

Aus der Medizinischen Klinik II Großhadern
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

Die Bedeutung von Muzin-Glykoprotein in der Pathogenese der Cholezystolithiasis

Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Wilhelmi

aus Neunkirchen/Saar

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Jüngst

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Lohse
Prof. Dr. M. Siebeck

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2006

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung

Allgemeiner Teil

1. Die Cholezystolithiasis

1.1. Anatomie des biliären Systems

1.2. Histologie der Gallenblase und Gallengänge

1.3. Epidemiologie

1.4. Risikofaktoren

1.4.1. Alter

1.4.2. Geschlecht

1.4.3. Fruchtbarkeit

1.4.4. Genetik

1.4.5. Ernährung

1.4.6. Vorerkrankungen

1.4.7. Andere Risikofaktoren

1.5. Gallensteintypen

1.6. Diagnostik

1.6.1 Klinik/Laborchemie

1.6.2 Sonographie

1.6.3 ERCP

1.6.4 PTC

1.6.5 MRC

1.7. Komplikationen

1.8. Therapie

1.8.1. Chirurgie

1.8.2. Konservative Therapieformen

2. Physiologie der Gallenflüssigkeit

2.1 Produktion der Gallenflüssigkeit

2.1.1 Lebergalle

2.1.2 Blasengalle

2.2 Zusammensetzung und Aufgaben der Gallenflüssigkeit

- 2.2.1 Lipide**
 - 2.2.1.1 Cholesterin**
 - 2.2.1.2 Phospholipide**
 - 2.2.1.3 Gallensäuren**
- 2.2.2 Transportformen von Lipiden in der Galle**
- 2.2.3 CSI**
- 2.2.4 Proteine**
- 3. Pathogenese der Cholezystolithiasis**
 - 3.1 Cholesterinübersättigung der Galle**
 - 3.2 Nukleation von Cholesterin**
 - 3.1.1 Pro- und Antinukleatoren**
 - 3.3 Hypomotilität und Stase**
 - 3.3.1 Viskosität**
 - 3.3.2 Biliärer Sludge**
 - 3.4 Steinwachstum**

Spezieller Teil

- 4 Pro- und Antinukleatoren**
 - 4.1 Antinukleatoren**
 - 4.2 Pronukleatoren**
 - 4.2.1 Lipidkomposition**
 - 4.2.2 Kalziumsalze, Mikrobakterien und biliärer Sludge**
 - 4.2.3 Non-Muzin-biliäre Proteine**
- 5 Muzin-Glykoprotein**
 - 5.1 Muzine allgemein**
 - 5.2 Gastrointestinale Muzine/Genetik**
 - 5.3 Struktur**
 - 5.4 Muzine als Pronukleatoren**
 - 5.5 Muzine und Cholezystolithiasis**
- 6 Fragestellung der Arbeit**
- 7 Patientenkollektiv**
 - 7.1 Einteilung der Patienten**
 - 7.2 Ausschlusskriterien**

