub> 1:1 (vol/ vol)

Hexan / Cl<sub>3</sub> 75:25 (vol/ vol)

Methanol bzw. Chloroform, Reinheit 99,8 % bzw. 99,0-99,4 %, Merck  
Darmstadt

n-Hexan bzw. Chloroform, Reinheit 98 % bzw. 99,0-99,4 %, Merck  
Darmstadt

Acetonitril, Ultra Gradient HPLC Grade, J.T. Baker, Reinheit 99,8 %/  
0,01 H<sub>2</sub>O, USA

7 $\alpha$ -Hydroxy-4-Cholesten-3-on (Standard)

### 3.METHODEN

Bulk Packing Material , Dimethylacetadecylsilyl, bonded silica gel,  
Preparative C18 125 Å, Lot No. 211, Waters Corp. Milford, MA /  
Wicom GmbH, Heppenheim

#### **Für die Gallensäurenbestimmung im Serum**

2,5 µg Hyodeoxycholsäure, z.B. Flourochemie LTd., Wesley, USA  
bzw. über Science lab.com

Stammlösung Interner Standard= 5 mg/ 1 ml CH<sub>3</sub>OH; Verdünnung  
1:1000 herstellen

0,1 n NaOH 4 g NaOH/ 1000ml H<sub>2</sub>O bidest.

0,1 n NaOH 4g NaOH/ 1000ml H<sub>2</sub>O bidest.

0,01n HCl 0,83ml konz. HCl/ 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest.

1 n HCl/ CH<sub>3</sub>OH 4 g NaOH/ 100 ml CH<sub>3</sub>OH, filtrieren!

0,2 n Essigsäure 1,14 ml konz. Essigsäure/ 100 ml H<sub>2</sub>O bidest

0,2 mol/ l EDTA-Lsg. 744 mg EDTA/ 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
(Meßkolben) Lösen im Ultraschall.

0,2 mol/ l Mercaptoethanol 140µl EDTA/ 10ml H<sub>2</sub>O bidest.

0,1 n Na-Acetat-Puffer 0,82 g Na-Acetat + 75µl konz. Essigsäure/  
100ml H<sub>2</sub>O bidest. (Meßkolben), der Puffer  
soll pH 5,6 haben.

Dimethylether, z. A., Merck, Darmstadt

Methanol-Dimethoxypropan-Gemisch (Mischungsverhältnis 1:1,  
vol/vol), beides Merck, Darmstadt

EDTA- Lsg. und Mercaptoethanollsg., z.A. Merck, Darmstadt, frisch  
ansetzen.

TMS-Reagenz: 3 Teile Pyridin  
2 Teile Hexamethyldisilazan  
1 Teil Chlortrimethylsilan

#### **Für die Cholesterinbestimmung**

Reagenz CHOD-PAP, Boehringer Mannheim

Gerätschaften

**Für die Mevalonatbestimmung**

Massenspektrometer, Elektronstoß (EI), Finnigan,

jetzt Thermofinnigan, Egelsbach

Gaschromatograph, Carlo Erba Chroma, HRGL, Milano, Italien

Fused silica capillar Säule, 25 Meter, Innendurchmesser von 0,32 mm,

Varian Darmstadt

**Für die Kreatininbestimmung**

Hitachi 917

**Für die Cholestenonbestimmung**

UV-VIS Detektor Shimadzu SPD-10A, Kyoto, Japan

Liquid Chromatograph Shimadzu LC-6A, Kyoto, Japan

Integrator Chromatopac Shimadzu C-R5A, Kyoto, Japan

Kapillarsäule HiBar prepac column RT-250-4, RR-18, Si 100,

5 µm, Merck, Darmstadt

Zentrifuge Rotina 35, Hettich, Tuttlingen, Drehzahl 15 000 U/ min

Vac- Elut, Analytichem International

Lauda M12 Wasserbad, 97912 Lauda-Königshofen

Abdampfvorrichtung, Thermomix 1480, Braun Melsungen

Bosch bzw. Liebherr, Gefrierschränke, Temp. -20°C

Dispensette Brand, Wertheim

Hamilton, Bonadac, Schweiz

Eppendorf Pipetten, Eppendorf Hamburg

Schliffstopfengläser mit und ohne Konus

Falcon Urinprobengläschen von Falcon, USA

Parafilm M, American National Can™, Chicago, IL 60631

**Für die Gallensäurenbestimmung im Serum**

Gaschromatograph, Carlo Erba, Milano, Italien

Cyanopropyl Siloxan Kapillarsäule GLC (CP-Sil-19 CB, 25 m,  
Innendurchmesser=0,32 mm, AD=0,45 mm

Firma Chrompack, Middleburg, Holland

### **Für Cholesterinfragmente**

Pharmacia, Firma LKB, Redi Frac, Bromma/ Stockholm, Schweden

Pharmacia, Firma LKB Pumpe P1, Bromma/ Stockholm, Schweden

Epos Analyser 5060, Firma Eppendorf, Hamburg

Beckman Rotor Ti 50, d 1.006 g/ ml, Fullerton, California, USA

### **Für die Bestimmung der Apo-Lipoproteine**

Nephelometer 100, Firma Behring, Schwalbach

Anti-Apo A-I und Anti-Apo B, Behring, Marburg

### **3.5. Analytische Methoden**

Die Cholesterinbiosynthese wurde anhand von Mevalonat im Urin ( $\mu\text{g}/\text{g}$  Kreatinin) bestimmt,  $7\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-on im Serum ( $7\alpha$ -HC,  $\text{ng}/\text{ml}$ ) war Meßparameter für die Gallensäurenbiosynthese [10], [55], [92]. Weiterhin wurden Cholesterinwerte für Gesamtcholesterin-, LDL-, HDL-, VLDL-Cholesterin und APO B im Serum bestimmt. Um das Mevalonat auf Kreatinin ( $\mu\text{g}/\text{g}$  Kreatinin) beziehen zu können, wurde das Volumen des Urins und dessen Kreatiningehalt gemessen und ein Aliquot eingefroren. Die Spiegel der Gallensäuren im Serum wurden mit Hilfe der kombinierten Massenspektrometrie und Gaschromatographie bestimmt und damit die Compliance der Medikamenteneinnahme an den Tagen 0, 10, (bei einem Patienten Tag 30) und Tag 40 verifiziert.

### 3.5.1. Bestimmung der Cholesterinbiosynthese

Die Cholesterinbiosynthese wurde anhand von Mevalonsäure im Urin mittels Isotopenverdünnungsmethode bestimmt.

Die Geschwindigkeit der Cholesterinbiosynthese wird durch das Enzym HMG-CoA-Reduktase festgelegt, welches mit der Konzentration seines Stoffwechselproduktes Mevalonsäure korreliert [92]. Lindenthal und von Bergmann stellten eine hochsignifikante Korrelation zwischen Cholesterinbiosynthese und der Messung des Mevalonats im 24-Stunden-Urin fest [54], [55]. Diese Methode war der Serummessung an Einfachheit und Genauigkeit überlegen. Da jedoch die Serumspiegel einem circadianen Rhythmus unterliegen und die täglichen Urinmengen schwanken, erschien es besser, den Urinspiegel von Mevalonat auf die Kreatininkonzentration zu beziehen, womit die Cholesterinbiosynthese gut quantifiziert werden kann [54], [77]. Im Folgenden wird die Messung von Mevalonat im Urin nach der Methode von Lindenthal beschrieben:

#### Vorbereitungen für die Analyse mit kombinierter Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Mit Hilfe von massenspektrometrischen Verfahren wurde Mevalonat im Urin gemessen, dem zuvor Mevalonat-D7 als Interner Standard zugegeben wurde [55].

Das Wasser wurde azeotrop verdampft und Mevalonat in das Tri-tert-butyl-dimethylsilyl-Derivat mit einem hohen Molekulargewicht (M) von  $M \pm 490u$  umgewandelt. Diese Methode wurde in unserem Labor überarbeitet und mittels Wiederfindungsversuchen etabliert. Die Nachweisgrenze der massenspektrometrischen Fragmente mit m/ z-Werten 317/ 324 ( $M \pm 173u$ ) und m/ z 433/ 440 ( $M \pm 57u$ ) (D0 und D7) des Mevalonat-tri-TBDMS-Derivates im Multiple-Ion-Detection-Verfahren betrug etwa 100 pg mit einem Signal/ Rausch-Verhältnis von 10/ 1.

MVA-D0-tri-TBDMS:  $M \pm 490u$  Fragmente: m/ z 317 und 433

### 3.METHODEN

Als Interner Standard diente 10 ng MVA-D7/  $\mu\text{l}$ , der in 10  $\mu\text{l}$  einer ethanolischen Lösung in ein Schliffstopfenglas gegeben wurde. Dazu wurden 400  $\mu\text{l}$  Urin (pH 3,5) und 8 ml Ethylacetat/ Aceton (2:1, vol/ vol) 30 Sekunden lang gevortext. Bei 50°C im Wasserbad wurde auf 500–800  $\mu\text{l}$  abgeblasen. Zusammen mit 1 ml Aceton wurde der Inhalt in ein neues Glas von 5 ml Volumen übergeführt. Unter Stickstoff wurde im Wasserbad bei 50°C bis zur Trockne eingedampft und Interner Standard hinzugesetzt. 50  $\mu\text{l}$  Natronlauge wurden hinzugefügt, 30 Sekunden lang gevortext und diese Lösung 10 Min. bei Raumtemperatur belassen, so daß Mevalonolacton zu Mevalonsäure reagierte. Ferner wurden 4 ml Ethylacetat/ Aceton (2:1, vol/vol) hinzugefügt. Im Wasserbad bei 50°C wurde unter einem Stickstoffzustrom zur Trockne eingedampft. Anschließend kamen zwei Reagenzien hinzu, bevor die Lösung über vier Stunden im Wasserbad bei 50°C belassen wurde. 40  $\mu\text{l}$  Dimethylformamid und Imidazol wurden im Verhältnis 1:0,001 gemischt, wobei Imidazol als Katalysator fungierte. 40  $\mu\text{l}$  Silylierungsmittel N-Methyl-N-tert-Butyldimethylsilyl-trifluor-acetamid (MBDSTFA) wurde hinzugegeben, dann 30 Sekunden lang gevortext. Nach der mindestens vierstündigen Trockenphase erfolgte die Zupipettierung von 200  $\mu\text{l}$  Dimethylformamid und 1000-1500  $\mu\text{l}$  Isooctan. Die Schritte vor Trocknung unter Stickstoff bei Raumtemperatur waren: Einminütiges Vortexen, 10 Minuten Zentrifugation bei 3000 rpm und das Abpipettieren der oberen Phase Isooctan. Schließlich wurde der Inhalt der Gläschen in 50  $\mu\text{l}$  Isooctan aufgenommen. Damit stand das Derivat der Mevalonsäure für die kombinierte Gaschromatographie und Massenspektrometrie-Analyse bereit.

Das Derivat Tris-t-Butyldimethylsilyl (tri-TBDMS) hatte nun nach Abspaltung des Molekulargewichtes von 57 der  $\text{C}_4\text{H}_9$ -Gruppe bzw. des Molekulargewichtes von 173 folgende Eigenschaften erlangt:

MVA-D7-tri-TBDMS:  $M \pm 497u$       Fragmente: m/ z 324 und 440

#### Gaschromatographie-Bedingungen

Nach Extraktion, Reinigung und Derivatisierung mit dem Silylierungsmittel Methyl-tert-Butyl-Dimethylsily-Trifluoracetamid wurde die Konzentration von Mevalonat mit einem Finnigan 4000 Quadrupole Massenspektrometer im Single-Ion-Modus chromatographisch gemessen. Als Säule wurde eine DB-1701-Säule (Methyl-Phenyl-Siliconphase) der Länge 30 Meter von Chrompack verwendet. Die Probe wurde bei 140°C on-column-injiziert und sofort mit 4°C/ min auf 270°C aufgeheizt, daraufhin 25 Minuten bei 270°C belassen. Der Vordruck des Heliums war 0,62 kp. Die Retentionszeit des Derivates lag bei etwa 15 Minuten.

#### Datensystem- Bedingungen

Das Datensystem startete nach 13,5 Minuten.

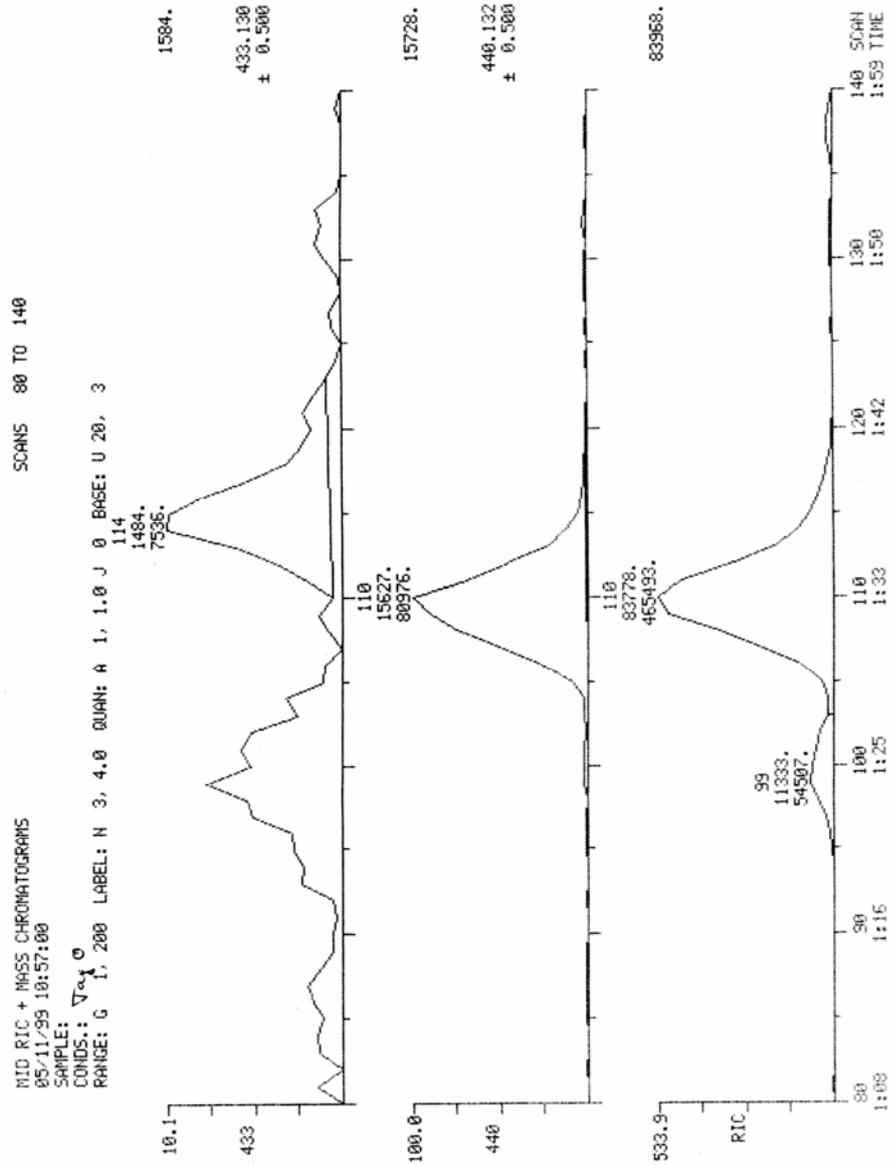
#### Massenspektrometrie- Bedingungen

Folgende Linsen wurden zur Fokussierung in der Ionenquelle verwendet und zur Replizierbarkeit manuell eingestellt: Linse 1: 105, Linse 2: 316, Linse 3: 255, Linse 4: 1446, Linse 5: 284. Der Quad offset lag bei Datensystem-Stellung 6,5-6,9.

#### Kreatinin im Urin

Kreatinin im 12h-Urin wurde gemäß Laborstandardmethoden nach Jaffé mit dem Hitachi 917 sowie mittels der entsprechenden Roche Standarddiagnostik gemessen und diente als Bezugsgröße.

### 3.METHODEN



Exemplarische Darstellung eines Analyseergebnisses der Cholesterinbiosynthese. X-Achse: Retentionszeit. Y-Achse: Molekulargewicht in massenspektrometrischen Fragmente m/z.

### 3.5.2. Bestimmung der Gallensäurenbiosynthese

#### 7 $\alpha$ -Hydroxycholestenon als Marker der Gallensäuresynthese

Die hepatische Gallensäuresynthese wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und UV- Detektion von 7 $\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-on (7 $\alpha$ -HC) im Serum gemessen. Diese Methode wurde von Axelson 1988 publiziert, von Sauter 1996 modifiziert und in unserem Labor etabliert [92]. 7 $\alpha$ -HC wurde aus dem Serum extrahiert und mittels Reversed Phase Silica-Gel bei 64°C gereinigt. Nach weiterer Reinigung erfolgte die HPLC mit nachfolgender UV-Detektion bei 241 nm.

#### Messung der Serumgallensäuren

Die Isolierung und gaschromatographische Quantifizierung der Serumgallensäuren wurde von Setchell und Worthington 1982 entwickelt. Seit über 20 Jahren wird sie in unserem Labor durchgeführt. 7 $\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-on wurde als Marker der Gallensäurenbiosynthese nach der Methode von Axelson und Sauter gemessen [10], [92]. Die Einnahme von Ursodeoxycholsäure wurde mittels der kombinierten Gas- und Massenspektrometrie im Serum verifiziert. Der Versuchsaufbau ist in den folgenden Photos wiedergegeben:

li. oben: Vac-Elut. li. unten: HPLC. re. Unten: Massenspektrometrie



#### Bereitstellung für die Cholestenon- Aufarbeitung

Zur Vorbereitung wurde jede Säule mit je einer Fritte bestückt, worauf sie je mit 0,34 g Octadecylsilan-Silica gefüllt wurden. Die Röhrchen wurden in die Plexiglashalterung eingesetzt und mit dem Deckel fixiert. Die angefeuchteten Gummischläuche wurden mit den Reservoirs und der Wasserspülung verbunden. Dadurch konnte das Stoffgemisch in einem getrennten Kreislauf geheizt oder gekühlt werden. Ein Becherglas 500 ml und folgende Lösungen sollten zur Hand stehen: MeOH, MeOH/ CHCl<sub>3</sub> 1:1 (vol/ vol), MeOH/ H<sub>2</sub>O 65:35 (vol/ vol), Hexan/ CHCl<sub>3</sub> 75:25 (vol/ vol). Zur Abfüllung der Volumina wurde ein Dispenser verwendet. Als Abblasröhrchen wurden fünf spitzkonische Zentrifugenröhrchen beiseite gelegt, für den Reinigungsvorgang 10 Schliffstopfengläschen à 15 ml. Nun erfolgte das Auftauen der Proben (Serum). Während dieser Zeit wurde bereits die Wärmepumpe des Wasserbades und Aqua bidest. in einem 500 ml Glas auf 64°C erhitzt.

#### Durchführung

Die Proben (1,5 ml) wurden mit 2 Volumina 0,9 % NaCl in Schliffstopfengläsern verdünnt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der Innere Standard 7β-Hydroxy-4-Cholesten-3-on-Lösung=50 ng aus dem Gefrierschrank geholt und 100 µl davon zu den Proben dazupipettiert. Im Anschluß wurde gevortext und das Gemisch 20 min. im Ultraschallbad beschallt. Die Erwärmung der Proben erfolgte bei 64°C im Wasserbad. Unter leichtem Unterdruck im VacElut (max. 5 mmHg) wurde das Waschen der Säulen vorbereitet. Dabei durften die Säulen bis zum letzten Waschschrift nie trocken laufen. Nacheinander wurden die folgenden Chemikalien zum Waschen in jedes Glasröhrchen eingefüllt: Der Waschvorgang begann mit 5 ml MeOH, anschließend 5 ml MeOH/ CHCl<sub>3</sub> (1:1, vol/ vol), dann mit 5 ml MeOH und zuletzt mit 5 ml H<sub>2</sub>O (64°C). Damit die Säulen nicht trockenliefen, sollte immer etwas Überstand verbleiben. Dieser Vorgang sollte außerdem unter einem Vakuum von 2 mmHg stattfinden. Nach dem Schließen der Ventile am

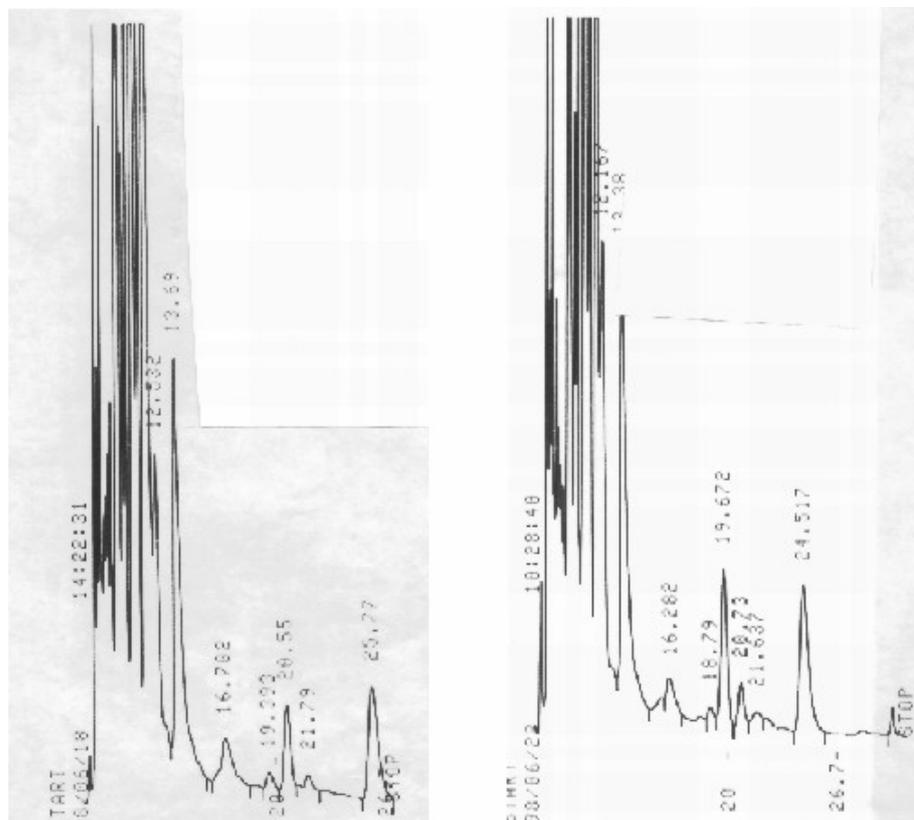
### 3.METHODEN

VacElut wurden die Ventile am Wasserbad zuerst am Rückfluß, danach am Zufluß des Wasserbades und zuletzt am VacElut geöffnet. Mit 5 ml H<sub>2</sub>O bei 64°C wurde derweil weiter gewaschen. Nach Abstellen des Vakuums konnten die Proben zugegeben werden. Ohne Vakuum bewegten sich diese bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. 1 ml/ Min über die Säulen. Um die an den Wänden haftende Restmenge nicht zu verlieren, wurden die Probengläschen mit je 5 ml H<sub>2</sub>O nachgewaschen und erneut ohne Vakuum auf die Säule gegeben. Die Säulen wurden anschließend mit weiteren 10 ml H<sub>2</sub>O bei 64°C gewaschen. Nach Abstellen des Wasserdurchflusses und Öffnung des Ventils am Ausguß wurden die Säulen mit Aqua dest. ca. 5 Minuten gekühlt. Nach vollständiger Abkühlung auf Raumtemperatur wurden sie mit jeweils 10 ml MeOH/ H<sub>2</sub>O (65:35, vol/vol) gespült. Bei geöffnetem Wasserdurchlauf sollten die Säulen nun das erste Mal trockenlaufen. Anschließend wurde 5 Minuten Luft bei einem Unterdruck von 5 mmHg angesaugt. Die Säulen wurden mit dem Deckel nach oben geschoben und die Schliffstopfengläser eingestellt. Die Deckel wurden gut an Ober- und Unterseite getrocknet. Die Reinigung wurde mit 8 ml Hexan/ CHCl<sub>3</sub> (75:25, vol/vol) unter Vakuum von 2,5 mmHg beendet.

Zur Elution wurde das Eluat in Zentrifugengläser pipettiert. Die Schliffstopfengläser wurden mit 2 ml Hexan/ ChCl<sub>3</sub> nachgewaschen und in Zentrifugengläser umgefüllt. Unter Stickstoff wurde dieser im Wasserbad bei 64°C unter dem Abzug abgedampft. Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und für die HPLC-Messung bei -20°C eingefroren.

Analyse von Proben mit Hilfe der HPLC

Für die eigentliche Analyse wurden die Proben aufgetaut und der gelöste Röhreninhalt in 45 µl CH<sub>3</sub>OH in eine Hamiltonspritze aufgenommen und der gesamten Konus des Gläschens sehr gut ausgespült, nachdem sie gevortext wurden. Erneut wurden die restlichen Bestandteile vom Rand abgespült. Von dem aufgenommenen Eluat wurden 20 µl auf die High Performance Liquid Chromatographie-Säule injiziert. Hierbei wurde eine 250 x 4,5 mm Säule von LiChrospher (Hibar, Si 100, 5 µm, Merck, Darmstadt), die an einen UV-Detektor von Shimadzu angeschlossen war, verwendet. Bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Flußrate von 1 ml/min der mobilen Phase, einem Hexan: Isopropanolgemisches von 95: 5 (vol/vol), wurde das Verhältnis des Cholestenons zu einem Internen Standard ermittelt. Der Referenzbereich für Cholestenon lag dabei bei 6 µg/ml bis 49 µg/ml.



**HPLC-Analyse von 7α-HC im Serum**

### 3.5.3. Absoluter und relativer Serumgehalt an Gallensäuren

Die einzelnen Gallensäuren im Serum wurden an den Tagen 0, 10 und 40 in ihrem absoluten und relativen Serumgehalt bestimmt. Die verschiedenen Gallensäuren analysierten wir mit der kapillaren Gaschromatographie. Die Aufarbeitung der Gallensäuren erfolgte analog Methoden, mit denen Beuers, Sauter sowie Müller in unserem Labor große Erfahrung haben (5), [12], [92], [93]. 1 ml Patientenpoolmenge und 0,5 ml Serum wurden zusammengeführt, da die enthaltenen Gallensäuren von der Poolmenge bekannt waren und somit als Kontrolle dienen konnten. Zu den 1,5 ml wurden 50 µg Stammlösung (5 mg/ 1 ml CH<sub>3</sub>OH; Verdünnung 1:100) des Internen Standards hinzugegeben, die entsprechend 2,5 µg Hyodeoxycholsäure (5β-Cholan-Säure-3α-,6β -Diol) als Internen Standard enthielt. Durch starkes Alkalisieren mit 8 ml 0,1 n NaOH und Erhitzen auf 64°C wurde die für die Analyse störende Proteinbindung der Gallensäuren aufgespalten. Proteine wurden nicht an die C<sub>18</sub>-Bond Elutsäulen gebunden. Sodann wurden die 1 ml Bond-Elut-Säulen mit den Bond-Elut-Reservoirs mittels Vac-Elut mit 5 ml Methanol, 5 ml bidest. H<sub>2</sub>O und 2 ml 0,1 n NaOH in einem ersten Schritt gewaschen. Ein weiterer Waschvorgang wurde mit 0,1 n NaOH und 5 ml H<sub>2</sub>O wiederholt. Die Eluierung erfolgte mit 6 ml CH<sub>3</sub>OH/ H<sub>2</sub>O (750 ml/ 250 ml). Mit 2-3 Tropfen 1 n HCl wurde das Eluat auf pH 3,5 gebracht. Anschließend wurde mit 6 ml Hexan 30 sec lang gevortext, die Hexanphasen abgehoben und unter N<sub>2</sub> im Wasserbad bei 64°C zur Trockne eingedampft. Im Serum liegen die Gallensäuren zu einem bedeutenden Teil als Sulfatester vor. Die Solvolyse in wasserfreiem saurem Milieu spaltete Sulfatgruppen ab. R-OSO<sub>3</sub> reagierte so zu R-OH. Dazu mußte 1 ml HCl/ CH<sub>3</sub>OH und 9 ml Aceton aufgenommen werden. Dies wurde gevortext, 1 min im Ultraschallbad und dann 3 h im Wasserbad bei 37°C stengelassen. Die Neutralisierung erfolgte mit 1 ml NaOH/ MeOH. NaSO<sub>4</sub> bildete einen weißen Niederschlag. Bei 64°C dampfte das Gemisch unter N<sub>2</sub> ab.

Die enzymatische Hydrolyse wurde mit der Cholylglyzinhydrolase durchgeführt, die bei pH von 5,6 bei 37°C seine optimale Aktivität zeigte.

### 3.METHODEN

So konnten die Glyzin- und Taurinkonjugatgruppe abgespalten werden. Nicht-sulfatierte Hydroxygallensäuren wurden innerhalb kurzer Zeit dekonjugiert, Oxogallensäuren erforderten dagegen mehrere Stunden. Hierzu wurde der Rückstand aus dem Schliffgläschen in 4 ml H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen, ein pH von 5,8-6,0 mit 0,2 n Essigsäure eingestellt und 400 µl Na-Acetatpufferlösung (pH 5,6) zugegeben. Es wurde zunächst gevortext sowie im Ultraschallbad durchmischt. Je 100 µl 0,2 n EDTA-Lösung und 0,2 n Mercaptoethanolösung wurden frisch angesetzt und anschließend eingemischt. Schließlich wurde 20 µl Enzymlösung entsprechend 20 units Cholyglyzinhydrolase mit 1,5 ml H<sub>2</sub>O bidest dazugegeben. Die mit Schliffstopfen versehenen Gläschen sollten über Nacht bei 37°C im Wasserbad stengelassen werden. Am nächsten Tag kühlten diese ab und wurden mit 2 Tropfen 1 n HCl beginnend auf pH 3,5 eingestellt. Die leeren Bond-Elut-Säulen wurden mittels Glasstab mit 2 Filterplättchen beschickt. Die Säulen wurden mit methanolischer Suspension von Lipidex 1000 gefüllt. Lipidex wurde absitzen gelassen. Sodann wurden die Säulen mit 2 x 5 ml Methanol und 3 ml 0,01 n HCl gewaschen. Die vorbereiteten Säulen sollten nicht trockenlaufen, während die Proben auf diese gebracht wurden und langsam durchgesaugt wurden. Mit 2 x 7 ml 0,01n HCl und 3 x 7 ml H<sub>2</sub>O-bidest. wurde erneut gewaschen. Nach der letzten Wasserspülung wurde bis zur Trockene der Elutröhrchen abgesaugt. Zum Auffangen des Eluats wurden saubere weite Schliffgläschen in die Vac-Elut-Box gegeben. Mit 2 x 5ml Methanol/ H<sub>2</sub>O (750 ml CH<sub>3</sub>OH + 250 ml H<sub>2</sub>O) wurde das Eluat gewonnen. Dieses wurde bei 64°C im Wasserbad zur Trockene eingedampft, da die anschließende Methylierung nur bei Abwesenheit von Feuchtigkeit gelingen konnte. Zur Methylierung wurden nacheinander 1 ml Methanol + 1 ml Dimethoxypropan + 50 µl konz. HCl hinzugegeben und 30 Minuten bei Zimmertemperatur in verschlossenen Gläsern stengelassen. Danach dampfte diese Lösung unter N<sub>2</sub> Strom im Wasserbad bei 64°C bis zur vollkommenen Trockene ab. Währenddessen konnte die Zeit genutzt werden, das Trimethylsilylierungsreagenz anzusetzen. Es bestand aus 3 Teilen Pyridin (trocken über KOH-Plättchen) +2 Teilen Hexamethyldisilazan +1 Teil Chlortrimethylsilan. Alles wurde im

### 3.METHODEN

Zentrifugengläschen kurz durchmischt und 45 Minuten bei 4000 u/ min zentrifugiert. Der wichtige Schritt der Silylierung bestand darin, zu dem oben gewonnenen trockenen Rückstand 0,5 ml frisches TMS-Reagenz hinzuzugeben. Schließlich wurde gevortext und die Gläser mit Stopfen und Klammern 15 Minuten bei 64°C ins Wasserbad gestellt. Nach Entfernung der Stopfen dampften diese unter N<sub>2</sub>-Strom im Wasserbad bei 64°C bis zur Trockene ab. Das Aufnehmen des Rückstandes erfolgte mit 2 x 400 µl Isooctan. Nach Vortexen und Überführen in Mini-Vials wurde nochmals mit 400 µl Isooctan nachgespült, gevortext und erneut restlos in Mini-Vials pipettiert. Mit einem Schraubverschluß, in den ein beschichtetes Septum gelegt wurde, wurden die Gläschen verschlossen. Dabei war darauf zu achten, daß die beschichtete Seite zur Isooctanlösung hin einlegt wurde. Zur Aufbewahrung wurden die fertig derivatisierten Proben in den Tiefkühlschrank gegeben. Vor Injektion in den Gaschromatographen mußten die Proben zur Trockene abdampfen und mit 25 µl Isooctan aufgenommen werden. Es wurden ca. 0.6 µl Lösung in den Gaschromatographen on-column-injiziert und in einem Gaschromatographen der Firma Carlo Erba analysiert. Wir verwendeten dazu eine Kapillarsäule CP-Sil-19 CB der Firma Chrompack. Verschiedene Retentionszeiten, die uns durch Probeläufe der Reinsubstanzen bekannt waren, lieferten die Grundlage für die Zuordnung der Peaks im Serum der Probanden. Dabei erschienen die Peaks in der Reihenfolge Isolithocholsäure, Lithocholsäure, Isoleoxycholsäure, Deoxycholsäure, Cholsäure, (Iso) Chenodeoxycholsäure, Isoursodeoxycholsäure und Ursodeoxycholsäure.