B Material und Methoden

8 Gewinnung der Proben

9 Aufbereitung der Proben

9.1 Ultrazentrifugation

9.2 Nukleationszeit

9.3 Anzahl der Kristalle

10 Isolierung von humanem Muzin-Glykoprotein

11 Chemische Analysen

11.1 Cholesterinbestimmung

11.2 Cholesterinbestimmung in Gallensteinen

11.3 Phospholipidbestimmung

11.4 Gallensäurebestimmung

11.5 Berechnung der Gesamtlipidkonzentration

11.6 Berechnung des Cholesterinsättigungsindex (CSI)

11.7 Gesamtproteinbestimmung

11.8 Muzin-Glykoproteinbestimmung

11.8.1 Vorbereitung der Blasengallen

11.8.2 Präparation der Gelchromatographie

11.8.3 Durchführung der Säulenchromatographie

11.8.4 PAS-Assay

11.9 Bestimmung der Viskosität

12 Additionsexperimente

13 Reagenzien und Gefäße/Geräte

14 Statistik

C Ergebnisse

15 Patientenkollektiv

15.1 Gruppeneinteilung, Zusammensetzung der Steine, COT

16 Zusammensetzung der biliären Lipide

17 Muzin-Glykoproteine

17.1 Muzin-Glykoproteine in den verschiedenen Gruppen

17.2 Muzin-Glykoprotein und COT

17.3 Muzin-Glykoproteine und Geschlechtsverteilung

18 Aufteilung des Kollektivs in kurz und lang nukleierende Blasengallen

18.1 Muzin-Glykoprotein in lang und kurz nukleierenden Blasengallen

19 Korrelationen von Muzin-Glykoprotein zu anderen Gallenbestandteilen

20 Additionsversuche

20.1 Addition von bovinem Muzin

20.2 Addition von humanem Muzin

20.3 Veränderung der verschiedenen Galle-Parameter nach Muzinzusatz

D Diskussion

21.1 Patientenkollektiv/Proben

21.2 Zusammensetzung der Blasengallen

21.2.1 Lipide

21.2.2 Proteine

21.2.3 CSI

21.2.4 Viskosität

21.3 Muzin-Glykoproteine

21.3.1 Muzinkonzentration in den verschiedenen Gruppen

21.3.2 Muzine und Geschlecht

21.3.3 Muzine und COT

21.3.4 Korrelation der Muzin-Glykoproteine zu anderen Gallebestandteilen

21.3.5 Additionsexperimente

E Zusammenfassung und Interpretation

F Abkürzungsverzeichnis

G Literaturverzeichnis

H Anhang/Danksagung

I Lebenslauf und Publikationen

A Einleitung

1 Die Cholezystolithiasis

Das Gallensteinleiden ist ein seit langer Zeit bekanntes Krankheitsbild. Frühe Erwähnungen gehen zurück bis in das 16. Jahrhundert. Theophrast von Hohenheim alias Paracelsus (1493 – 1541 n. Chr.) beschreibt in seinem Buch über die „Tartarischen Kranckheiten“ (Paracelsus, 1589) die Entstehung von Steinen im menschlichen Körper analog zur Entstehung von Steinen im Wein als einen Prozess der Sedimentation. Das klinische Erscheinungsbild dürfte sich seit dieser Zeit kaum geändert haben. Patienten klagen meist über heftige, kolikartige Beschwerden im rechten Oberbauch. Oft kommen starke Übelkeit, Erbrechen und bei Stauung der Galle auch ein Ikterus hinzu. Je nach Lokalisation der Steine treten verschiedene Symptomaten auf. Diese reichen von Beschwerdefreiheit bei Steinen in der Gallenblase über kolikartige rezidivierende Schmerzen im rechten Oberbauch bei Einklemmung von Steinen im Gallengangsystem und Dauerschmerzen und akutem Abdomen bei Cholezystitis bis hin zur Schocksymptomatik mit erhöhter Letalität bei Perforation der Gallenblase.

Die Voraussetzung für das Verständnis der Pathophysiologie der Cholezystolithiasis ist die Kenntnis der anatomischen, histologischen und physiologischen Grundlagen.

1.1 Anatomie

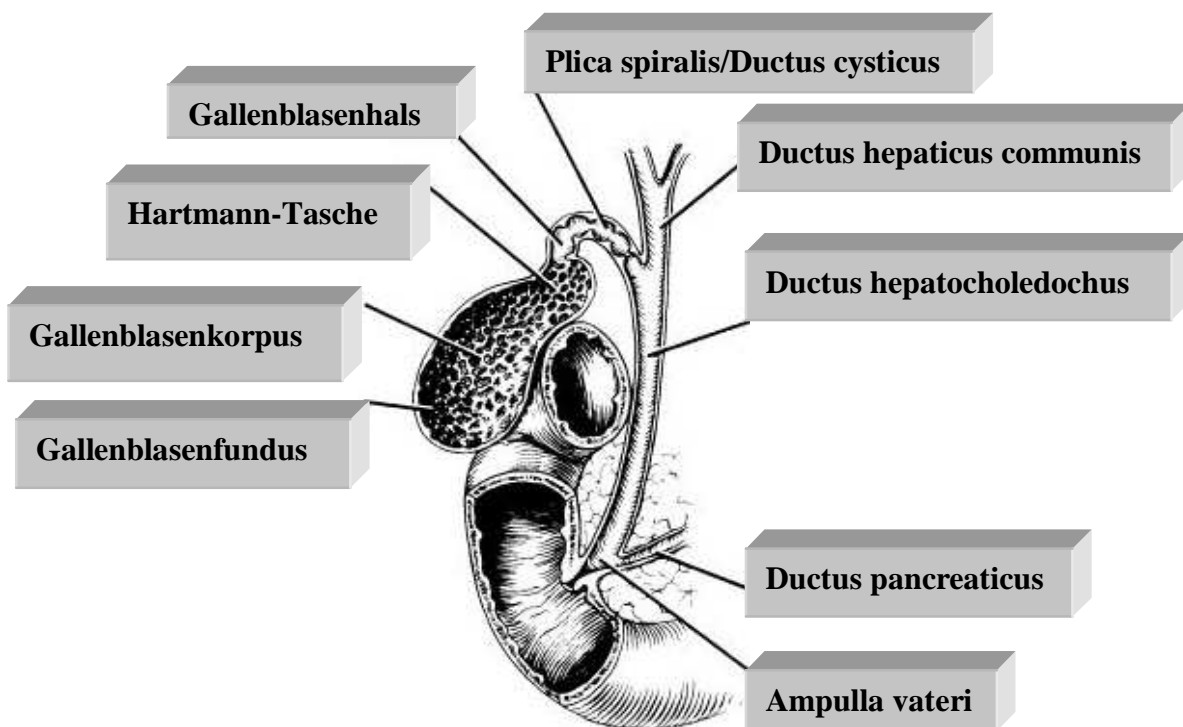
Die Gallenblase (Vesica fellea) ist etwa 8 – 12 cm lang, 3 – 4 cm breit und liegt der Leber zwischen Lobus quadratus und Lobus dexter an. Sie stellt ein sackförmiges Hohlorgan dar und wird ohne scharfe Grenzen unterteilt in Fundus, Korpus und Kollum. Gallenblasenfundus und Gallenblasenkorpus sind an ihrer Unterseite zu zwei Dritteln vom Peritoneum viscerale überzogen. Das restliche Drittel liegt in der Verwachsungsfläche der Gallenblase mit der Leber. Die Gallenblasenwand besteht aus dem Bauchfellüberzug (Tunica serosa), einer zweischichtigen Muskellage (Tunica muscularis) und der Schleimhaut (Tunica mucosa) mit einem einschichtigen Zylinderepithel. Die Muskelschicht ist scheringitterartig durch spiralig verlaufende, einander überkreuzende Züge von Muskelfasern aufgebaut und kann sich somit gut den unterschiedlichen Füllungszuständen des Organs anpassen. Im Kollum mündet der Ductus cysticus (Länge ca. 3 – 5 cm), der die Gallenflüssigkeit aufnimmt und in die Gallenblase leitet. Hier findet sich eine spiralige Schleimhautfalte (Plica spiralis), welche den Rückfluss der Galle aus der Gallenblase verhindert. Aus der Leber entspringen Ductus hepaticus dexter und Ductus hepaticus sinister,