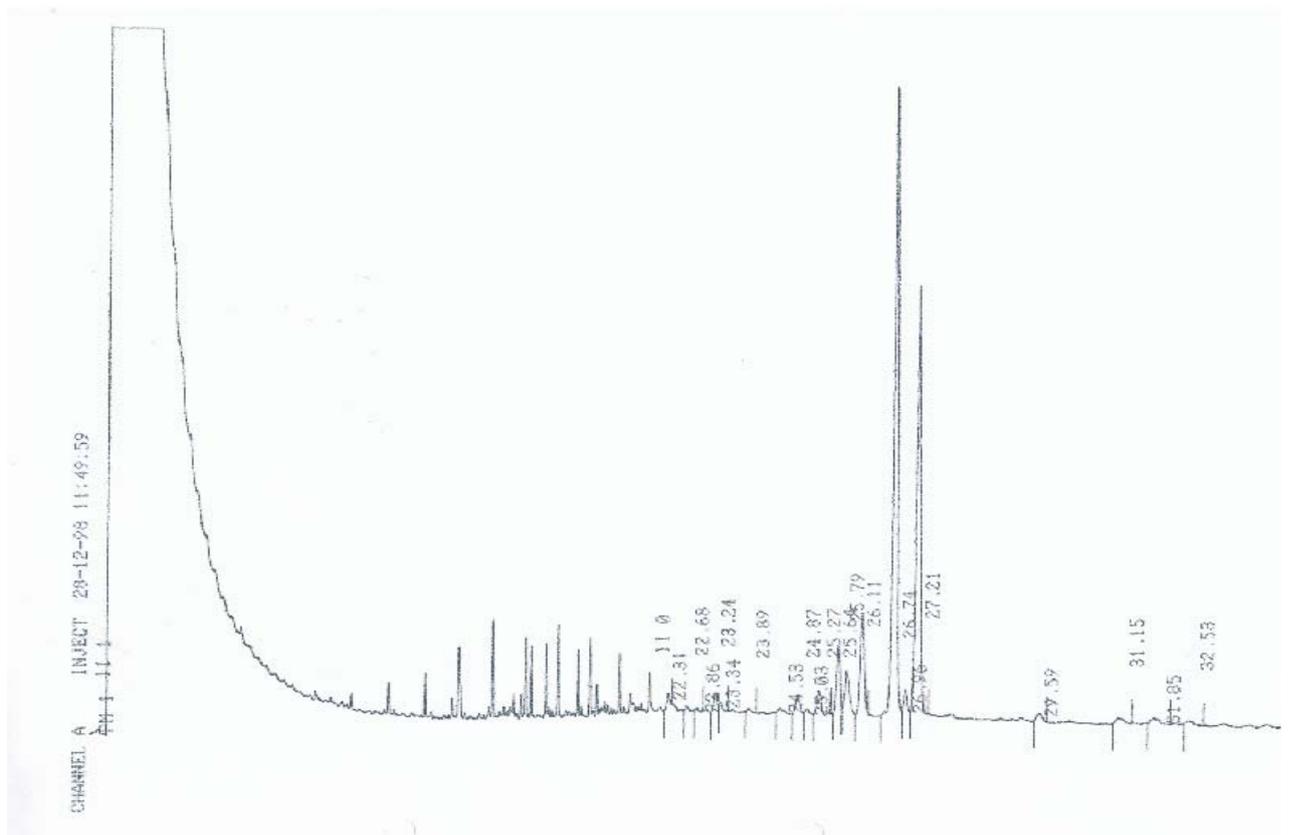
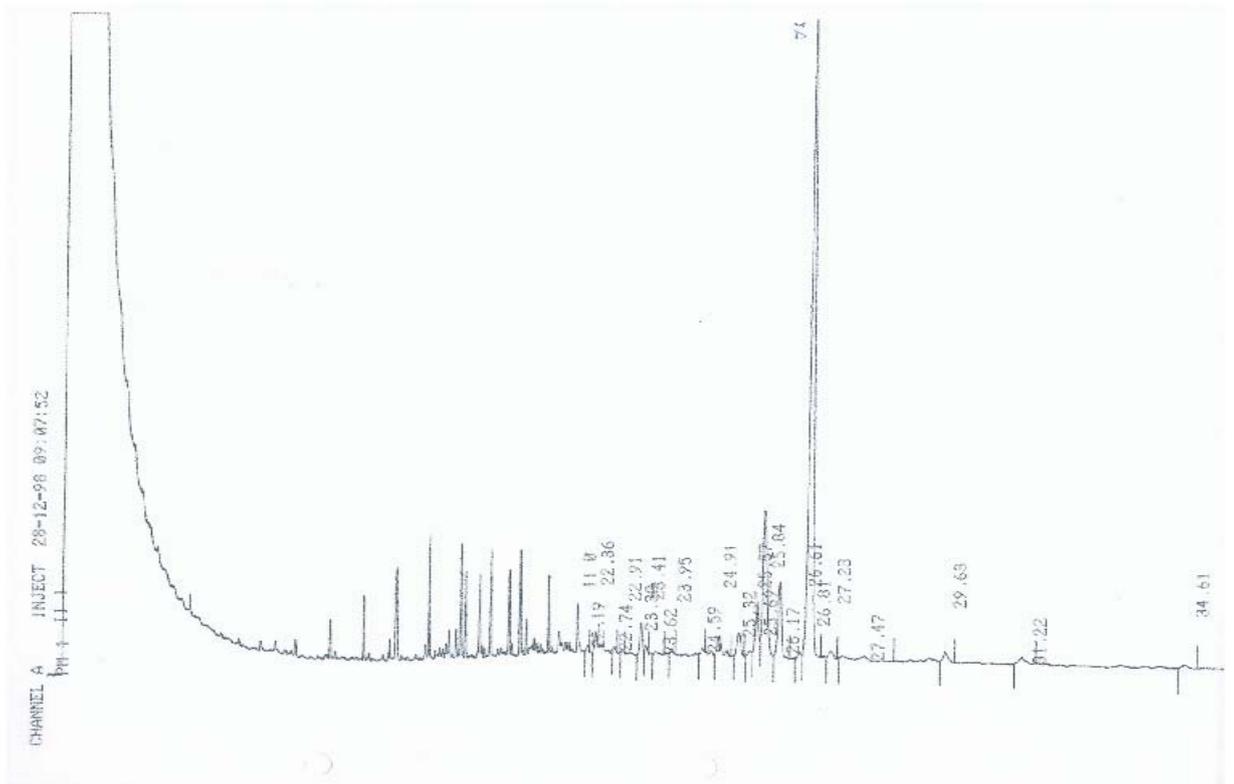
### 3.METHODEN

NAME	UMOL/L	RT	AREA BC	RF
1	0.	22.19	5460 01	
2	0.	22.36	15883 01	
CHOLEST	0.567	23.3	37279 02	65747.795
4	0.	23.41	11369 03	
5	0.	23.95	5609 01	
ISOLITHO	0.718	24.59	6201 01	8636.49
LITHO	1.052	24.91	39379 01	37432.51
ISODEOXY	0.75	25.32	39392 01	52522.667
9	0.	25.57	9284 02	
DEOXY	1.509	25.69	97924 02	64893.307
CHOL	3.373	25.84	324611 02	96238.067
CHENO	1.986	26.17	139172 03	70076.536
BETADELTA	0.868	26.61	7861 02	9056.452
HYDEOXY	INTERNAL STD	26.81	1303966 03	1.
URSO	0.818	27.23	13066 01	15973.105
HYOCHOL	0.59	27.47	20156 01	34162.712
17	0.	29.63	22374 01	
18	0.	31.22	17865 01	
19	0.	34.61	10075 01	
20	0.	38.91	213008 01	

#### Darstellung der Gallensäurepeaks im Serum

Die Gallensäuren erschienen in der Reihenfolge von oben nach unten, rechts daneben die Retentionszeiten. Hydoexycholeensäure als Interner Standard.

### 3.METHODEN



**Retentionszeiten (RT) verschiedener Gallensäuren: oben: Tag 1, unten: Tag 40.**

x-Achse: Interner Standard (IS) RT 26,8. UDCA RT 27,2. y-Achse: Quantität der entsprechenden Substanz, z.B. nimmt Ursodeoxycholsäure zu.

Gaschromatographie- Bedingungen

Säule: CP Sil 19 von Chrompack, 25 m, ID=0,32 mm, AD=0,45 mm

Säulentemperatur: 140°C – 265°C, 6°C/ min

265°C 18 min iso

265°C – 290°C, 3°C/ min

290°C 2 min iso

Injektion: on column

Injektionsmenge: 0,6 µl

Trärgas: Helium

FID-Detektor: 300°C

H<sub>2</sub> 0,8 kg/ cm<sup>2</sup>

Luft 1,0 kg/ cm<sup>2</sup>

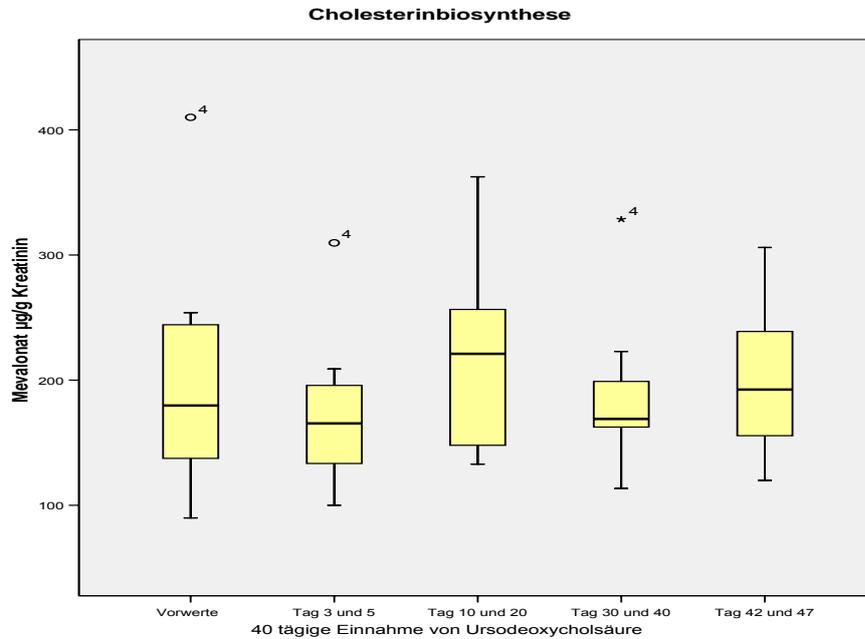
Make up Gas Helium 1,0 kg/ cm<sup>2</sup>

**3.5.4. Analyse von Proben nach dem Lipidgehalt**

Die am Morgen entnommenen Blutseren wurden umgehend mit dem Analysegerät Epos der Firma Eppendorf bestimmt. Für die Apo-Fragmente wurden die Antikörper Anti-Apo A-I und Anti-Apo B von Behring, Marburg, sowie der Nephelometer 100, Firma Behring, Schwalbach, verwendet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Cholesterinbiosynthese

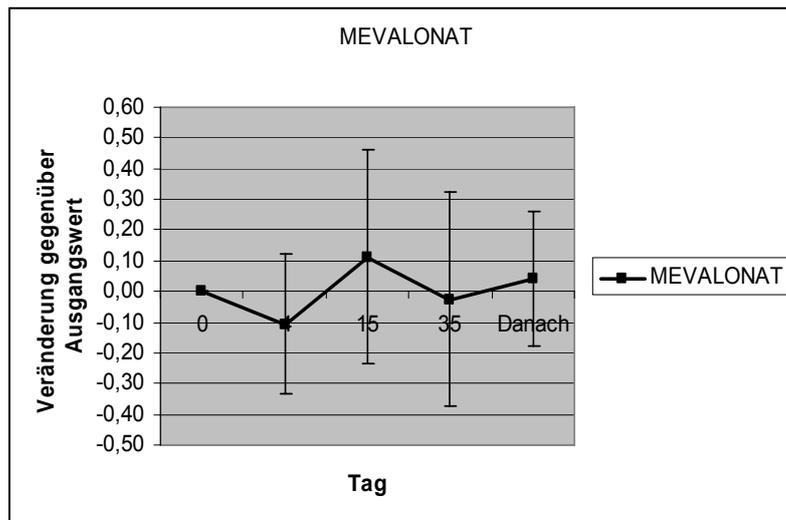


#### Cholesterinbiosynthese während 40tägiger Einnahme von Ursodeoxycholsäure

Als Parameter der Cholesterinbiosynthese des gesamten Körpers wurde die Ausscheidung von Mevalonat  $\mu\text{g}/\text{g}$  Kreatinin im Urin bestimmt. Die Meßzeitpunkte von jeweils acht Probanden wurden in Boxplots (manchmal sog. Box-and whisker plots genannt) zusammengefaßt, die das 25., 50. und 75. Perzentil sowie den zweifachen Interquartilabstand der 25. und 75. Perzentile nach oben und unten wiedergeben. Die mit Ziffern bezeichneten Kringel stehen für Patienten, die statistische Extremwerte ( $>$ dreifacher Interquartilabstand der 25. und 75. Perzentile) darstellen.

Während der 40tägigen oralen Verabreichung von 8-14  $\text{mg}/\text{kg}$  Körpergewicht Ursodeoxycholsäure änderte sich die Biosynthese von Cholesterin nicht.

#### 4. ERGEBNISSE



Auf der x-Achse sind die Mittelwerte zu den jeweiligen Testzeitpunkten dargestellt, die den Verlauf vom Ausgangswert (Mittelwert der Tage -1 und Tag 0) wiedergibt. Die vertikale Begrenzung umgrenzt das 95 % Konfidenzintervall zum jeweiligen Zeitpunkt. Eine Schwankung über dieses 95 % Niveau wäre signifikant.

#### Bezug von Mevalonat zu anderen Parametern

Die Mevalonatkonzentration korrelierte in den durchgeführten Messungen nicht mit  $7\alpha$ -HC.

Weder Mevalonat noch  $7\alpha$ -HC standen in statistisch signifikanter Beziehung zum Gewicht der Probanden, deren Alter oder Bodymassindex.

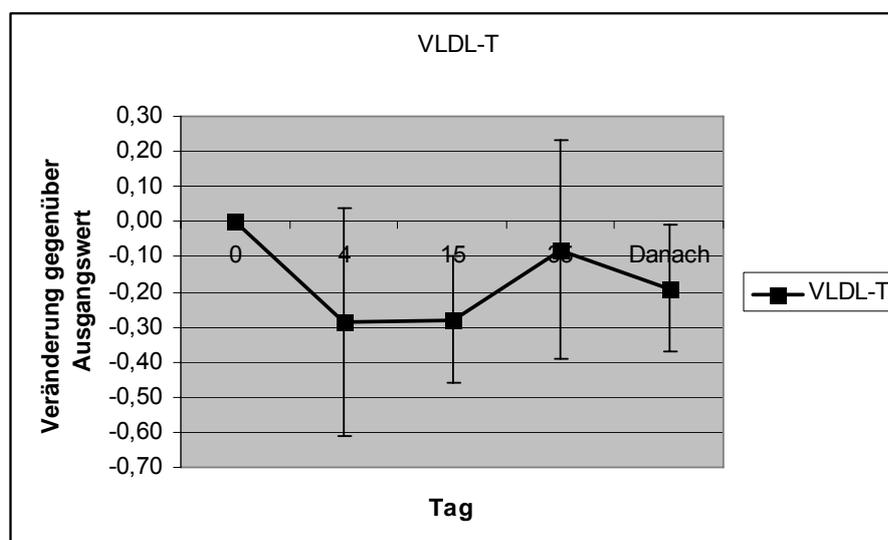
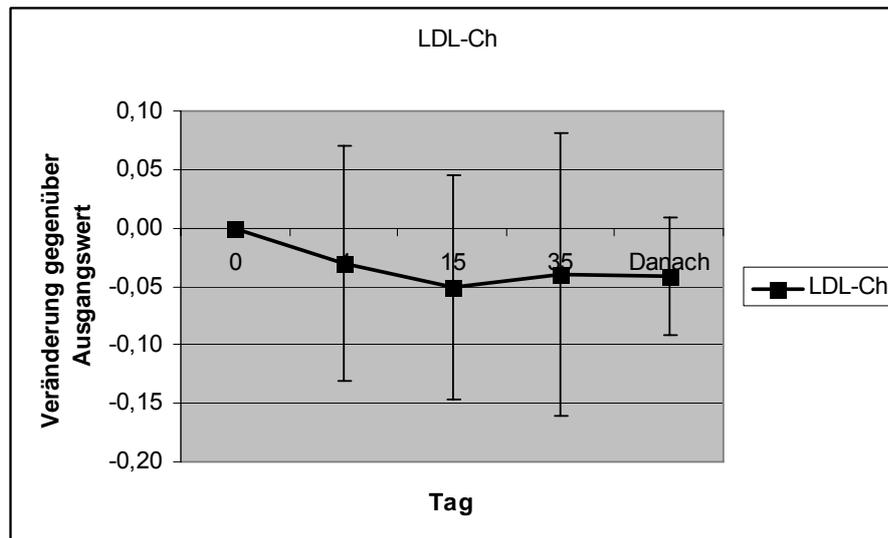
## 4.2. Lipidwerte

	Cholesterin	LDL-Ch.	VLDL-Ch.	HDL-Ch.	APO-A1	APO-B	Triglyz.	VLDL-Triglyz.
Kontrolle	173 ± 29	116 ± 37	13 ± 5	54 ± 12	158 ± 23	92 ± 17	93 ± 47	86 ± 40
Tag 1	174 ± 27	104 ± 21	17 ± 9	53 ± 13	153 ± 23	86 ± 16	100 ± 54	81 ± 61
Tag 3	170 ± 27	103 ± 24	14 ± 6	53 ± 12	155 ± 23	87 ± 20	77 ± 29	55 ± 26
Tag 5	167 ± 28	98 ± 30	16 ± 6	54 ± 14	157 ± 26	85 ± 24	82 ± 32	64 ± 35
Tag 10	167 ± 24	94 ± 22	16 ± 8	57 ± 15	164 ± 29	83 ± 20	92 ± 40	72 ± 43
Tag 20	179 ± 21	104 ± 22	15 ± 5	60 ± 13	165 ± 38	90 ± 20	92 ± 29	58 ± 19
Tag 30	176 ± 24	102 ± 22	19 ± 7	56 ± 14	162 ± 30	88 ± 16	106 ± 36	77 ± 33
Tag 40	167 ± 24	98 ± 21	16 ± 5	55 ± 12	160 ± 30	86 ± 21	90 ± 20	74 ± 15
Tag 42	171 ± 22	99 ± 17	16 ± 9	56 ± 14	163 ± 30	88 ± 19	98 ± 40	76 ± 42
Tag 47	174 ± 24	100 ± 23	16 ± 10	57 ± 14	161 ± 25	89 ± 22	94 ± 46	70 ± 51

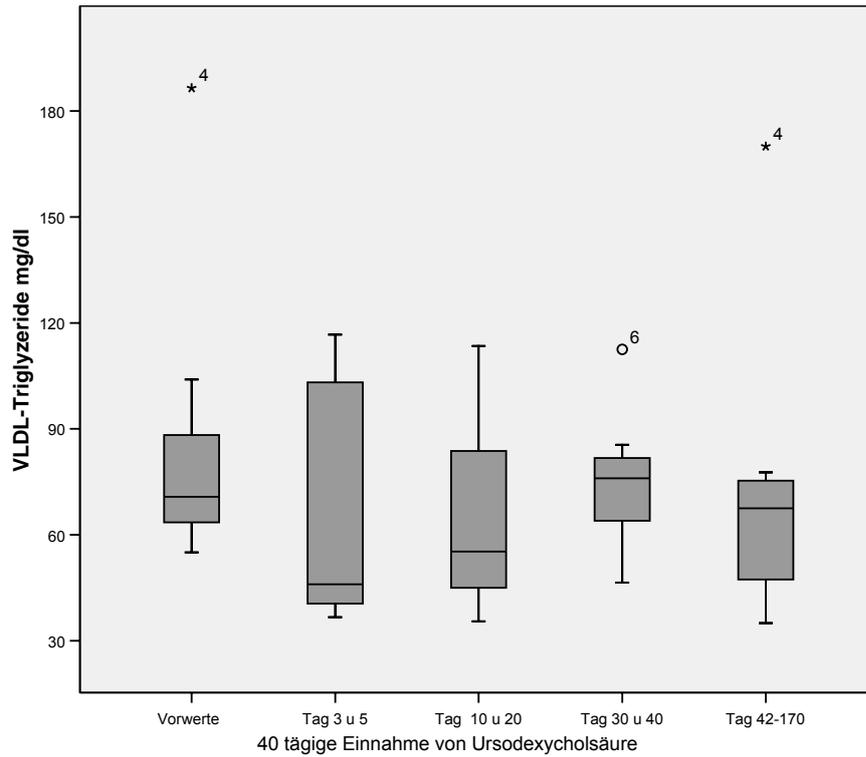
### Lipidwerte bei Einnahme von Ursodeoxycholsäure

Die Konzentrationen der Serumlipoproteine blieben während des gesamten Versuchszeitraumes weitestgehend unverändert.

Während der 40tägigen Einnahme von Ursodeoxycholsäure blieben die Werte von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride und VLDL-Cholesterin bezogen auf das Konfidenzintervall weitgehend gleich. LDL- und VLDL-Triglyzeride sanken vorübergehend ab. Das Absinken des gemeinsamen VLDL-Wertes für die Tage 10 und 20 überschritt das 95 % Konfidenzintervall ( $p=0,037$ ). Am Tag 20 (siehe Tabelle Kap. 4.2.) fielen die Werte für VLDL-Triglyzeride bei allen acht Probanden signifikant.



**VLDL-Triglyzeride während der Einnahme von Ursodeoxycholsäure**



**VLDL-Cholesterin bei 40 tägiger Einnahme von Ursodeoxycholsäure**

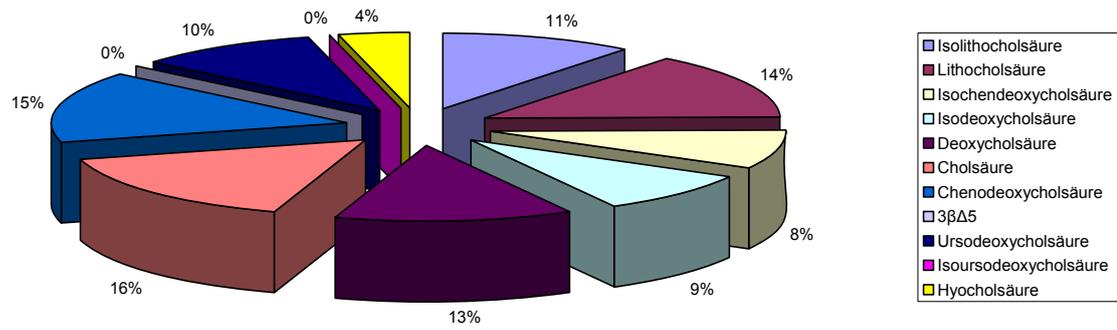
Lipidwerte im Bezug zu Mevalonat

Die Kontrollwerte der VLDL-Triglyzerid-Konzentrationen korrelierten positiv mit den Serumkonzentrationen von Mevalonat (Korrelation mit Vorwerten 0,86,  $p=0,006$ ; Korrelation unter Berücksichtigung der Tage nach Einnahme von Ursodeoxycholsäure 0,54,  $p=0,001$ ).

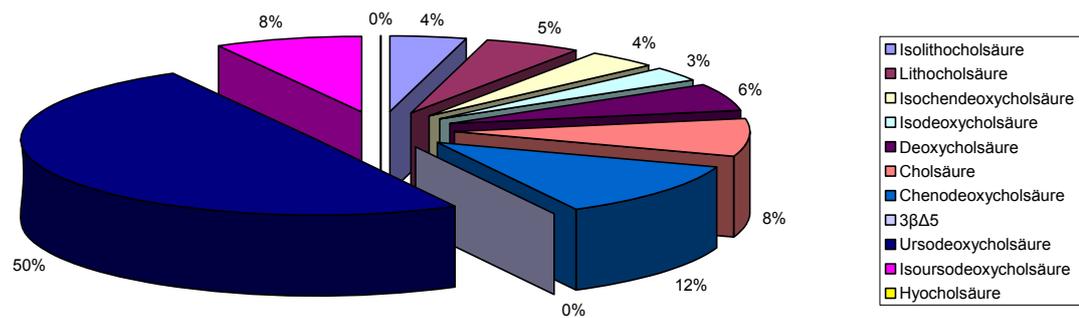
#### 4. ERGEBNISSE

### 4.3. Verteilung der Gallensäuren im Serum

Gallensäuren im Serum vor Einnahme von Ursodeoxycholsäure

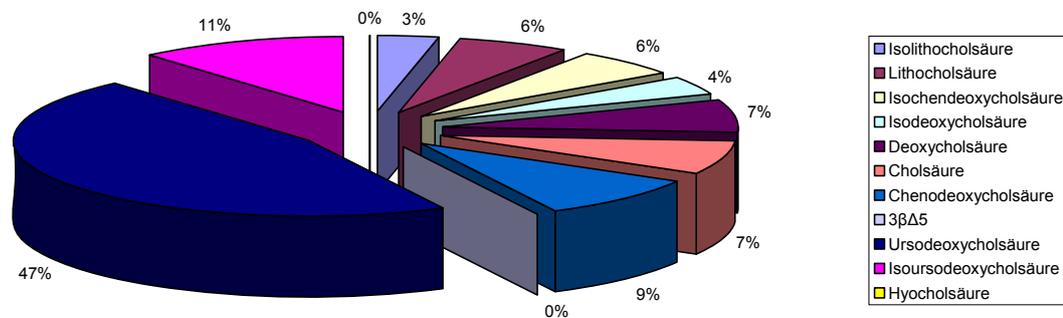


Gallensäuren im Serum nach 10tägiger Einnahme von Ursodeoxycholsäure



#### 4. ERGEBNISSE

##### Gallensäuren im Serum nach 40 Tagen Ursodeoxycholsäureeinnahme

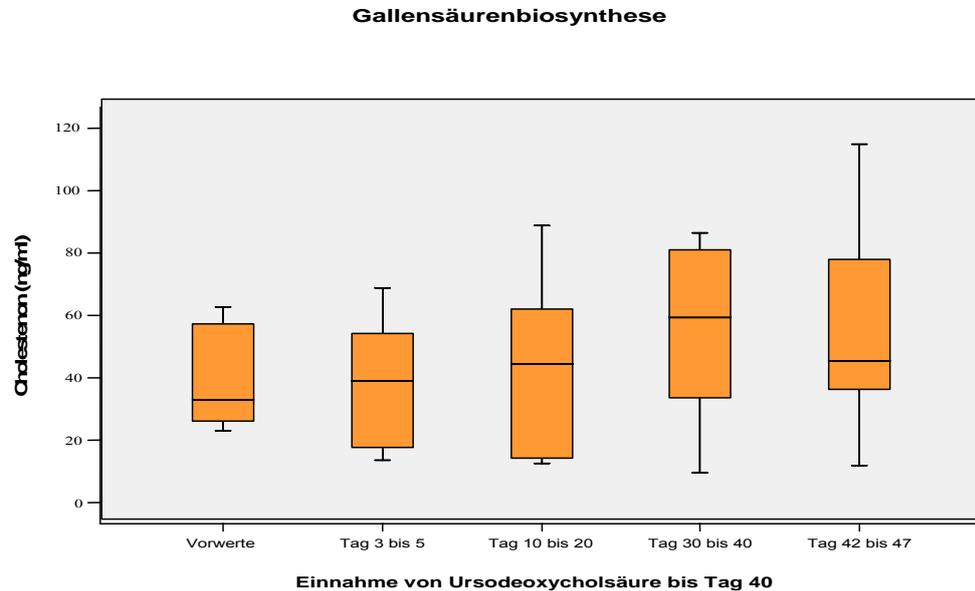


##### VLDL-Cholesterin bei 40 tägiger Einnahme von Ursodeoxycholsäure

Neben den oben genannten Gallensäuren lagen ihre Isoformen Isochenodeoxycholsäure, Isolithocholsäure und Isoursodeoxycholsäure im Serum vor.

Bei der Berechnung wurden daher die Menge sämtlicher im Serum zum jeweiligen Zeitpunkt detektierten Gallensäuren zugrundegelegt. Die Daten konnten von sieben Probanden erhoben werden und sind als Median wiedergegeben. Durch die Verabreichung von Ursodeoxycholsäure nahm deren Anteil an den fünf Hauptgallensäuren zu. So 2,5fachte sich der Anteil der hydrophilen Gallensäuren Cholsäure und Ursodeoxycholsäure von 26 % aller Gallensäuren vor Einnahme auf 65 % nach 40 Tagen. Vor Einnahme von Ursodeoxycholsäure machte letztere mit Isoform im Mengenverhältnis etwa die Hälfte von Chenodeoxycholsäure aus. Nach 10 Tagen war der Anteil von Ursodeoxycholsäure geringfügig höher (50 %) als nach 40 Tagen Substitution (47 %), was aber durch die Isoform von Ursodeoxycholsäure (8 % vs. 11 % nach 40 Tagen) ausgeglichen wurde. Nach 40 Tagen drehte sich das Größenverhältnis um, so daß Ursodeoxycholsäure etwa in vierfacher Höhe von Chenodeoxycholsäure und Isoform vorlag.

#### 4.4. Gallensäurenbiosynthese



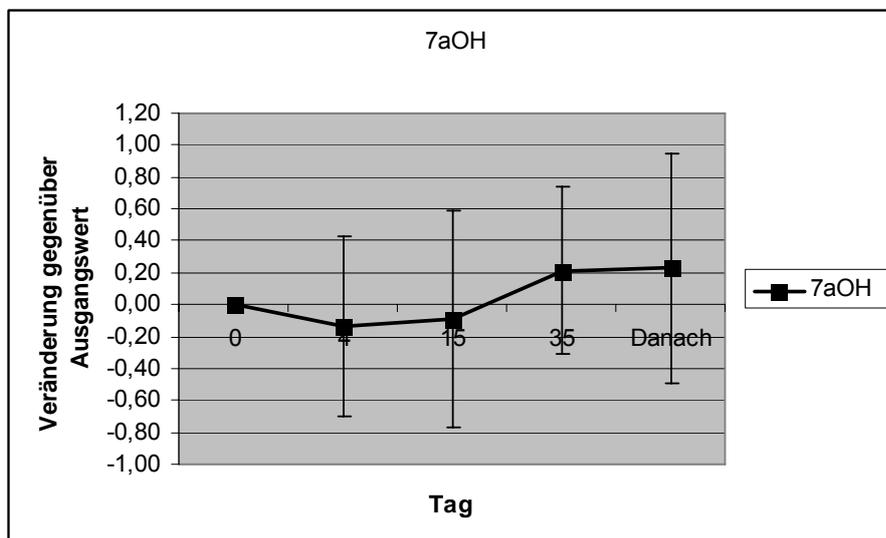
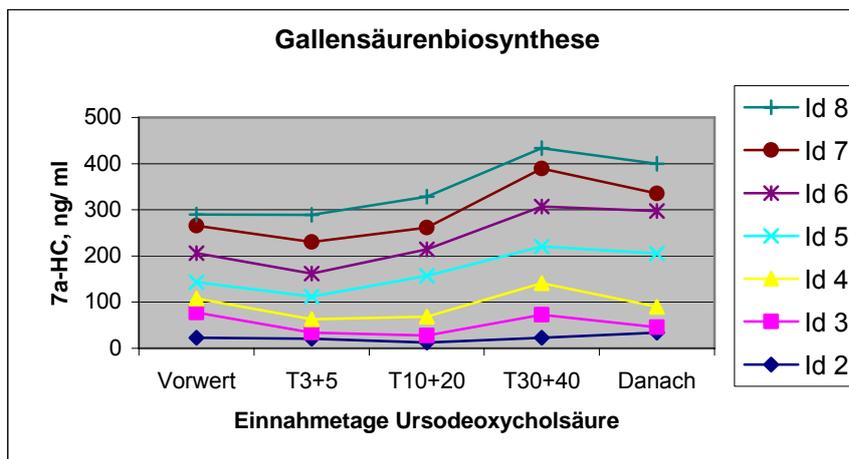
##### **Gallensäurenbiosynthese während 40 tägiger Ursodeoxycholsäureeinnahme**

Die Gallensäurenbiosynthese wurde anhand von  $7\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-on im Serum ( $7\alpha$ -HC, ng/ml) bestimmt.

Die Einnahmezeitpunkte wurden in Box- (25., 50., 75. Perzentil) und Whiskerplots (vertikale Linien) zusammengefaßt.

Nach Verabreichung von 8-14 mg/kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure pro Tag blieb die Gallensäurenbiosynthese zunächst über drei Wochen unverändert. Am 30. und 40. Tag stieg der Katabolismus zu Gallensäuren gegenüber den Vorwerten.

#### 4. ERGEBNISSE



#### Gallensäurenbiosynthese nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure

In der oberen Grafik sind die Einzelverläufe dargestellt, die darunterliegende gibt den Mittelwert der Gallensäurebiosynthese (gemessen anhand von  $7\alpha$ -HC) mit 95 %-Konfidenzintervall wieder. Abweichungen darüberhinaus wären somit auf dem 5 % Niveau signifikant. Nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure blieb die Gallensäurenbiosynthese zunächst bis zum 10. und 20. Tag unverändert. Am 30. und 40. Tag stieg der Katabolismus zu Gallensäuren gegenüber den Vorwerten.

## **5.DISKUSSION**

Kernfrage dieser Arbeit war, welche Auswirkungen die Verabreichung von Ursodeoxycholsäure auf die Cholesterinbiosynthese und auf die Gallensäurenbiosynthese hat.

### **5.1. Cholesterinbiosynthese**

Wenn Ursodeoxycholsäure zugeführt wird, ist die Cholesterinsekretion in die Galle reduziert. Folglich sinkt die Cholesterinsättigung in der Blasengalle [111]. Wie kann dennoch das Gleichgewicht des Cholesterins in der Leber aufrecht erhalten werden? Die Vermutung lag nahe, die Cholesterinbiosynthese erniedrige sich. Dies nämlich hätte eine verringerte Sekretion von Cholesterin in die Galle erklären können. Die These dieser Arbeit ging jedoch davon aus, daß nicht die Cholesterinbiosynthese alleine für die Aufrechterhaltung des Cholesteringleichgewichts verantwortlich war, sondern die Gallensäurenbiosynthese eine bedeutende Rolle spiele. Ursodeoxycholsäure, so die Überlegung, verändere die Cholesterinbiosynthese nicht. Angelin et al. belegten 1994 bei einer Dosierung von 15 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure eine unveränderte Cholesterinbiosynthese im Vergleich zu Vorwerten [5], [8]. Sein Ergebnis untermauerte, daß Ursodeoxycholsäure die Cholesterinbiosynthese unverändert läßt - wie auch die vorliegende Arbeit bestätigte.

Voruntersuchungen brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Im Literaturvergleich ergaben die vorhandenen Daten einerseits eine reduzierte Cholesterinbiosynthese nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure [63], [90], andererseits fanden sich auch Angaben, daß Ursodeoxycholsäure die Cholesterinbiosynthese erhöhen würde: Eine einwöchige Ursodeoxycholsäure-Behandlung steigerte die HMG-CoA-Reduktase, eine dreiwöchige sogar um bis zu 50 % [15], [22]. Dementgegen lieferten Untersuchungen nach 3-5 Monaten eine um mehr als ein Drittel reduzierte Cholesterinbiosynthese. Zwei Patienten zeigten dabei nach einem Jahr

Ursodeoxycholsäurebehandlung eine Reduzierung der Cholesterinbiosynthese [63], [90].

Wie kamen die unterschiedlichen Resultate zustande? Erklärten sich divergierende Ergebnisse über die Cholesterinbiosynthese durch die unterschiedlichen Meßzeitpunkte von einer Woche bis zu sechs Monaten? Unser Studienentwurf sollte es ermöglichen, den langfristigen zeitlichen Verlauf im intraindividuellen Vergleich zu beobachten. Die vorliegenden Resultate, daß die Gesamtcholesterinbiosynthese offensichtlich deutlichen intraindividuellen Schwankungen unterlegen war, lieferten eine weitere Interpretationshilfe für die zunächst scheinbar unterschiedlichen Ergebnisse im Literaturvergleich. Pharmakologisch waren diese nicht zu begründen, da nach etwa 5 Tagen ein steady state hätte erreicht sein sollen (2). Ein gerichteter Trend oder eine Periodik unserer Ergebnisse konnte nicht festgestellt werden. Gehen wir von einem Intervall aus, in dem sich die individuelle Cholesterinbiosynthese bewegte, mußten die unterschiedlichen Ergebnisse nicht als Widerspruch gewertet werden. Bisher vorliegende Arbeiten unterschieden sich hinsichtlich verwendeter Methodik. In den meisten Arbeiten wurden Leberbiopsate analysiert, wobei die Messung der Enzymaktivität bei Biopsaten als komplex gilt und nur indirekt mit der Gesamtkörper-Cholesterinbiosynthese vergleichbar war. In der vorliegenden Studie verwendeten wir mit der kombinierten Gaschromatographie- und Massenspektrometrie eine indirekte Methode, die sehr gut mit Mevalonsäure korrelierte [103]. Weiterhin wurden bisherige Studien oft an Gallensteinpatienten durchgeführt. Bei unserem Kollektiv handelte es sich um gesunde Personen.

Das Resultat der vorliegenden Arbeit, daß Ursodeoxycholsäure die Cholesterinbiosynthese nicht verändert, korreliert mit Daten Hillebrants. Dieser verabreichte Ursodeoxycholsäure gleichzeitig mit Pravastatin, welches das für die Synthese des Cholesterins notwendige Enzym HMG-CoA-Reduktase hemmte [34]. Die Kombination von Ursodeoxycholsäure mit Pravastatin unterband die Cholesterinbiosynthese, aber es reduzierte die Cholesterinsättigung der Galle nicht mehr als Ursodeoxycholsäure alleine. Sein Ergebnis legte nahe, daß de-novo synthetisiertes Cholesterin nicht wie

vormals angenommen die biliäre Cholesterinsekretion reguliert. Letzteres unterstützt wie die vorliegende Arbeit die These, daß Ursodeoxycholsäure keinen signifikanten Einfluß auf die Cholesterinbiosynthese ausübt [21]. Die Reduzierung des Cholesterins in der Galle bei gleichbleibendem Serumcholesterinspiegel konnte somit durch die unveränderte Cholesterinbiosynthese nicht erklärt werden. Als Ergebnis unserer Studie kann festgehalten werden, daß die 40tägige Einnahme von Ursodeoxycholsäure wie hypothetisch angenommen keine signifikante Veränderung der Cholesterinbiosynthese bewirkt.