welche sich vereinen zum Ductus hepaticus communis, der nach Einmündung des Ductus cysticus in den Ductus choledochus übergeht. Dieser ist ca. 8 mm dick und hat eine Länge von ca. 6,5 cm. Alle Gallengänge bestehen aus einer Tunica adventitia, einer Tunica fibromuscularis und einer Tunica mucosa aus Zylinderepithelen und vereinzelt Becherzellen.

Über den Ductus choledochus wird die Galle aus der Gallenblase über die Papilla Vateri in das Duodenum geleitet. Der Gallefluss in das Duodenum wird durch ein Zusammenspiel von Sphinkter Oddi und Gallenblasenmuskulatur reguliert. Ist der Sphinkter Oddi geschlossen, fließt die Gallenflüssigkeit über den Ductus cysticus in die Gallenblase. Nach dem Erschlaffen des Sphinkters wird sie durch Kontraktion der Muskulatur entleert. Das durchschnittliche Fassungsvermögen der menschlichen Gallenblase liegt bei 40 – 80 ml. Die arterielle Gefäßversorgung der Gallenblase erfolgt über die Arteria cystica, die aus dem Ramus dexter der Arteria hepatica propria entspringt. Die extrahepatischen Gallengänge werden aus Ästen der A. cystica und der A. hepatica propria versorgt. Der venöse Abfluss der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge erfolgt in der Mehrzahl der Fälle in den rechten Hauptast der Vena portae (Abb. 1).

Abb. 1

Anatomie des biliären Systems



1.2 Histologie

Die Gallenblasenwand ist von einem hochprismatischen, einschichtigen Epithel überzogen. Die Epithelzellen sitzen dabei in einer dünnen Schicht dem subepithelialen Bindegewebe auf. Das Epithel besteht aus hohen Säulenzellen, welche Schleim sezernieren. Es existiert keine Muscularis mucosae. Darunter befindet sich eine gitternetzartig angelegte, glatte Muskulatur (Tunica muscularis), welche in faserreiches, dichtes Stroma (Lamina serosa) eingebettet ist. Schleimdrüsen (Glandulae mucosae) finden sich nur im Gallenblasenhals.

1.3 Epidemiologie

Die Cholezystolithiasis stellt heute die häufigste Oberbaucherkrankung in Europa und Nordamerika dar (Barbara L, 1987). Die Gesamtmorbidität beträgt 15 – 20 %. In Europa nimmt man eine Prävalenz von Gallensteinen bei Patienten über 40 Jahre von 20 – 30 % bei Frauen und 8 % bei Männern an (Barbara L, 1987).