### **5.2. Cholesterinstoffwechsel**

Die Leber hat eine Stoffumverteilungsfunktion. Insofern war die Überlegung, ob das Cholesterin der Leber in Lipoproteine umgewandelt würde, wenn Ursodeoxycholsäure verabreicht wurde. So hätte sich eine Änderung der Lipoproteine ergeben, wodurch das Fortbestehen eines Cholesteringleichgewichts zu begründen gewesen wäre. Li et al. zeigten 2004 auf, daß im enterohepatischen Kreislauf zur Leber zurückkehrende Gallensäuren die Cholesterinspiegel indirekt beeinflussen konnten [51]. Frühere Beobachtungen ließen vermuten, daß LDL-Cholesterin nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure sank und so das Cholesteringleichgewicht indirekt beeinflusste [37]. Diese Studie kam hingegen zu dem Ergebnis: Ursodeoxycholsäure veränderte das Lipoproteinprofil nicht. Wie 1994 bei Angelin ergab sich kein Einfluß von Ursodeoxycholsäure auf den Spiegel von LDL-Cholesterin [5], [7]. Die geringfügige Erniedrigung von LDL bei einzelnen unserer Patienten bewerteten wir als Schwankung innerhalb des Konfidenzintervalls. Die Anzahl der LDL-Rezeptoren erhöhte sich bei Woollett et al. 2003 nicht, während ein strenges Ernährungsprotokoll geführt wurde [116]. Ihr Ergebnis untermauerte einen konstanten LDL-Spiegel während der Verabreichung von Ursodeoxycholsäure und sprach gegen die Theorie, nach der Gallensäuren möglicherweise die Serumlipidlevel durch Steigerung der

LDL-Rezeptoren beeinflussen sollten. Da genetische Polymorphismen des Gens der 7 $\alpha$ -Hydroxylase nicht zu einer Veränderung des LDL-Cholesterins führten, scheint die Gallensäurebiosynthese nicht in direktem Zusammenhang mit LDL-Cholesterin zu stehen [2]. Denkbar war, HDL-Cholesterin könnte den Cholesterinstoffwechsel regulieren. Malerod et al. berichteten 2005 von Versuchen mit Chenodeoxycholsäure, die eine mögliche Rückkopplung des HDL-Rezeptors SR-BI durch Gallensäuren aufzeigten [61]. Nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure blieb das Verhältnis von HDL zu LDL jedoch in der vorliegenden Arbeit wie ebenfalls bei Hofmann 1994 unbeeinflusst [36]. Auch die anderen Lipoproteine wandelten sich korrespondierend zu Roda et al. 1994 nicht signifikant [81]. Woollett et al. fanden 2003 nach 14 Tagen Ursodeoxycholsäure ein unverändertes Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin und Triglyzeride vor [116].

Weitere Argumente für eine unveränderte Cholesterinbiosynthese und gleichbleibende Lipoproteine lieferten Arbeiten, in denen die Cholesterinabsorption, die fraktionierte Syntheserate von Cholesterin und die HMG-CoA-Reduktase mRNA gleich blieben [8], [36], [116].

VLDL-Triglyzeride waren in der vorliegenden Studie am Tag 3 und Tag 5 vorübergehend vermindert, am Tag 20 sogar signifikant niedriger als die Vorwerte. Es wurde diskutiert, ob Gallensäuren eine Regulierungsfunktion der Serumlipidlevel zukäme, indem sie möglicherweise zur Senkung von Triglyzeriden beitragen [4], [5], [53], [94], [115]. Diese Vermutung konnte aufgrund unserer Daten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. VLDL-Triglyzeride variieren ernährungsabhängig. Man mochte einwenden, während des Beobachtungszeitraumes von 169 Tagen für die Nachkontrollen konnte die Cholesterinbiosynthese durch die Diät beeinflusst werden [116]. In der vorliegenden Studie gingen wir von einer grundsätzlich relativ konstanten Ernährung aus und verzichteten auf ein Ernährungsprotokoll. Trotz des normalen Ernährungsspektrums, ohne definierte Diät, änderten sich die Cholesterinfraktionen und die Cholesterinbiosynthese während der Verabreichung von Ursodeoxycholsäure nicht wesentlich. Dies bestätigten auch die

vorliegenden Cholesterinwerte und Triglyzeridwerte, welche über den gesamten Meßzeitraum konstant blieben. Wurde statt 15 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure eine entsprechende Menge Chenodeoxycholsäure verabreicht, änderte sich zwar die Absorption von Cholesterin drastisch ( $p=0,013$ ,  $72.6 \% \pm 2.9 \%$ ), Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin aber nicht [116]. Weil Ursodeoxycholsäure und Chenodeoxycholsäure bei Woollett et al. auf den Lipidstoffwechsel keine unterschiedliche Wirkung zeigten, unterstrichen auch diese Resultate eine grundsätzlich gleichbleibende Cholesterinbiosynthese und unveränderte Cholesterinfraktionen.

Nachdem Ursodeoxycholsäure keine signifikante Änderung der Lipidparameter bewirkte, stellte sich die Frage, ob andere relevante chemische Umwandlungen des Cholesterins existierten, die das Cholesteringleichgewicht beeinflussen konnten. Dies ließ an Cholesterin Acyltransferase (ACAT, Enzym-Nomenklatur: 2.3.1.9.) denken, die als ein wichtiges Enzym im frühen Syntheseschritt des HMG-CoA-Zyklus bei der Cholesterinbiosynthese gilt. Scallen et al. vermuteten 1983 eine koordinierte intrazelluläre Regulation der drei Enzyme HMG-CoA-Reduktase,  $7\alpha$ -Hydroxylase und Cholesterin Acyltransferase [96]. Wenn überhaupt, sollte ein Einfluß von Ursodeoxycholsäure auf die Cholesterin Acyltransferase nicht in nennenswertem Umfang stattfinden [22]. Die Aktivität der Acyltransferase war laut Vorarbeiten nach Einnahme von Ursodeoxycholsäure eher herabgesetzt. Eine Korrelation zwischen der Hydrophobität der Gallensäuren (und damit einer Änderung des vorliegenden Gallensäurenverhältnisses) und der Cholesterin Acyltransferase-Konzentration bestand nicht [35].

Das Fehlen anderer Regulationswege und die einschlägigen Ergebnisse der oben zitierten Literatur, insbesondere von Angelin 1995, Roda et al. 1994 und Woollett et al. 2003, unterstützen die vorliegenden Ergebnisse einer gleichbleibenden Cholesterinbiosynthese sowie unveränderten Lipidparametern nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure. Diese beiden Ergebnisse deuten ihrerseits auf eine erhöhte Gallensäurenbiosynthese nach Einnahme von Ursodeoxycholsäure hin.

### 5.3. Gallensäurenbiosynthese

Eingangs wurde die These formuliert, Ursodeoxycholsäure würde die Gallensäurenbiosynthese steigern. Die gleichbleibende Cholesterinbiosynthese und die fehlende Veränderung des Lipoproteinmusters nach Einnahme von Ursodeoxycholsäure ließen vermuten, daß die Gallensäurenbiosynthese der entscheidende Mechanismus ist, einem Cholesterinüberangebot entgegenzuwirken. Das Ergebnis der vorliegenden Studie ist: Die Verabreichung von 8-14 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure über mehr als vier Wochen erhöhte die Konzentration von  $7\alpha$ -Hydroxycholestenon im Serum. Der Anstieg dieses Parameters belegte das Ansteigen der Gallensäurenbiosynthese. Da sich die Cholesterinbiosynthese nicht erhöhte, zeigten diese Ergebnisse eindrücklich, warum nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure das Lebercholesterin trotz reduziertem Gallencholesterin nicht vermehrt anfiel und darüber hinaus die Homöostase von Cholesterin der Leber bestehen blieb.

Zur Bestimmung der Gallensäurenbiosynthese wurde der indirekte Parameter  $7\alpha$ -Hydroxycholestenon im Serum verwendet. Dieses Zwischenprodukt des katabolischen Stoffwechselweges des Cholesterins korrelierte gut mit dem Schlüsselenzym  $7\alpha$ -Hydroxylase als auch mit der Gesamtmenge der produzierten Gallensäuren [10], [92]. Trotz anderer Methodik stimmten die vorliegenden Ergebnisse mit denen von Hardison und Grundy überein [31]. Diese machten sich eine radioaktive  $^{14}\text{C}$ -Markierung zu nutze, nachdem sie Ursodeoxycholsäure über einen Monat hinweg 15 mg/ kg Körpergewicht pro Tag verabreichten. Sie stellten hiermit eine Steigerung der Gallensäurenbiosynthese von 650 mg/ Tag auf 800 mg/ Tag fest. Weitere übereinstimmende Ergebnisse fanden sich in den Arbeiten von Nilsell, Rust, Roda und Frenkiel: Nilsell et al. berichteten 1983 von einer 40-80%igen Steigerung der Syntheserate von Chenochol- bzw. Chenodeoxycholsäure nach 5-6 wöchiger Substitution von 15 mg/ kg Ursodeoxycholsäure [70]. Rust et al. beobachteten 1998 bei 12 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure pro Tag bereits nach 4-6 Tagen einen Anstieg in der Gallensäurenbiosynthese [87]. Zu einem entsprechenden

Ergebnis wie diese Studie, einer Steigerung der Gallensäurenbiosynthese, kamen Frenkiel et al. 1986, die eine Erhöhung der Gallensäurenbiosynthese bei Substitution von 750 mg/ Tag Ursodeoxycholsäure nach 6-9 Monaten bei Gallensteinträgern nachwies [25], [81]. Erneut belegten Roda et al. dies 1994 mit einer Dosierung von 12 mg/ kg Körpergewicht pro Tag. Über einen kürzeren Zeitraum waren die Aktivitäten der 7 $\alpha$ -Hydroxylase-mRNA bei Rudling et al. 2002 gleichbleibend [83]. Bei Gallensteinträgern war 7 $\alpha$ -Hydroxylase nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure erniedrigt oder unverändert [25], [72], [81]. Trotz der methodisch nur eingeschränkten Vergleichbarkeit der Wirkung von Ursodeoxycholsäure bei Gallensteinträgern ließen sich im Zeitraum Tag 3 bis Tag 5 in der vorliegenden Arbeit ebenso vereinzelt verminderte Werte für Cholestenon nachweisen. Dies deckte sich in-vitro mit einer Studie von Malerod et al. 2005 [61]. Aufgrund des innerhalb des Konfidenzintervalls liegenden leichten Absinkens der Gallensäurenbiosynthese in unserer Studie konnten wir dies nicht sicher bestätigen. Wir werteten die Gallensäurenbiosynthese bis zum Tag 10 als weitgehend unbeeinflusst von der Substitution mit Ursodeoxycholsäure. Insgesamt zeigte sich, daß die gemessenen Werte für Cholestenon intra- als auch interindividuell schwankten. Theoretisch stellte sich die Frage, ob für die Umwandlung in Gallensäuren ein Isoenzym der 7 $\alpha$ -Hydroxylase oder ein „alternate pathway“ existierte, die vielleicht mit unserer Messung nicht erfaßt wurden. Dies hätte interindividuell unterschiedlich hohe Syntheseraten erklären können. Doch ein im menschlichen Körper vorhandener weiterer Stoffwechselweg für dieses Schlüsselenzym besteht nach heutiger Kenntnis nicht in relevantem Maß [22]. Genetische Polymorphismen des CYP7A1-Gens führten nicht zu einer Variation der Aktivität der 7 $\alpha$ -Hydroxylase oder der Menge der Gallensäurenbiosynthese [2]. Als Störfaktoren waren Merkmale wie Geschlecht, Cholesterinspiegel und Bodymassindex denkbar. Schwarz et al. hatten 2001 deutliche Geschlechtsunterschiede bei Mäusen beobachtet [99]. Woollett et al. wiesen 2004 auf Geschlechtsunterschiede bei der Gallensäurenbiosynthese hin; in den meisten erwähnten Studien wurden überwiegend Männer untersucht [116]. Bei einem relativ ausgewogenem

Geschlechterverhältnis, wenn auch niedriger Fallzahl, unterschied sich die Gallensäurenbiosynthese in der vorliegenden Studie geschlechtsbezogen nicht. Hypercholesterinämie Patienten, so Mazzella et al. 1992, hatten eine um 12 % erhöhte Umsetzung von Cholesterin in Gallensäuren bei einer Dosis von 10 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure [64]. Bei Hypertriglyzeridämie konnte sogar ein 76%iger Anstieg der Gallensäurenbiosynthese nach Verabreichung von 15 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure beobachtet werden [7]. Wenn auch aufgrund der Fallzahl nicht signifikant, wurde in unserer Studie bei einer übergewichtigen, aber normolipämischen Patientin mit erhöhtem Bodymassindex von 30,7 kg/ m<sup>2</sup> eine im Verhältnis vermehrte Gallensäurenbiosynthese gegenüber den übrigen Probanden nachgewiesen. Ihr Apolipoprotein-E-Phänotyp war 3/3, was mit einer verminderten LDL-Rezeptoraktivität assoziiert wird [70], [104]. Ihr LDL-Spiegel war nicht erhöht. Wie groß die individuelle Fähigkeit ist, größere Cholesterinmengen zu metabolisieren und ggf. in Gallensäuren zu konvertieren, wurde bislang noch nicht ausreichend erforscht [116].

In unserem Kollektiv wurde kein Zusammenhang von Gallensäurenbiosynthese mit Geschlecht oder Lipoproteinen gefunden.

Bei Betrachtung des eingangs besprochenen Modells eines Cholesteringleichgewichtes stellte sich heraus, daß das Cholesteringleichgewicht trotz reduzierter Ausfuhr aufrechterhalten werden konnte, obwohl die Biosynthese von Cholesterin nicht reduziert wurde und auch die Lipoproteine weitgehend unverändert blieben. Der katabolische Stoffwechselweg bestätigte sich als ein durch eine erhöhte Gallensäurenbiosynthese vor Cholesterinüberlastung schützender Mechanismus. Aufgrund der vorliegenden Daten und der erwähnten Literatur ergab sich, daß die Einnahme von 8-14 mg/ kg Körpergewicht Ursodeoxycholsäure die Gallensäurenbiosynthese bei dreiwöchiger Einnahme erhöht und damit das Gleichgewicht von Cholesterin gewährleistet [7], [10], [84], [88], [94].

Zur Änderung der Biosynthese kam es folgendermaßen:

Die Gallensäurenbiosynthese wird über die zur Leber zurückkehrenden Gallensäuren gesteuert. Vom Gallensäureverlustsyndrom her war bekannt, daß bei mangelnder Wiederaufnahme von Gallensäuren eine erhöhte Gallensäurenbiosynthese den Verlust der Gallensäuren ausgleichen konnte. Die veränderte Absorption von Gallensäuren konnte acht Stunden nach Einnahme von 500 mg Ursodeoxycholsäure nachgewiesen werden, wodurch die Plasmaspiegel der Gallensäuren reduziert waren [110]. Nach dreiwöchiger Verabreichung von Ursodeoxycholsäure wurde eine dosisabhängige Reduktion der Reabsorption von Gallensäuren festgestellt [23]. Lew et al. wiesen 2004 an Kaninchen eine gesteigerte Gallensäurenbiosynthese bei reduzierter Gallensäurenreabsorption und gleichbleibendem Gallensäurespiegel nach [51].

In den ersten drei Tagen unserer Studie hatten drei Probanden häufigere und weiche Stühle, worauf diese Probanden die gewichtsadaptierte Dosierung des Medikamentes selbständig um eine Kapsel reduzierten (unabgesprochen, siehe Anhang). Weitere ungewünschte Wirkungen der Verabreichung von Ursodeoxycholsäure traten nicht auf. Man könnte zu der Annahme gelangen, daß diese chologen Stühle eine kompensierende Erhöhung der Gallensäurenbiosynthese ausgelöst hätten. Da die vermehrten Stuhlgänge jedoch nicht mit den interindividuellen Schwankungen der Gallensäurenbiosynthese korrelierten und zeitlich deutlich von dem verzeichneten Gallensäureanstieg entfernt lagen, ist dies nahezu auszuschließen. Die absolute Menge der Gallensäuren im Serum war am Tag 10 nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure gegenüber Tag 0 deutlich angestiegen. Am Tag 40 der Einnahme von Ursodeoxycholsäure lag der Wert höher als Tag 0, war aber gegenüber Tag 10 etwas erniedrigt. In der vorliegenden Arbeit konnte damit kein direkter Zusammenhang zwischen absoluter Menge vorhandener Gallensäuren im Serum und der Gallensäurenbiosynthese gefunden werden. Nun war es von Interesse, ob eine Veränderung des relativen Gallensäuregehaltes von Bedeutung war.

Neben den fünf hauptsächlich vorkommenden Gallensäuren lagen ihre Isoformen Isochenodeoxycholsäure, Isolithocholsäure und

Isoursodeoxycholsäure im Serum vor. Nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure erhöhte sich erwarteterweise die relative Konzentration von Ursodeoxycholsäure, während sich die zuvor vorherrschenden Gallensäuren Chenodeoxychol-, Chol- und Deoxycholsäure verringerten. Über die nativ vorliegende Ursodeoxycholsäuremenge sind unterschiedliche Daten veröffentlicht, sie variieren von 0,5 % bis 40 % (2), [36]. Die Quantifizierung der Gallensäuren unserer Probanden belegte, daß sich die hydrophile Gallensäure Ursodeoxycholsäure (von 9,5 % auf 45,5 % am 10. Tag bzw. 42,9 % am 40. Tag) in ihrem Anteil an allen Gallensäuren als auch im Verhältnis zur lipophileren Chenodeoxycholsäure (von nahezu 1:1 auf 62:13) verfünffachte. Langjährige Erfahrungen unseres Labors zeigten, daß die Umwandlung von Urso- in Isoursodeoxycholsäure individuell stark differiert. Zusammen mit ihrer Isoform nahm der Konzentrationsgehalt der Ursodeoxycholsäure im Serum von 10 % auf fast 60 % der Gallensäuren zu. Cholsäure (14,7 % vor, 5,8 % nach vierzig Tagen Einnahme) und Chenodeoxycholsäure sanken hingegen (14,3 % auf 8,7 %) um etwa die Hälfte. Die Ergebnisse entsprachen quantitativen Angaben von Hofmann et al. 1999 und von Hillebrant et al. [34], [36].

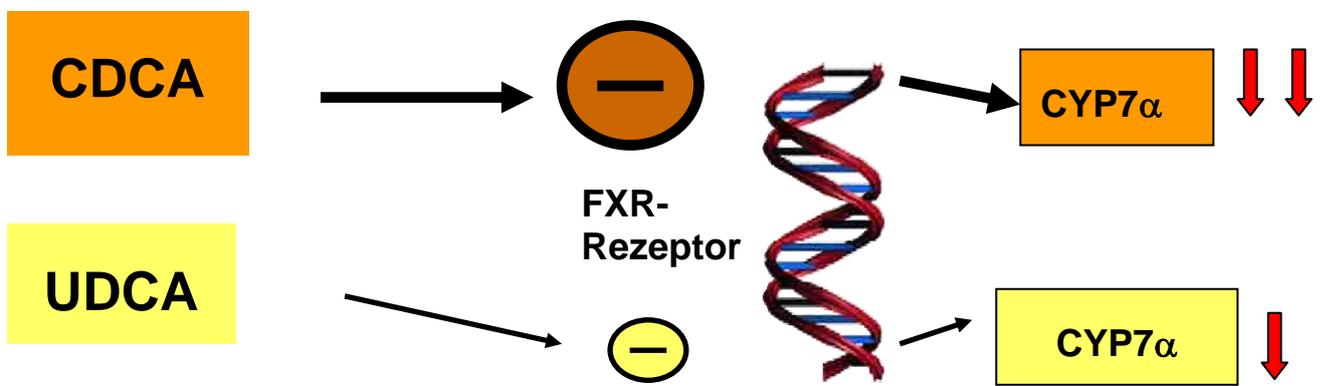
Einarsson wies nach, daß die jeweilige Zusammensetzung des Gallensäurepools für die Regulierung des Stoffwechsels bedeutungsvoll ist. Von Belang war seiner Meinung dabei, um welche Gallensäure es sich handelte und welche Polarität diese besaß [36]. Die Einnahme von Ursodeoxycholsäure veränderte das Spektrum der in der Gallenblase vorhandenen Gallensäuren grundlegend (3). Beuers et al. wiesen 1992 darauf hin, daß nicht allein die Entfernung der hydrophoben endogenen Gallensäuren der pathophysiologisch entscheidende Mechanismus ist [12], [22]. Der Farnesoid X Rezeptor (FXR) übt eine Rückkopplungshemmung auf die Gallensäurenbiosynthese aus und regelt so die Transkription des 7 $\alpha$ -Hydroxylasegens [59]. Die natürlich vorherrschenden Gallensäuren Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure unterdrückten die Gallensäurenbiosynthese um 80 % bzw. 75 % nach 21 Tagen ( $p < 0,005$ ) [89], während Ursodeoxycholsäure sie im gleichen Zeitraum steigerte [94]. Chenodeoxycholsäure besitzt eine sehr hohe Affinität zu FXR und gilt als

stärkster Inhibitor der 7-Hydroxylase, die hydrophilere Ursodeoxycholsäure hingegen nicht oder wesentlich geringer. Ursodeoxycholsäure hemmte diesen Kernrezeptor im Stoffkreislauf weniger stark als die normalerweise vorherrschende Gallensäure Chenodeoxycholsäure [51], [59], [80], [111]. Chenodeoxycholsäure war nach Lew et al. 2004 ein starker Agonist von FXR ( $EC_{50}=2-5 \mu\text{M}$ ), während die halbmaximale Aktivierung ( $EC_{50}=200 \mu\text{M}$ ) von Ursodeoxycholsäure im Verhältnis bis zu 1/100 schwächer war. Auch die Affinität von Ursodeoxycholsäure zu FXR ( $IC_{50} = 185 \mu\text{M}$ ) war um 1/11 geringer als von Chenoxycholsäure [51]. Lithocholsäure hatte die größte Affinität ( $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ ) zu FXR [51]. Cholsäure besaß bei weitem die schwächste Bindungsaffinität ( $IC_{50} = 586 \mu\text{M}$ ), dennoch konnte sie FXR aktivieren, womit sich der Hinweis ergab, daß die Aktivität unabhängig von der Bindungsstärke war [51]. Damit zeigte sich, daß die verschiedenen Gallensäuren in ihrer Bindung zu FXR charakteristische Eigenschaften besaßen, die von Antagonist bis zum partiellen Agonisten wie Ursodeoxycholsäure reichten [51]. Sämtliche Gallensäuren, auch Ursodeoxycholsäure, führten zu einer Rückkopplungshemmung der Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase, die jedoch konzentrationsabhängig war [67]. Die Gallensäurenbiosynthese und die mRNA-Level des für die Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase kodierenden Gens CYP7A1 wurden in der Reihenfolge durch Chenodeoxycholsäure > Deoxycholsäure > Cholsäure > Ursodeoxycholsäure unterdrückt [23]. Während der Einnahme von Ursodeoxycholsäure ist die Gallensäureaufnahme reduziert. Bei Hemmung der Gallensäurewiederaufnahme wurde FXR laut Li et al. 2004 bei Hasen inaktiviert und die Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase stimuliert [52]. Xu et al. beschrieben 2004, daß sich Cyp7 $\alpha$  bei Ratten steigerte, die cholesterinreich gefüttert wurden, weil der FXR-Rezeptor inaktiviert war [117].

Bei FXR<sup>(-/-)</sup> Mäusen, denen der FXR Rezeptor fehlte, waren die Cholesterinaufnahme, die Cholesterinbiosynthese, der LDL-Rezeptor und der Rezeptor Scavenger-Rezeptor B1 sowie die HMG-CoA-Reduktase analog der Ergebnisse der vorliegenden Studie unbeeinflusst [40], [67]. An FXR<sup>(-/-)</sup> Mäusen war das biliäre Lipidprofil im Ungleichgewicht, und die Galle war mit Cholesterin übersättigt. Der Hydrophobizitätsindex lag bei

diesen Tieren höher als in Wildtyp-Mäusen. Ferner konnte der synthetische FXR Agonist GW4064 die Formation von Gallensteinen verhindern, das Gallenblasenepithel war weniger beschädigt, erkennbar an reduzierter Dicke und geringeren Entzündungszeichen [52]. Mit dem steigenden Verständnis um die Regulierung der Cholesterinhomöostase rückten weitere Behandlungsoptionen des Gallensteinleidens in greifbare Nähe. Bei allen zu berücksichtigenden Speziesunterschieden ergaben sich im Tierversuch Hinweise, daß der Säugetierorganismus fähig ist, mit der stimulierten Gallensäurebiosynthese einerseits eine verringerte Gallensäureabsorption auszugleichen, andererseits mit dem gleichen Mechanismus einem Cholesterinüberangebot entgegenzuwirken [52], [117]. Die Gallensäurebiosynthese wurde durch eine Änderung der vorhandenen Gallensäuren mittels inaktivierter oder reduzierter Rückkopplungshemmung von FXR moduliert, was eine Autoregulationskaskade zur Aufrechterhaltung des hepatischen Cholesterinkatabolismus gewährleistete. Die gesteigerte Gallensäurebiosynthese erwies sich als ein biologisch sinnvoller Mechanismus als Schutz vor Cholesterinüberlastung und als ein ausgleichendes Moment für eine reduzierte Gallensäureabsorption nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure. Der Sachverhalt der vermehrten Konversion von Cholesterin in Gallensäuren durch eine Änderung des Gallensäurepools und der damit in Verbindung stehenden Änderung der Regulierung von Kernrezeptoren konnte aufgrund der in Übereinstimmung stehenden Literatur, der vorliegenden Studie und aufgrund in neuerlicher Forschung nachgewiesenem Wirkmechanismus als gesichert gelten.

**Ursodeoxycholsäure hemmt die Gallensäurebiosynthese weniger als Chenodeoxycholsäure.**



Im Vergleich zur Nativsituation ergibt sich in vivo nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure **eine Steigerung der Gallensäurebiosynthese.**

modifiziert nach:

Kubitz, Falk workshop Düsseldorf am 27.11.2004, Lew JBC 2004 [44], [51].

## **6. ZUSAMMENFASSUNG**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung von Ursodeoxycholsäure auf die menschliche Cholesterinbiosynthese und die Gallensäurebiosynthese über eine 40tägige Zeitperiode bei acht gesunden Probanden. Als Methode wurde die kombinierte Gaschromographie und Massenspektrometrie zur Messung von Zwischenprodukten der Cholesterin- und Gallensäurebiosynthese verwendet.

Diese Studie konnte ein biologisch sinnvolles Überlaufventil der Regulation von Gallensäuren nachweisen, das das Gleichgewicht des Cholesterins sicherstellt.

Die Gallensäurebiosynthese erklärte, warum das Lebercholesterin nach Verabreichung von Ursodeoxycholsäure trotz reduzierter Cholesterinsekretion in die Galle konstant bleiben konnte, während sich die Cholesterinbiosynthese sowie das Lipidprofil von LDL-Cholesterin bzw. HDL-Cholesterin nicht veränderten.

Ursodeoxycholsäure kann die Gallensäurebiosynthese erhöhen und dadurch überschüssiges Cholesterin eliminieren.

## ANHANG

### Abkürzungen:

CYP7A1	Für Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase kodierendes (menschliches) Gen
Cyp7 $\alpha$	7 $\alpha$ -Hydroxylase kodierendes (tierisches) Gen
PBC	Primär Biliäre Cirrhose
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure

### Veränderungen der Stuhlgewohnheiten

(retrospektiv soweit erinnerlich)

Proband	Zeitangabe	Beobachtete Veränderung	Dosis (mg/ kg)
1	Kaum aufgetreten	Leichte Veränderung der Stuhlkonsistenz bemerkt	9,6
2	1. und 2. Tag	nach ca. 1 Woche 2x tägl. Stuhlgang	8,8, anfangs 11,8
3	Nicht genau genannt	Über einen Tag lang Stuhldrang	9,3
4	Nach ca. 14 Tagen	Nach 2 Wochen Durchfall	7,9, anfangs 10,5
5	Nicht aufgetreten	Keine	10,1
6	Erste/ zweite Woche	Subj. Stuhldrang verspürt	9,9
7	1. Woche	Subj. „sehr gelitten“ an Stuhldrang	11,7, später 7,8
8	Anfangs nicht. Nach 10 Tagen/ 2. Woche	Subj. „gelitten“ an Stuhldrang	13,9

Aufgrund der oben genannten Nebenwirkungen reduzierten die Probanden unabgesprochen deren Medikation bei Auftreten der Symptomatik zu o.g. Zeitpunkten. Von einer Compliance von drei Kapseln/ Tag wurde ausgegangen. Der Gehalt an Gallensäuren/ Serum wurde an den Tagen 0, 10, 40 (ein Patient Tag 30) verifiziert.

## **Aufklärungsbogen der Studie**

**Ludwig-Maximilians-Universität München – Klinikum Großhadern**

**Medizinische Klinik II**

### **Akuter, subakuter und chronischer Effekt von Ursodeoxycholsäure auf die Cholesterin-Homöostase der Leber**

Sehr geehrte Teilnehmerin, sehr geehrter Teilnehmer,

das Medikament Ursodeoxycholsäure wird seit vielen Jahren bereits erfolgreich zur Auflösung kleiner cholesterinhaltiger Gallensteine eingesetzt. Ferner hat es sich zur Behandlung cholestastischer Erkrankungen bewährt. Der Wirkmechanismus von Ursodeoxycholsäure auf das Gleichgewicht von Cholesterin in der Leber und den Gallenfluß ist nur unzureichend bekannt. Bisherige Untersuchungen lassen auf eine verminderte Cholesterinausscheidung und eine verstärkte Gallebildung schließen, die sich beim Patienten vereinzelt durch Vermehrung der Stuhlfrequenz äußern kann. Spezielle Nebenwirkungen von Ursodeoxycholsäure, die darüberhinaus gehen, sind nicht bekannt.

Vor Einschluß in die Studie werden Sie zu durchgemachten oder eventuell bestehenden Krankheiten befragt. Sicherheitshalber muß eine bestehende Schwangerschaft vor Beginn der Studie und während der Studie ausgeschlossen werden. Im Rahmen der oben genannten Studie möchten wir Sie bitten, Ursodeoxycholsäure in der sonst üblichen Dosierung von 3 x 250 mg (3 Kapseln) jeden Abend nach dem Essen über 40 Tage hinweg einzunehmen. An insgesamt 12 Terminen vor und nach der Einnahme von Ursodeoxycholsäure sollen morgens nüchtern jeweils 50 ml Blut abgenommen werden. An diesen zwölf Terminen soll in der vorhergehenden Nacht ein Zwölfstundenurin in der Sammelperiode von 19 Uhr abends bis 7 Uhr morgens gesammelt werden.

Ein erkennbarer Nachteil ist für Sie aus der Einnahme von Ursodeoxycholsäure nicht zu erwarten. Die erhobenen Daten unterliegen dem gesetzlich vorgeschriebenen Schutz. Durch ihre Teilnahme an der Studie ermöglichen Sie uns, unseren Kenntnisstand über die Wirkung von Ursodeoxycholsäure zu erweitern und dieses Medikament in Zukunft vermutlich noch breiter einzusetzen.

Für Ihre Mitarbeit bedanken wir uns herzlich.

Prof. Dr. D. Jüngst    PD Dr. S. Fischer    Kai Thiessen

Tel. 7095-3130

Parameter	Proband	T-1	T0	T1	T3	T5	T10	T20	T30	T40	T42	T47	T52
GesCho	1	165	172	185	179	176	177	170	179	143	153	165	.
GesCho	2	192	183	186	175	170	174	210	193	180	174	184	.
GesCho	3	157	150	153	155	163	147	156	145	145	154	155	.
GesCho	4	181	187	173	195	188	173	185	197	197	191	187	164
GesCho	5	151	164	157	157	172	179	193	174	180	182	183	176
GesCho	6	129	127	147	139	120	128	149	138	133	137	140	138
GesCho	7	176	162	162	143	139	152	173	181	177	172	157	163
GesCho	8	251	219	231	218	210	206	196	204	185	203	217	236
GesTri	1	77	.	86	40	65	70	62	68	84	86	79	.
GesTri	2	71	.	87	73	55	52	127	110	74	85	59	.
GesTri	3	57	.	49	68	73	46	54	84	84	59	53	.
GesTri	4	209	.	142	103	127	162	103	117	110	177	194	159
GesTri	5	74	.	56	64	70	74	81	57	72	85	84	92
GesTri	6	114	.	104	100	132	114	130	160	91	107	73	108
GesTri	7	57	.	65	42	48	94	73	146	78	54	79	100
GesTri	8	83	.	211	122	88	126	102	106	129	129	127	92
HDL-Ch	1	60	62	61	68	67	70	67	74	54	59	54	.
HDL-Ch	2	51	45	45	45	44	46	51	48	45	43	50	.
HDL-Ch	3	49	49	49	49	51	49	52	47	47	48	51	.
HDL-Ch	4	41	44	37	39	38	39	50	41	46	44	35	38
HDL-Ch	5	59	60	62	60	68	72	78	72	76	77	77	75
HDL-Ch	6	30	35	35	38	34	41	44	40	46	42	54	40
HDL-Ch	7	81	69	73	66	68	74	78	62	70	71	74	73
HDL-Ch	8	70	61	61	60	62	62	61	65	52	66	61	56
LDL-Ch	1	89	99	113	105	98	95	92	92	78	79	97	.
LDL-Ch	2	135	119	123	114	121	124	145	128	122	122	125	.
LDL-Ch	3	99	93	93	95	99	87	96	83	83	96	95	.
LDL-Ch	4	119	118	116	138	131	106	120	135	132	113	116	105
LDL-Ch	5	79	95	80	82	92	94	98	95	97	91	93	92
LDL-Ch	6	79	74	92	86	64	66	78	77	71	78	75	78
LDL-Ch	7	86	81	78	72	47	63	84	88	92	94	68	65
LDL-Ch	8	172	139	134	134	130	119	118	120	108	116	131	163
VLDL-T	1	54	81	59	25	44	50	47	43	77	78	68	.
VLDL-T	2	54	91	49	43	31	22	61	78	58	57	27	.
VLDL-T	3	45	65	35	51	62	28	43	78	78	40	30	.
VLDL-T	4	205	168	127	76	110	146	81	87	84	164	189	157
VLDL-T	5	57	86	27	46	47	48	58	37	56	60	74	65
VLDL-T	6	106	102	93	88	125	112	90	139	86	91	50	92
VLDL-T	7	36	83	48	23	39	81	34	98	55	29	49	80
VLDL-T	8	34	106	207	89	54	86	47	56	95	90	75	41
VLDL-C	1	14	14	12	4	10	11	12	13	14	17	14	.
VLDL-C	2	9	9	17	16	6	7	16	17	13	9	9	.
VLDL-C	3	9	9	10	12	13	8	9	17	17	9	9	.
VLDL-C	4	24	24	20	17	19	30	16	22	20	34	36	20
VLDL-C	5	12	12	12	15	12	11	15	7	7	14	13	9
VLDL-C	6	19	19	19	17	23	21	27	21	13	17	9	20
VLDL-C	7	10	10	10	5	23	13	11	32	15	4	15	24
VLDL-C	8	10	10	37	22	18	23	17	19	25	20	25	16

Parameter	Proband	T-1	T0	T1	T3	T5	T10	T20	T30	T40	T42	T47	T52
APOA1	2	155	155	148	145	140	140	140	143	133	137	144	.
APOA1	3	147	147	145	147	153	144	147	141	141	149	142	.
APOA1	4	154	154	127	142	153	162	186	137	168	167	150	164
APOA1	5	177	177	166	184	192	212	221	205	223	225	218	213
APOA1	6	104	104	118	115	110	123	119	125	132	126	141	118
APOA1	7	181	181	171	159	161	175	190	176	173	171	165	187
APOA1	8	170	170	170	165	159	167	120	174	150	166	162	155
APOB	1	93	93	101	100	93	90	88	90	70	78	90	.
APOB	2	112	112	105	99	96	98	115	112	101	103	107	.
APOB	3	88	88	85	83	91	82	87	80	80	89	85	.
APOB	4	109	109	96	114	120	112	121	106	128	122	122	109
APOB	5	82	82	76	79	84	88	94	92	90	85	95	82
APOB	6	63	63	68	69	51	59	69	62	61	60	64	63
APOB	7	74	74	61	51	47	52	62	80	74	74	52	74
APOB	8	113	113	99	98	94	84	86	85	86	93	97	113

Parameter	Proband	T-1	T0	T1	T3	T5	T10	T20	T30	T40	T42	T47	T52
MEVAL	1	147	199	194	104	105	151	125	143	176	191	174	.
MEVAL	2	229	240	131	234	178	162	216	153	197	294	213	.
MEVAL	3	130	149	177	210	161	159	157	171	171	134	106	.
MEVAL	4	408	412	373	295	261	339	386	410	247	241	348	329
MEVAL	5	269	239	285	100	242	349	161	145	189	299	140	234
MEVAL	6	195	178	181	118	151	184	332	142	189	183	204	128
MEVAL	7	66	114	104	185	109	271	235	286	160	84	160	175
7aOH	1	15	31	47	8	7	19	6	23	23	34	34	.
7aOH	2	65,5	44	23,3	13,7	3,4	4,7	25,1	12	87,7	15,9	7,6	.
7aOH	3	31,5	29,2	25,2	22,5	38,1	20,7	61,4	61,1	75,6	57,1	31,7	.
7aOH	4	32,5	38	26,4	66,2	55,2	60	117,3	79	80	153,3	76,5	.
7aOH	5	44,8	80,3	106,7	29,8	13,1	41,7	72,5	44,2	128,8	129,9	54,2	.
7aOH	6	105,5	14,1	50,5	75,3	80,2	40,5	54,5	85,9	78,8	21,3	55,5	.
7aOH	7	35,9	12,2	60,1	104,5	11,7	58,1	75,4	75,4	12,9	53	75	.
7aOH	8	40,7	15,3	6,4	12,3	24,9	13,5	13,5	6,2	12,7	77,4	15,9	.