1.4 Risikofaktoren

Die Risikofaktoren der Cholezystolithiasis können mittels der „6 F“ aufgezählt werden: Fourty (Alter), Female (Geschlecht), Fecoundity (Fruchtbarkeit), Family (Genetik), Fair (Hellhäutigkeit), Fat (Adipositas und Ernährung). Zusätzlich müssen Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und andere Gründe genannt werden.

1.4.1 Alter

Mit höherem Alter besteht eine höhere Morbidität. So ist das Auftreten von Gallensteinen im Kindesalter sehr selten. Bei 20 – 25-Jährigen tritt die Erkrankung bei 2,3 %, bei 40 – 49-Jährigen mit 6,7 % und bei 60 – 69-Jährigen mit 14,4 % auf (GREPCO, 1988).

1.4.2 Geschlecht

Zu 70 % sind Frauen vom Gallensteinleiden betroffen. Frauen haben gegenüber Männern ein 2,2fach erhöhtes Risiko, an Gallensteinen zu erkranken (Barbara L, 1987). Verantwortlich hierfür könnten Östrogene sein, welche hepatische Lipoprotein-Rezeptoren stimulieren und die Aufnahme von Nahrungscholesterin und die Sekretion von Cholesterin in die Gallenflüssigkeit erhöhen.

1.4.3 Fruchtbarkeit

Einige epidemiologische Studien haben gezeigt, dass mit der Anzahl der Geburten einer Frau das Risiko der Gallensteinentstehung steigt (GREPCO, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass

schwängere Frauen ein vergrößertes Gallenblasenvolumen und eine reduzierte Entleerung nach Testmahlzeiten aufweisen (Braveman DZ, 1980). Auch die Tendenz zur Bildung von Sludge, Ablagerungen im Gallenblasenfundus, die zum Großteil aus Muzinen und Cholesterinkristallen bestehen (siehe auch Kap. 3.3.2), ist während der Schwangerschaft erhöht (Maringhini A, 1987). Aber auch die Einnahme oraler Kontrazeptiva kann zu einer Erhöhung des Krankheitsrisikos führen (Petitti DB, 1988; Del Pozo R, 1983).

1.4.4 Genetik

Die Vermutung, dass eine genetische Komponente bei der Entstehung der Cholezystolithiasis eine Rolle spielt, ergab sich aus epidemiologischen und Familienstudien. So treten Gallensteine in bestimmten Volksgruppen wie z. B. bei den Pima-Indianern in Arizona mit einer Prävalenz von 48,6 % (Sampliner RE, 1970) gehäuft auf. Umgekehrt finden sich Volksgruppen wie z. B. die Massai in Afrika, bei denen Gallensteine fast nie auftreten. Verwandte ersten Grades von Gallensteinträgern haben damit ein wahrscheinlich um das Zweifache erhöhtes Risiko, ebenfalls zu erkranken (Gilat T, 1983).

Kürzlich wurden die ersten Genloci, welche mit Cholesterinsteinen assoziiert sind („Lithgenes“) in Zuchtmäusen identifiziert. Lammert und Mitarbeiter präsentierten einen Überblick über die chromosomale Organisation von Kandidatengenen, die an der Entstehung von Gallensteinen in Mäusen beteiligt sind (Lammert F, 2001).

1.4.5 Ernährung

Eine cholesterinreiche und hochkalorische Ernährung prädisponiert zur Gallensteinentstehung. Deutlich wurde dies in einer Studie, in welcher Patienten und Kontrollpersonen bzgl. Geschlecht und Body-mass-Index übereinstimmten (Sarles H, 1970). Die Aufnahme cholesterinreicher Nahrung führt hierbei zu erhöhter Cholesterinaufnahme in den Blutkreislauf und einer Übersättigung der Galle mit Cholesterin. Eine gesteigerte Umwandlung in Gallensäuren, die der Steinentstehung entgegenwirken, findet jedoch nicht statt (Quintao E, 1971). Auch Adipositas wird als Risikofaktor der Cholezystolithiasis angesehen (Liddle RA, 1989), wobei übergewichtige Menschen sekundär eine größere Synthese von Cholesterin und eine erhöhte Ausscheidung von Cholesterin in die Galle haben (Reuben A, 1985).

1.4.6 Vorerkrankungen

Resektionen oder Erkrankungen des Ileums, die zu einer Malabsorption von Gallensäuren führen, aber auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie der Morbus Crohn (Whorwell PJ, 1984)

erhöhen die Inzidenz der Cholezystolithiasis. Eine verminderte Sekretion von Gallensäuren bei chronisch cholestatischen Erkrankungen wie z. B. der primär biliären Zirrhose hat einen ähnlichen Effekt. Bei chronischer Hämolyse, chronischer Infektion der Gallenwege, aber auch alkoholischer Leberzirrhose ist das Auftreten von v. a. Pigmentsteinen erhöht.

Ob ein Diabetes mellitus die Inzidenz der Cholezystolithiasis, z. B. durch eine Hypomotilität der Gallenblase bedingt durch die allgemeine viszerale Polyneuropathie (Stone BG, 1988), erhöht, ist umstritten.

1.4.7 Andere Risikofaktoren

Rückenmarksverletzungen, länger dauernde parenterale Ernährung (Roslyn JJ, 1983), schneller Gewichtsverlust und eine Therapie mit Clofibraten, Cholestyramin oder Nikotinsäure können weiterhin das Auftreten von Gallensteinen begünstigen.

1.5 Gallensteintypen

Entsprechend ihrer Zusammensetzung können drei verschiedene Arten von Gallensteinen unterschieden werden:

1. Cholesterinsteine mit einem Cholesterinanteil von 80 – 90 %,
2. Gemischte Steine mit mindestens 50 % Cholesterinanteil,
3. Pigmentsteine mit weniger als 50 % Cholesterin (braune/schwarze Pigmentsteine).

Cholesterin und gemischte Gallensteine ergeben zusammen eine Häufigkeit von 75 % aller Gallensteine in den Industrienationen. Schwarze Pigmentsteine (20 %) und braune Pigmentsteine (5 %) ergeben die restlichen 25 % (Apstein MD, 1993). Neben Cholesterin sind die weiteren Bestandteile aller Gallensteintypen Kalziumbilirubin, Gallensäuren, verschiedene Proteine, Muzine und verschiedene Spurenelemente (Malet PF, 1989).

Cholesterin- und gemischte Gallensteine können als solitäre oder multiple Gallensteine vorkommen. In Patienten mit multiplen Gallensteinen konnte eine kürzere Nukleationszeit von Cholesterin, verglichen mit Patienten mit solitären Gallensteinen, nachgewiesen werden (Jüngst D, 1992).

Pigmentsteine enthalten vor allem Kalziumbilirubin und treten erst in höherem Lebensalter oder im Rahmen einer Hyperbilirubinämie auf. Braune Pigmentsteine sind die Folge einer Cholestase und chronischer bakterieller Infektionen mit Anaerobiern und treten häufig in den extrahepatischen Gallengängen auf (Cetta F, 1991). Konjugiertes Bilirubin wird hierbei durch die

Betaglukuronidase-Aktivität einiger anaerober Bakterien in unkonjugiertes Bilirubin überführt, welches dann mit Kalziumionen zu unlöslichem Kalziumbilirubin ausfällt (Tabata M, 1981; Nakayama F, 1971). Sie enthalten zusätzlich durch bakterielle Hydrolyse entstandene Lecithinabbauprodukte (Wasiewitz U, 1983).

Schwarze Pigmentsteine findet man in Gallenblasen; sie enthalten oxidiertes unlösliches Bilirubin (Cahalane MJ, 1988). Sie entstehen häufig im Rahmen einer Hyperbilirubinämie. Bei einer Hämolyse z. B. steigt der Anteil des unkonjugierten Bilirubins bis auf das Zehnfache des Normalwertes an (Trotman BW, 1980) und in Verbindung mit Kalziumionen bildet sich Kalzium-Hydrogen-Bilirubin, welches innerhalb von Mizellen und Vesikeln transportiert werden muss. Der relative Mangel dieser Transporteinheiten kann dann die Lösungsfähigkeit der Galle für diese Stoffe überschreiten (Cahalane MJ, 1988). Zusammen mit einer Muzin-Hypersekretion bilden sich dann schwarze Pigmentsteine in der Gallenblase.

1.6 Diagnostik

1.6.1 Klinik/Laborchemie

Bei Steineinklemmung im Ductus cysticus kann es zu einer Überdehnung der Gallenblase mit Schleimhautschädigung und konsekutiver und zunächst abakterieller Cholezystitis mit eventueller bakterieller Besiedelung kommen. Die Symptomatik reicht von dumpfen, unspezifischen Druckgefühlen im Abdomen bis zu kolikartigen Schmerzen im rechten Oberbauch mit Ausstrahlung in die rechte Schulter und Flankenregion. Die Dauer der Kolikschmerzen kann 15 min bis 5 Stunden betragen. Die typische Gallenkolik kommt hierbei durch eine schnelle Drucksteigerung in der Gallenblase (z. B. durch einen Steinverschluss im Ductus cysticus) zustande. Meist kommt es zusätzlich zu Nausea und Erbrechen, evtl. auch zu Fieber und Schüttelfrost. In der klinischen Untersuchung kann sich eine umschriebene Druckschmerzhaftigkeit im rechten Oberbauch mit Zeichen der lokalen Peritonitis im weiteren Verlauf finden. Eventuell kann auch das Murphyzeichen positiv sein, bei welchem sich ein plötzlicher Stopp der Inspiration zeigt, nachdem die palpierende Hand des Untersuchers in Expiration in die Gallenblasenregion drückt. Laborchemisch können sich eine Erhöhung der Entzündungsparameter (BSG, CRP, Leukozyten) und eventuell mäßige Elevation der Cholestaseparameter (AP, GGT) und/oder Transaminasen (GOT, GPT) zeigen. Differentialdiagnostisch zur biliären Kolik müssen Ulcus ventriculi et duodeni, Pankreatitis, Nephrolithiasis, Appendizitis, primär sklerosierende Cholangitis, inferiorer Myokardinfarkt und eine rechtsbasale Pleuritis in Erwägung gezogen werden.