Parameter	Patient	mwnach	Tag42	Tag47	Tag52	Tag160	Tag 161	Tag 167	Tag 168	Tag 169	Kontrolle (Tg 0,-1, Tg 160-169)
LDL-Ch	1	88	79	97	.	99	105	107			100
LDL-Ch	2	123,5	122	125	.	104	110	125			119
LDL-Ch	3	95,5	96	95	.	88	90	91			92
LDL-Ch	4	111,33	113	116	105	129	130	95	124	127	120
LDL-Ch	5	92	91	93	92	104	111	106			99
LDL-Ch	6	77	78	75	78	68	76				74
LDL-Ch	7	75,67	94	68	65	83	70	80			80
LDL-Ch	8	136,67	116	131	163	108	115				134
VLDL-T	1	73	78	68	.	82	85	88			78
VLDL-T	2	42	57	27	.	197	75	66			97
VLDL-T	3	35	40	30	.	85	52	74			64
VLDL-T	4	170	164	189	157	148	160	185	151	180	171
VLDL-T	5	66,33	60	74	65	71	95				77
VLDL-T	6	77,67	91	50	92	102	91				100
VLDL-T	7	52,67	29	49	80	78	59	76			66
VLDL-T	8	68,67	90	75	41	145	94				95
MEVALONAT	1	182,5	191	174	.	238	145	244			195
MEVALONAT	2	253,5	294	213	.	219	256	257			240
MEVALONAT	3	120	134	106	.	221	139	142			156
MEVALONAT	4	306	241	348	329	389	481	295			397
MEVALONAT	5	224,33	299	140	234	187	291	202			238
MEVALONAT	6	171,67	183	204	128	179	192	179			185
MEVALONAT	7	139,67	84	160	175	114	171	106			114
MEVALONAT	8	202,67	232	201	175	49	153	140			123
7aOH	1	34	34	34	.	49	45				35
7aOH	2	11,75	15,9	7,6	.	98	9	15			46
7aOH	3	44,4	57,1	31,7	.	86	91	48			57
7aOH	4	114,93	153,3	76,5	.	76	40	114			60
7aOH	5	92,09	129,9	54,2	.	34	69	62			58
7aOH	6	38,39	21,3	55,5	.	63	63	22			54
7aOH	7	63,99	53	75	.	9	58	104			44
7aOH	8	46,65	77,4	15,9	.	102	64	31			51

Parameter	Patient	Vorwerte	Tag-1	Tag0	mw3-5	mw10-20	mw30-40
LDL-Ch	1	94	89	99	105,33	93,5	85
LDL-Ch	2	127	135	119	119,33	134,5	125
LDL-Ch	3	96	99	93	95,67	91,5	83
LDL-Ch	4	118,5	119	118	128,33	113	133,5
LDL-Ch	5	87	79	95	84,67	96	96
LDL-Ch	6	76,5	79	74	80,67	72	74
LDL-Ch	7	83,5	86	81	65,67	73,5	90
LDL-Ch	8	155,5	172	139	132,67	118,5	114
VLDL-T	1	67,5	54	81	42,67	48,5	60
VLDL-T	2	72,5	54	91	41	41,5	68
VLDL-T	3	55	45	65	49,33	35,5	78
VLDL-T	4	186,5	205	168	104,33	113,5	85,5
VLDL-T	5	71,5	57	86	40	53	46,5
VLDL-T	6	104	106	102	102	101	112,5
VLDL-T	7	59,5	36	83	36,67	57,5	76,5
VLDL-T	8	70	34	106	116,67	66,5	75,5
MEVALONAT	1	173	147	199	134,33	138	159,5
MEVALONAT	2	234,5	229	240	181	189	175
MEVALONAT	3	139,5	130	149	182,67	158	171
MEVALONAT	4	410	408	412	309,67	362,5	328,5
MEVALONAT	5	254	269	239	209	255	167
MEVALONAT	6	186,5	195	178	150	258	165,5
MEVALONAT	7	90	66	114	132,67	253	223
MEVALONAT	8	135,5	137	134	100	133	113,5
7aOH	1	23	15	31	20,67	12,5	23
7aOH	2	54,75	65,5	44	13,47	14,92	49,85
7aOH	3	30,35	31,5	29,2	28,6	41,05	68,37
7aOH	4	35,25	32,5	38	49,28	88,64	79,5
7aOH	5	62,55	44,8	80,3	49,86	57,08	86,5
7aOH	6	59,8	105,5	14,1	68,66	47,49	82,36
7aOH	7	24,05	35,9	12,2	58,77	66,77	44,17
7aOH	8	28	40,7	15,3	14,5	13,5	9,45

## Literaturverzeichnis

- [1] Abate N, Carubbi F, Bozzoli M, Bertolotti M, Farah I, Rosi A, Carulli N. Effect of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid administration on acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in human liver. *Ital J Gastroenterol.* 1994; 26 (6): 287-93.
- [2] Abrahamson A, Krapivner S, Gustafsson U, Muhrbeck O, Eggertsen G, Johansson I, Persson I, Angelin B, Ingelman-Sundberg M, Bjorkhem I, Einarsson C, van't Hooft FM. *Atherosclerosis* 2005; 182 (1): 37-45.
- [3] Alvisi V, Gasparetto A, Dentale A, Heras H, Feletti-Spadazzi A, D'Ambrosi A. Bioavailability of a controlled release formulation of UDCA in man. *Drugs Exp Clin Res* 1996; 22 (1): 29-33.
- [4] Angelin B, Einarsson K, Hellström K, Leijd B. Bile acid kinetics in relation to endogenous triglyceride metabolism in various types of hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 1978; 19: 1004-16.
- [5] Angelin B, Eusufzai S. Effects of ursodeoxycholic acid on plasma lipids. *Scand J Gastroenterolog* 1994; 29 Suppl 204: 2.
- [6] Angelin B, Ewerth S, Einarsson K. Ursodeoxycholic acid treatment in cholesterol gallstone disease: effects on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity, biliary lipid composition, and plasma lipid levels. *J Lipid Res* 1983; 24: 461-8.
- [7] Angelin B, Nilsell K, Einarsson K. Ursodeoxycholic treatment in humans: effect on plasma and biliary lipid metabolism with special reference to very low density lipoprotein triglyceride and bile acid kinetics. *Eur J Clin Invest* 1986; 16 (2): 171-174.
- [8] Angelin B. 1994 Mack-Forster Award Lecture. Review. Studies on the regulation of hepatic cholesterol metabolism in humans. *EJCI* 1995; 25 (4): 215-224.

- [9] Angelin B. Bile acid metabolism in heterozygous familial hypercholesterolaemia: a study comparing affected and unaffected siblings of four kindreds. *Eur J Clin Invest* 1988; 18: 153-61.
- [10] Axelson M, Bjorkhem I, Reihner E, Einarsson K. The plasma level of 7 alpha-hydroxy-4-cholestenone reflects the activity of hepatic cholesterol 7- alpha-hydroxylase in man. *FEBS Letters* 1991; 284 (2): 216-218.
- [11] Berglund L, Bjorkhem I, Angelin B, Einarsson K. Evidence against in vitro modulation of rat liver cholesterol 7alpha-hydroxylase activity by phosphorylation-dephosphorylation: comparison with hydroxymethylglutaryl CoA reductase. *Acta Chem Scand B* 1986; 40 (6): 457-61.
- [12] Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Pauletzki J, Fischer S, Paumgartner G. Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of the major hydrophobic bile acids in health and in chronic cholestatic liver disease. *Hepatology* 1992; 15 (4): 603-8.
- [13] Björkhem I, Eggertsen G. Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Curr Op Lipid* 2001; 12: 97-103.
- [14] Carulli N, Loria P, Bertolotti M, Ponz de Leon M, Menozzi D, Medici G, Piccagali I. Effects of acute changes of bile acid pool composition on biliary lipid secretion. *J Clinical Investigation* 1984; 74 (2): 614-624.
- [15] Carulli N, Ponz de Leon M, Zironi F, Pinetti A, Smerieri A, Iori R, Loria P. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism in subjects with gallstones: comparative effects of short term feeding of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 1980; 21 (1): 35-32.
- [16] Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptor and ligand physiology. *Opening the x-files. Science* 2001; 294: 1866-70.

- [17] Chen W, Suruga K, Nishimura N, Gouda T, Lam VN, Yokogoshi H. Comparative regulation of major enzymes in the bile acid biosynthesis pathway by cholesterol, cholate and taurine in mice and rats. *Life Sci* 2005 1; 77 ( 7): 746-56.
- [18] De La Clera- Moya M, Cnnelly MA, Drazul D, Klein SM, Favari E, Yancey PG, Williams DL, Rothblat GH. Scavenger receptor B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res* 2001; 42 (12): 1969-78.
- [19] Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, nctp. *Gastroenterology* 2001; 121 (1): 140-147.
- [20] Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 1993; 34: 1637-59.
- [21] Einarsson C, Hillebrant C.-G, Axelson M. Effects of treatment with deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on the hepatic synthesis of cholesterol and bile acids in healthy subjects. *Hepatology* 2001; 33 (5): 1189-1193.
- [22] Einarsson K. Effect of ursodeoxycholic acid on hepatic cholesterol metabolism. *Scand J Gastroenterolog Suppl* 1994; 204: 19-23. Review.
- [23] Ellis E, Axelson M, Abrahamsson A, Eggertsen G, Thorne A, Nowak G, Ericzon BG, Bjorkhem I, Einarsson C. Feedback regulation of bile acid synthesis in primary human hepatocytes: evidence that CDCA is the strongest inhibitor. *Hepatology*. 2003; 38 (4): 930-8.

- [24] Eusufzai S, Ericsson S, Cederlund T, Einarsson K, Angelin B. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on ileal absorption of bile acids in man as determined by SeHCAT test. *Gut* 1991; 32 (9): 1044-8.
- [25] Frenkiel PG, Lee DW, Cohen H, Gilmore CJ, Resser K, Bonorris GG, Marks JW, Schoenfield LJ. The effect of diet on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in gallstone patients treated with ursodeoxycholic acid. *Am. J Clin Nutr* 1986; 43 (2): 239-50.
- [26] Goldstein J, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-30.
- [27] Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MG, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000; 6: 517-526.
- [28] Güldütuna S, Zimmer G, Imhof M, Bhatti S, You T, Leuschner U. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 1993; 104 (6): 1736-1744.
- [29] Hammarsten O. Untersuchungen über die Gallen einiger Polarthiere. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1901; 32: 435-66.
- [30] Hammarsten O. Untersuchungen über die Gallen einiger Polarthiere. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1902; 36: 525-55.
- [31] Handschin C, Gnerre C, Fraser DJ, Martinez-Jimenez C, Jover R, Meyer UA. Species-specific mechanisms for cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) regulation by drugs and bile acids. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 434(1): 75ff.
- [32] Handschin C, Meyer UA. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 433 (2): 387-96.
- [33] Hardison W. G. M., and Grundy S. M.. 1984. Effect of ursodeoxycholate and its taurine conjugate on bile acid synthesis and cholesterol absorption. *Gastroenterology.* 87: 130–135.

- [34] Hillebrant CG, Nyberg B, Gustafsson U, Sahlin S, Bjorkhem I, Rudling M, Einarsson C. Effects of combined treatment with pravastatin and ursodeoxycholic acid on hepatic cholesterol metabolism. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32 (7): 528-34.
- [35] Heuman DM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Regulation of bile acid synthesis. III. Correlation between biliary bile salt hydrophobicity index and the activities of enzymes regulating cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *J Lipid Res.* 1989; 30 (8): 1161-71.
- [36] Hofmann AF, Schteingart CD, Sjövall J, Carey MC. Poster A12 4-01/ 99/ 3.000 K für Dr. FALK Pharma GmbH.
- [37] Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid an enterohepatic drug. *Scand J Gastroent* 1994; 29 Suppl 204:1-15.
- [38] Hofmann AF. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2004; 36 (3-4): 703-22.
- [39] Jaeschke H, Mullen K, Moradpour D. Nuclear xeno sensors as receptors for cholestatic bile acids: the second line of defense. *Hepatology* 2002; 35: 252-253.
- [40] Juengst D, Hinz V. Alerskrankheit Cholezystolithiasis. *Der Bay. Int.* 2005; 25 (1): 18-22.
- [41] Juran BD, Lazaridis KN. Is the FXR the fix for cholesterol gallstone disease? *Hepatology* 2005; 42 (1): 218-21.
- [42] Kelley RI, Herman GE. Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annual Review of Genomics & Human Genetics* 2001; 2: 299-341.
- [43] Kern F. Effects of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid homeostasis in patients with cholesterol gallstones. *J Clin Invest* 1994; 93: 1186-1194.
- [44] Kubitz R. Wirkweise von Ursodeoxycholsäure.  
11.Düsseldorfer Lebertag „Standards und Perspektiven in der Hepatologie – Stand 2004“, Düsseldorf, 27 November 2004.

- [45] Kurtz W, Güldütuna S, Leuschner U. Differing effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on bile acids in rat colonic wall and contents. *Tokai J Exp Clin Med* 1988; 13 (2): 91-7.
- [46] Lanzini, A., and T. C. Northfield. 1988. Effect of ursodeoxycholic acid on biliary lipid coupling and on cholesterol absorption during fasting and eating in subjects with cholesterol gallstones. *Gastroenterology*. 95: 408–416.
- [47] LaRusso S., Thistle N. F, Thistle J. L.. 1983. Effect of litholytic bile acids on cholesterol absorption in gallstone patients. *Gastroenterology*. 84: 265–271.
- [48] Leiss, O., K. von Bergmann, U. Streicher, and H. Strotkoetter. 1984. Effect of three different dihydroxy bile acids on intestinal cholesterol absorption in normal volunteers. *Gastroenterology*. 87: 144–149.
- [49] Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Güldütuna S, Huber K, Hellstern A, Gatzel M, Leuschner M. Ursodeoxycholic acid in primary biliary chrrhosis:results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989; 97 (5): 1268-74.
- [50] Leuschner U, Güldütuna S, Imhof M, Huber K, Benjaminov A, Leuschner M. Effects of ursodeoxycholic acid after 4 to 12 years of therapy in early and late stages of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 21 (4): 624-33.
- [51] Lew JL, Zhao A, Yu J, Huang L, De Pedro N, Pelaez F, Wright SD, Cui J. The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem*. 2004; 279 (10): 8856-61.
- [52] Li H, Xu G, Shang Q, Pan L, Shefer S, Batta AK, Bollineni J, Tint GS, Keller BT, Salen G. Inhibition of ileal bile acid transport lowers plasma cholesterol levels by inactivating hepatic farnesoid X receptor and stimulating cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Metabolism*. 2004; 53 (7): 927-32.

- [53] Lin Y, Havinga R, Verkade HJ, Moshage H, Slooff MJ, Vonk RJ, Kuipers F. Bile acids suppress the secretion of very-low-density lipoprotein by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 1996; 23 (2): 218-28.
- [54] Lindenthal B, Siamtupang A, Dotti MT, Federico A, Lütjohann D, v. Bergmann K. Urinary excretion of mevalonic acid as an indicator of cholesterol synthesis. *J Lipid Res* 1996; 37: 2193-2201.
- [55] Lindenthal B, von Bergmann K. Determination of urinary mevalonic acid using isotope dilution technique. *Biological Mass Spectrometry*, 1994; 23 (7): 445-450.
- [56] Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000; 6: 507-515.
- [57] Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *JBC* 2001; 276 (41): 37735-37738.
- [58] Makino I, Shinozaki K, Yoshino K, Nakagawa S. Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Jap J Gastroenterol* 1975; 72: 690-702.
- [59] Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 177-183.
- [60] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284 (5418): 1362-5.
- [61] Malerod L, Sporstol M, Juvet LK, Mousavi SA, Gjoen T, Berg T, Roos N, Eskild W. Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/ RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336 (4):1096-105.