1.6.2 Sonographie

Die Sonographie ist die wichtigste Bildgebung in der Diagnostik des Gallensteinleidens. Gallenblasensteine ab 3 mm Größe können hiermit nachgewiesen werden. Die Treffsicherheit liegt hierbei für Konkremente in der Gallenblase bei ca. 95 %. In 60 – 90 % kann die Ursache eines mechanischen Ikterus sonographisch geklärt werden. Durch Palpation der Gallenblase unter sonographischer Sicht können zudem die Imprimierbarkeit und die lokale Dolenz der Gallenblase geprüft werden. Eine Erweiterung der Gallengänge kann ein indirektes Zeichen für eine Choledocholithiasis sein und ebenfalls sonographisch dargestellt werden. Eine Cholezystitis kann zusammen mit Klinik und Laborchemie zusätzlich sonographisch durch die Darstellung einer Gallenblasenwandverdickung mit einem echoarmen, perivesikalen Flüssigkeitssaum diagnostiziert werden.

1.6.3 ERCP

Bei der endoskopisch retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) wird nach Einführung eines Endoskops in das Duodenum ein Katheter in die Papilla duodeni major eingeführt. Hierüber wird Kontrastmittel appliziert. Kontrastmittelaussparungen in den Gallengängen deuten hierbei auf das Vorliegen von Konkrementen hin. Nach endoskopischer Papillotomie können bei Choledocholithiasis Konkremente aus dem Ductus hepatocholedochus mittels eines oberhalb aufgeblasenen Ballonkatheters oder eines Fangkorbes (Dormia-Korb) entfernt werden. Bei zu großen Konkrementen kann vor der Entfernung eine mechanische Lithotripsie durch das liegende Endoskop bzw. eine Steinfragmentierung mittels Laser oder Elektrohydraulik versucht werden. Die ERCP mit Papillotomie und Steinextraktion stellt eine risikoarme Diagnostik- und Therapiemethode mit Letalitätsraten zwischen 0,2 und 2 % dar (Bilbao MK, 1976).

1.6.4 PTC

Die perkutane transhepatische Cholangiographie ist eine Alternative der Darstellung der Gallengänge mit Kontrastmittel, wenn eine ERCP aus anatomischen Gründen (z. B. bei Billroth-II-Gastrojejunostomie) nicht möglich ist. Hierbei wird eine dünne Nadel perkutan bis in die Leber vorgeschoben und ein intrahepatischer Gallengang punktiert. Im Folgenden kann dann das Gallengangssystem mit Kontrastmittel dargestellt werden und es können über ein eingeführtes Cholangioskop Biopsien entnommen oder kleinere Konkremente entfernt werden.

1.6.5 MRC

Die Magnetresonananzcholangiographie (MRC) ist ein nicht-invasives Verfahren zur Darstellung der Gallenwege. Die diagnostische Treffsicherheit liegt im Bereich der ERCP. Es bestehen bei dieser Methode jedoch keine Interventionsmöglichkeiten.

1.7 Komplikationen

Komplikationen der Cholezystolithiasis scheinen bei Patienten mit multiplen Konkrementen durch Steinwanderung häufiger aufzutreten als bei Patienten mit solitären Konkrementen (Juvonen T, 1994). Neben der akuten oder chronischen Cholezystitis und der Choledocholithiasis kann es zu einem Gallenblasenhydrops kommen, welcher durch eine vollständige Obstruktion des Ductus cysticus durch ein eingeklemmtes Konkrement entsteht. Durch Rückresorption von Gallensäuren und Gallepigment einerseits und Sekretion von Schleim in das Gallenblasenlumen andererseits entsteht in der funktionslosen Gallenblase eine entfärbte, weißliche Galle. Diese Form der Galle ist reich an Muzinen (Bouchier IA, 1965). Das Mirizzi-Syndrom ist gekennzeichnet durch Konkreme im Ductus cysticus, die zu einer entzündlich narbigen Einbeziehung der Umgebung mit Kompression und Stenosierung des Ductus hepatocholedochus führt, wodurch ein schmerzloser Ikterus hervorgerufen wird. Weitere Komplikationen der Cholezystolithiasis sind Gallenblasenperforationen, cholezysto-enterale Fistelbildung mit eventuell konsekutiver Ausbildung eines Gallensteinileus, Entzündung von Nachbarorganen wie Pankreatitis, Cholangitiden bis zu malignen Erkrankungen wie dem Gallenblasenkarzinom. Cholelithiasis und chronische Cholezystitiden mit einer Ausbildung von Schrumpfgallenblase oder „Porzellangallenblase“ sind Risikofaktoren für die Entstehung des Gallenblasenkarzinoms. Die Inzidenz liegt bei 3/100.000/Jahr. In 80 % der Fälle finden sich bei Vorliegen eines Gallenblasenkarzinoms Gallensteine. Die Prognose ist ungünstig.

1.8 Therapie

1.8.1 Chirurgie

Die asymptomatische Cholezystolithiasis bedarf keiner Therapie. Jedoch sollten Patienten mit Gallenblasenpolypen von einer Größe über 1 cm oder Patienten mit einer Porzellangallenblase chirurgisch therapiert werden. Diese Indikationen und die symptomatische Cholezystolithiasis werden heute meist durch die Entfernung der Gallenblase, die Cholezystektomie behandelt. Die symptomatische Cholezystolithiasis ist hierbei definiert durch einmalige, wiederholte oder anhaltende Beschwerden unterschiedlicher Stärke, meist im Sinne von krampfartigen rechtsseitigen Oberbauchschmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken und zur rechten Schulter. Absolute

Indikationen für die Cholezystektomie sind eine freie Gallenblasenperforation sowie eine progrediente akute Cholezystitis. Die laparoskopische Cholezystektomie ist heute die Standardtherapie und scheint der offenen Cholezystektomie mit niedrigerer postoperativer Komplikationsrate und niedriger Letalität überlegen (Strasberg SM, 1994). Bei 10 – 15 % der operierten Patienten kann es jedoch zum Auftreten eines Postcholezystektomie-Syndroms kommen. In seltenen Fällen ist eine organische Ursache wie Choledochussteine, Strikturen im Gallengangsystem, ein zu langer Zystikusstumpf oder Erkrankungen der benachbarten Organe wie z. B. Pankreatitiden auszumachen und erfordert dann eine Re-Laparotomie. In einem Teil der Fälle fehlt jedoch ein organisches Korrelat. Hier können Dyskinesien des Sphinkter Oddi die Ursache sein, werden jedoch nur bei ca. 1 % der Patienten nach Cholezystektomie nachgewiesen (McPhee MS, 1987).

1.8.2 Konservative Therapieformen

Eine medikamentöse Behandlung der Cholezystolithiasis umfasst zum einen die symptomatische Behandlung von durch Gallensteine ausgelösten Beschwerden mit nicht-steroidalen Antirheumatika (Goldmann G, 1989), Nahrungskarenz, Spasmolytika und Antibiotika bei Auftreten von Fieber. Weiterhin kann aber auch eine Lysetherapie mit Chenodeoxycholsäure und Ursodeoxycholsäure (UDCA) in Erwägung gezogen werden. Vor allem bei Patienten mit funktionstüchtiger Gallenblase und multiplen röntgennegativen Cholesterinsteinen mit einem Durchmesser unter 5 mm konnte eine Steinfreiheit nach 6 – 12 Monaten in 70 – 80 % der Fälle erreicht werden (Paumgartner G, 1993). Diese Therapie kann bei größeren Konkrementen kombiniert werden mit der extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie, welche bei Patienten mit einem solitären, röntgennegativen Stein bis zu einem Durchmesser von 2 cm durchgeführt werden kann. Vor allem Patienten mit erhöhtem Operationsrisiko können dieser Behandlung unterzogen werden (Sackmann M, 1991). Bei beiden Therapieformen und der Kombination beider Therapien ist jedoch mit einer hohen Rezidivrate zu rechnen. Trotz guter Akzeptanz bei den Patienten hat sich die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie nicht als Therapieform durchgesetzt. Symptomatische Gallensteine in den Gallengängen können mittels endoskopischer Papillotomie und Steinextraktion mittels Ballonkatheter entfernt werden (siehe auch Kap. 1.4.3).