- [62] Maton PN, Ellis HJ, Higgins MJ, Dowling RH. Hepatic HMGCoA reductase in human cholelithiasis: effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. *Eur J Clin Invest* 1980; 10 (4): 325-32.
- [63] Maton PN, Murphy GM, Dowling RH. Lack of response to chenodeoxycholic acid in obese and non--obese patients. Role of cholesterol synthesis and possible response to ursodeoxycholic acid. *Eur J Clin Invest*. 1980, 21 (12): 1082-6.
- [64] Mazzella G, Cipolla A, Villanova N, Polimeni C, Sipahi A, Parinini P, Fusaroli P, Festi D, Roda E. Changes in biliary lipid secretion and cholic acid kinetics induced by diet, diet plus simvastatin and diet plus ursodeoxycholic acid in obese subjects. *Ital J Gastroenterol*. 1995, 27 (8): 441-5.
- [65] Mazzella G, Parini P, Festi D, Bazzoli F, Aldini R, Roda A, Tonelli D, Cipolla A, Salzetta A, Roda E. Effect of simvastatin, ursodeoxycholic acid and simvastatin plus ursodeoxycholic acid on biliary lipid secretion and cholic acid kinetics in nonfamilial hypercholesterolemia. *Hepatology* 1992; 15: 1072-8.
- [66] Miettinen Tatu E, Kiviluoto T, Taavitsainen M, Vuoristo M, Miettinen Tatu A Cholesterol metabolism and serum and biliary noncholesterol sterols in gallstone patients during simvastatin and ursodeoxycholic acid treatments. *Hepatology* 1998; 27: 649-655.
- [67] Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonist in a mouse model. *Nature Med* 2004; 10 (12): 1301-2.
- [68] Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, Shimizu M, Sato R. Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via MAP kinase cascade mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem* 2002; 277 (40): 37339-34.

- [69] Naoumova RP, O'Neill FH, Dunn S, Neuwirth CKY, Taylor GW, Axelson M, Thompson GR. Effect of inhibiting HMG-CoA reductase on 7- $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one, a marker of bile acid synthesis: contrasting findings in patients with and without prior up-regulation of the latter pathway. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 404-412.
- [70] Nghiem NT, Ta TT, Ohmori R, Kuroki M, Nguyen VC, Nguyen TK, Kawakami M, Kondo K. Apolipoprotein E polymorphism in Vietnamese children and its relationship to plasma lipid and lipoprotein levels. *Metabolism*. 2004; 53 (12): 1517-21
- [71] Nilsell K., Angelin B., Leijd B, Einarsson K. Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in humans. Evidence for different modes of action on bile acid synthesis. *Gastroenterology* 1983; 85 (6): 1248-1256.
- [72] Okamoto S, Nakano K, Kosahara K, Kishinaka M, Oda H, Ichimiya H, Chijiwa K, Kuroki S. Effects of pravastatin and ursodeoxycholic acid on cholesterol and bile acid metabolism in patients with cholesterol gallstones. *J Gastroenterol*. 1994; 29 (1): 47-55.
- [73] Ory DS. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ Res* 2004 1; 95 (7): 660-70.
- [74] Parquet M, Metman EH, Raizman A, Rambaud JC, Berthaux N, Infante R. Bioavailability, gastrointestinal transit, solubilization and fecal excretion of ursodeoxycholic acid in man. *Eur J Clin Invest* 1985; 15 (4): 171-8.
- [75] Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *J Hepatology* 2002; 36: 525-531.

- [76] Podda M, Zuin M, Battezzati M, Ghezzi C, de Fazio C, Dioguardi. Efficacy and safety of a combination of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic for gallstone dissolution: A comparison with ursodeoxycholic acid alone. *Gastroenterology* 1989; 96 (1): 222-229.
- [77] Popjak G, Boehm G, Parker TS, Edmond J, Edwards PA, Fogelman AM. Determination of mevalonate in blood plasma in man and rat. Mevalonate „tolerance“ tests in man. *J Lipid Res* 1979; 20 (6): 716-728.
- [78] Poupon RE, Chrétien Y, Poupon R, Paumgartner G. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology* 1993; 17 (4): 599-604
- [79] Reihner E, Angelin B, Rudling M, Ewerth S, Björkhem I, Einarsson K. Regulation of hepatic cholesterol metabolism in man: stimulatory effects of colestyramin on HMGCoA reductase activity and low density lipoprotein receptor expression in gallstone patients. *J Lipid Res* 1990; 31: 2219-22.
- [80] Reihner E, Björkhem I, Angelin B, Ewerth S, Einarsson K. Bile acid synthesis in humans: regulation of hepatic microsomal cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity. *Gastroenterology* 1989; 97: 1498-505.
- [81] Roda E, Cipolla A, Salzetta A, Marchetto S, Pezzoli A, Accogli E, Novelli V, Polimeni C, Cerre C, Mazella G. Influence of ursodeoxycholic acid on biliary lipids. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29 Suppl 204: 16-8.
- [82] Roda E, Roda A, Sama C, Festi D, Mazzella G, Aldini R, Barbara L. Effect of ursodeoxycholic acid administration on biliary lipid composition and bile acid kinetics in cholesterol gallstone patients. *Dig Dis Sci.* 1979; 24 (2): 123-8.

- [83] Rudling M, Angelin B, Stahle L, Reihner E, Sahlin S, Olivecrona H, Bjorkhem I, Einarsson C. Regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNAs in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (9): 4307-13.
- [84] Rudolph G, Endele R, Senn M, Stiehl A. Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of cholic acid and chenodeoxycholic acid in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 1993; 17 (6):1028-32.
- [85] Russel D.W. Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell* 1999; 97: 539-42.
- [86] Russel DW, Setchell KDR. Bile acid synthesis. *Biochemistry* 1992; 31: 4737-49.
- [87] Rust C, Sauter GH, Oswald M, Büttner J, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Beuers U. Effect of colestyramine on bile acid pattern and synthesis during administration of ursodeoxycholic acid in man. *Eur J Clin Invest* 2000; 30 (2): 135-9.
- [88] Rust C. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 1998, 36, A 180.
- [89] Sahlin S, Granstrom L, Gustafsson U, Stahlberg D, Backman L, Einarsson K. Hepatic esterification rate of cholesterol and biliary lipids in human obesity. *J Lipid Res*. 1994; 35 (3): 484-90.
- [90] Salen G, Colalillo A, Verga D, Bagan E, Tint GS, Shefer S. Effect of high and low doses of ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution in humans. *Gastroenterology* 1980; 78: 1412-18.
- [91] Salvioli, G., R. Lugli, and J. M. Pradelli. 1985. Cholesterol absorption and sterol balance in normal subjects receiving dietary fiber or ursodeoxycholic acid. *Dig. Dis. Sci.* 30: 301–307.
- [92] Sauter G, Berr F, Beuers U, Fischer S, Paumgartner G. Serum concentrations of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one reflect bile acid synthesis in humans. *Hepatology* 1996; 26: 1160–65.

- [93] Sauter GH, Moussavian AC, Meyer G, Steitz HO, Parhofer KG, Jungst D. Bowel habits and bile acid malabsorption in the months after cholecystectomy. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97 (7):1732-5.
- [94] Sauter GH, Thiessen K, Parhofer KG, Jungst C, Fischer S, Jungst D. Effect of ursodeoxycholic acid on synthesis of cholesterol and bile acids in healthy subjects. *Digestion.* 2004; 70 (2):79-83. Epub 2004 Sep 16.
- [95] Scalia S, Scagliarini R, Pazzi P. Evaluation of ursodeoxycholic acid bioavailability from immediate- and sustained-release preparations using gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. *Arzneimittelforschung* 2000; 50 (2): 129-34.
- [96] Scallen TJ, Sanghvi A. 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2477-80. Regulation of three key enzymes in cholesterol metabolism by phosphorylation/ dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80 (9):2477-80.
- [97] Schwarz M, Lund EG, Russell DW. Two 7 alpha-hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9 (2):113-8.
- [98] Schwarz M, Lund EG, Setchell KD, Kayden HJ, Zerwekh JE, Bjorkhem I, Herz J, Russel DW. Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7alpha-hydroxylase. *J Biol Chem* 1996; 271 (30): 18024-31.
- [99] Schwarz M, Russel DW, Dietschy, JM, Turley SD. Alternative pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or colestyramine feeding. *J Lipid Res.* 2001; 42 (10): 1594-603.

- [100] Schwarz M, Russel DW, Ditschy JM, Turley SD. Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterinemia. *J Lipid Res* 1998; 39 (9): 1833-43.
- [101] Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie Tyson R, Sokol RJ, Russel DW. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin. Invest.* 1998; 102 (9): 1690-703.
- [102] Shepherd J, Packard CJ, Bicker S, Lawrie TDV, Morgan HG. Cholestyramin promotes receptor-mediated low-density lipoprotein catabolism. *N Engl J Med* 1988; 319:24-33.
- [103] Shoda J, He B, Tanaka N, Matzuzaki Y, Osuga T. Plasma levels of mevalonate and 7- $\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-4-one, in cholesterol gallstone disease and their etiological significance. *J Gastroenterology* 1994; 29: 94.
- [104] Shin MH, Kim HN, Cui LH, Kweon SS, Park KS, Heo H, Nam HS, Jeong SK, Chung EK, Choi JS. The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults. *Korean Med Sci.* 2005; 20 (3): 361-6.
- [105] Shoda M. Über die Ursodeoxycholsäure aus Bärengallen und ihre physiologische Wirkung. *J Biochem* 1927; 7:505-17.
- [106] Sinal CJ, Miyata M, Tohkin M, Nagata K, Bend JR, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/ BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000; 102 (6), 731-744.
- [107] Sinal CJ, Tohkin M, Miyata m, Ward JM, Lmbert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor fxr/ bar impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000; 102: 731-744.
- [108] Sjovall J. Fifty years with bile acids and steroids in health and disease. *Lipids.* 2004; 39 (8):703-22.

- [109] Spady DK, Cuthbert JA, Willard MN, Meidell RS. Feedback regulation of hepatic 7 $\alpha$ -hydroxylase expression by bile salts in the hamster. *J Biol. Chem* 1996; 271 (31): 18623-18631.
- [110] Stiehl A, Raedsch R, Rudolph G. Acute effects of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acid on the small intestinal absorption of bile acids. *Gastroenterology*. 1990; 98 (2): 424-8.).
- [111] Stroup D. Kinase/ phosphatase regulation of CYP 7A1. *Front Biosci*. 2005; 10:1678-92.
- [112] Tint GS, Salen G, Shefer S. Effect of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol and bile acid metabolism. *Gastroenterology* 1986; 91 (4): 1007-18. Review.
- [113] Turley SD, Schwarz, Spady DK, Dietschy JM, Turley SD. Gender-related differences in bile acid and sterol metabolism in outbred CD-1 mice fed low- and high-cholesterol diets. *Hepatology* 1998; 28 (4): 1088-94.
- [114] v. Bergmann K., Epple-Gutsfeld M., Leiss O. Differences in the effects of chenodeoxycholic acid on biliary lipid secretion and bile acid synthesis in patients with gallstones. *Gastroenterology* 1984; 87 (1): 136-143.
- [115] Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest*. 2004; 113 (10):1408-18.
- [116] Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Jones PJ, Granholm NA, Tolley EA, Tso P, Heubi JE. Cholic acid supplementation enhances cholesterol absorption in humans. *Gastroenterology* 2004; 126 (3):724-31.

- [117] Xu G, Pan LX, Li H, Shang Q, Honda A, Shefer S, Bollineni J, Matsuzaki Y, Tint GS, Salen G. Dietary cholesterol stimulates CYP7A1 in rats because farnesoid X receptor is not activated. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286 (5):G730-5.
- [118] Xu G, Pan LX, Erickson SK, Forman BM, Shneider BL, Ananthanarayanan M, Li X, Shefer S, Balasubramanian N, Ma L, Asaoka H, Lear SR, Nguyen LB, Dussault I, Suchy FJ, Tint GS, Salen G. Removal of the bile acid pool upregulates cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase by deactivating FXR in rabbits. *J Lipid Res.* 2002; 43 (1): 45-50.
- [119] Yoshida T, Honda A, Tanaka N, Matsuzaki Y, Shoda J, He B, Osuga T, Miyazaki H. Determination of 7 $\alpha$ -hydroxy-4-choleste-3-one level in plasma using isotope-dilution mass spectrometry and monitoring its circadian rhythm in human as an index of bile acid biosynthesis. *J Chrom B* 1994; 655: 179-87.

#### Buchangaben:

- (1) Bielsalski K, Grimm P. Taschenatlas der Ernährung. 2. aktualisierte Auflage, Stuttgart, Thieme 2002, S.98.
- (2) Dr Falk Pharma, Ursofalk. Chenofalk. Aktualisierte Auflage 2005 mit Fachinformationen, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, Postfach 1255, 88322 Aulendorf
- (3) Flörkemeier V. Medididac für Dr. Falk Pharma GmbH, Praxismanual 6. Auflage 2004.
- (4) Li Shizhen. Bencao Gangmu. 1. Auflage 1596.
- (5) Müller I, Diss. 2001, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- (6) Unschuld Paul U, *Medicine in China- A History of Pharmacocetics*, London 1986. Dt. Fassung: Pen-Tsào – 2000 Jahre traditionelle pharmazeutische Literatur Chinas, München 1973.

## Danksagung

An allererster Stelle danke ich Gott.

*„... er gibt den Weisen ihre Weisheit und den Verständigen ihren Verstand,  
...ich danke Dir und lobe Dich,..., daß Du mir Weisheit und Stärke verliehen hast,  
was wir von Dir erbeten haben.“* aus dem Alten Testament, Daniel 2,23, ca. 600-530 v. Chr.

Ihnen, Herr Professor Dr. Jüngst, gilt mein herzlichster Dank.

Sie haben mich über mehrere Jahre in größter Geduld geführt und gefördert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in gemeinsamen Diskussionen gereift.

Sie haben einen Blick für das Wesentliche. Ihre Ermutigungen fußen auf tiefer Menschenkenntnis und sind humorvoller Art. Sie sind stets eine feste Säule in unsicheren Zeiten. Danke für die gemeinsam verbrachten freudigen Zeiten zusammen, die Einladungen zu Fortbildungen und Feierlichkeiten. Danke, daß Sie mich zu internationalen Bile meetings in Amsterdam und Atlanta mitnahmen. Die Gespräche mit den Forschungsgruppen waren bereichernd.

Herrn Professor Dr. Paumgartner, Professor Dr. Göke, Professor Dr. Beuers, Professor Dr. Jakob, Professor Dr. Parhofer und Professor Dr. Sauter gilt mein Dank, die Einrichtungen, Gerätschaften und Mittel der Universität und des Labors nutzen zu können.

Herr PD Dr. Fischer, Sie sind mir in Ihrer Geduld und Sorgfalt ein Vorbild, herzlichen Dank auch für Ihre Unterstützung durch Ihre Literatur und fachlichen Diskussionen.

Herrn PD Dr. Kubitz, Ihnen danke ich für das Überlassen Ihrer Habilitationsschrift, Ihres Vortrages vom 27. Nov. 2004 in Düsseldorf und der freundlichen sowie unterstützenden Genehmigung deren Nutzung.

Herzlichen Dank Herrn Dr. Tessenow, Institut für Medizingeschichte der LMU München, für Ihre Hilfe bei der chinesischen Literatur. Herrn PD Dr. Ostmann, Saarbrücken, Dr. Crispin, Klinikum Großhadern, Herrn Dr. Wiseman, Lrz-Rechenzentrum München, herzlichen Dank für das Widmen Ihrer Zeit für gemeinsame Statistikdiskussionen. Herrn Dr. Moussavian danke für die Geduld beim Anlernen der Labormethoden sowie gemeinsamer Fehlersuche. Frau Dr. Jana Thoenissen und Dr. Martin Thalmaier Danke für die konstruktive Kritik, Herrn Martin Gerhold und Carsten Oberwittler herzlichen Dank für die Hilfe bei der Formatierung. Dank den Probanden für zuverlässiges Erscheinen.

Insbesondere bei Ihnen, Frau Schwertfeger, möchte ich mich für Ihre menschliche und am Gegenüber interessierte Art, Ihren Rat sowie Ihre große technische Hilfe bedanken. An entscheidender Stelle möchte ich mich bei allen Freunden für die herzliche Unterstützung und bei meinen Eltern für deren finanzielle Großzügigkeit bedanken, ohne die diese Arbeit schwerlich möglich gewesen wäre.

## Lebenslauf

Kai Thiessen, geb. 1972 in München, ledig

Schule: Dom-Gymnasium, Freising  
Sprachausbildung: Ferien-Sprachkurse bzw. Schulaustausch in England, Frankreich, Kanada (April-Sept. 1989), USA

Wehrdienst: Okt. 1992 - Sept. 1993 Akademie des Sanitätswesens  
Lehrgang Sanitäter I+II, BW-KrkhS Amberg

Studium: WS 1993 Romanistik/ Statistik, LMU München  
SS 1994-Ws 2001 Humanmedizin, LMU München

Praktische Erfahrungen: Famulaturen:  
Gastroenterologie, Radiologie, Sportmedizin, Anästhesie, Notfallmedizin, Pädiatrie, Neurologie  
Praktisches Jahr:  
Neurologie im Klinikum Großhadern, Abdominal- und Handchirurgie sowie Innere Medizin im Klinikum Innenstadt der LMU

Klinische berufliche Tätigkeit: Arzt im Praktikum (aufgeteilt)/ Assistenzarzt:  
AiP am Zentrum für Allgemeine Innere Medizin und Nephrologie im Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart, AiP der Neurologie im Christophsbad, Göppingen;  
AiP, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Uni, Assistenzarzt im Asthmazentrum Berchtesgaden.

Forschung: 1991-1992 Verhaltensforschung zum „Kindchenschema“  
1993 Forschungslabor Toxikologisches Institut der Bundeswehr: Bestrahlungsversuche von HL60 Zellen.  
1999 Aufarbeitung der Laborproben dieser Dissertation  
Aug.2003-März 2004: Wiss. Mitarbeiter der Klinik Dermatologie und Allergologie TU München und  
Jan 2005-Dez 2005 Wiss. Mitarbeiter der Uni Ulm, Abt. Kinder- und Jugendpsychiatrie, in Zusammenarbeit mit dem CJD Asthmazentrum Berchtesgaden in den Forschungsprojekten „Allergien und Umwelterkrankungen in der Rehabilitation“, „Psychosoziale Komorbidität bei Asthma bronchiale“, „Asthma bronchiale, psychische Belastung und Lebensqualität“ sowie  
Forschung an Entzündungswerten (FeNO)

Fortbildungen: Kurse zur Erlangung der Fachkunde Rettungsdienst und der Zusatzbezeichnung Sportmedizin, Allergie- und Pollenlehrgang, Asthmatrainer

Publikation Digestion 2004; 70: 79-83

Berchtesgaden, 16.12.2005