2 Physiologie der Gallenflüssigkeit

2.1 Produktion der Gallenflüssigkeit

2.1.1 Lebergalle

Die von den Leberzellen (Hepatozyten) produzierte goldgelbe Flüssigkeit wird als Lebergalle bezeichnet. Ein Teil (ca. 75 %) wird von den Hepatozyten gebildet („kanalikulär“), ein kleinerer Teil (25 – 40 %) jedoch auch von Cholangiozyten („duktulär“) in den Gallengängen (Trauner M, 2003). Zu ca. 85 % besteht die Gallenflüssigkeit aus Wasser. Die restlichen Prozent setzen sich zusammen aus Lipiden (Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipide), Proteinen und Bilirubin, dem Gallenfarbstoff. Die Elektrolytkonzentration entspricht der des Blutplasmas, einzig der Bicarbonatgehalt ist doppelt so hoch. Der pH-Wert liegt zwischen 7,8 und 8,6. Die Gallesekretion ist ein osmotischer Prozess. Die treibende Kraft hierbei stellt die aktive Exkretion organischer Verbindungen gegen einen Konzentrationsgradienten in die Gallenflüssigkeit dar, welcher von einem passiven Nachstrom von Wasser und Elektrolyten gefolgt wird. Täglich werden abhängig von Nahrungsaufnahme und Leberperfusion zwischen 500 und 800 ml Lebergalle sezerniert. Diese Flüssigkeit gelangt über die Canaliculi, Hering-Kanäle, Ductuli und kleinen Gallenkanäle schließlich über den Ductus hepaticus zu einem Teil über den Ductus cysticus in die Gallenblase und zum anderen Teil über den Ductus choledochus bei offenem Sphinkter Oddi in das Duodenum. Im Duodenum können dann, als eine wichtige Aufgabe der Galle, durch Gallensäuren Fette im Speisebrei emulgiert werden. Zusätzlich können über die Galle eine Reihe körpereigener (Hormone) und körperfremde Substanzen (Medikamente) ausgeschieden werden. An erster Stelle wären hier der Gallenfarbstoff Bilirubin und das Cholesterin zu nennen.

2.1.2 Blasengalle

50 % der Lebergalle fließen direkt in den Darm, 50 % gelangen über den Ductus cysticus in die Gallenblase. Die Gallenblase hat eine Reservoirfunktion. Durch eine aktive Resorption von Wasser und Elektrolyten durch das Gallenblasenepithel wird eine Konzentration der Lebergalle um das 5- bis 10fache erreicht. Hierbei entsteht die grün-schwarze Blasengalle. Die treibende Kraft für diese Resorption ist der aktive Na^+ -Transport mittels der Na-K-ATPase an der basolateralen Membran. Cl^- und HCO_3^- folgen durch den hierdurch erzeugten elektrischen Gradienten. Der pH-Wert sinkt durch die Resorption von HCO_3^- von 8,2 in der Lebergalle auf 6,5 in der Blasengalle. Der hohe Na^+ -Gehalt im intercellulären Raum des Gallenblasenepithels bewirkt, dass H_2O aus der Gallenblase in den intercellulären Raum und in die Kapillaren rückresorbiert wird. Lipidlösliche Stoffe wie Gallensäuren, ungesättigte Fettsäuren, Lecithin, Lysolecithin und Cholesterin können durch die Gallenblasenmucosa absorbiert werden. Kommt es zum Eintreten von fetthaltigem Speisebrei in

das Duodenum wird über die Ausschüttung von Cholezystokinin eine Kontraktion der Gallenblase bewirkt. Nervus vagus und Parasympathomimetika führen ebenfalls zur Kontraktion der Gallenblase. Nach ca. 15 – 90 Minuten ist eine vollständige Entleerung der Gallenblase erreicht. Während der Kontraktion der Gallenblase entsteht ein Druck von 25 – 30 mmHg (Schmidt RF, 1987).

2.2 Zusammensetzung und Aufgaben der Gallenflüssigkeit

2.2.1 Lipide

Die Lipidgruppe ist aufgebaut aus Cholesterin (ca. 4 % Trockengewichtsanteil), Phospholipiden (ca. 22 % Trockengewichtsanteil), Gallensäuren (ca. 67 % Trockengewichtsanteil) und Lipopigmenten (Hay DW, 1990, a). Unter physiologischen Bedingungen beträgt das Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden zu Gallensäuren etwa 1 : 3 : 20 und folgt exakten physikalisch-chemischen Grundgesetzen (Aigner A, 1988). Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Gallebestandteile, die zu einer Überschreitung der physiologischen Normwerte führen, sind von größter Wichtigkeit in der Entstehung aller Arten von Gallensteinen. Biliäre Lipide werden von Hepatozyten, die mit einer Serie von Transportsystemen ausgerüstet sind, gegen einen steilen Konzentrationsgradienten in die Gallenkanälchen ausgeschieden (Kullak-Ublick GA, 2000; Cohen DE, 1999).

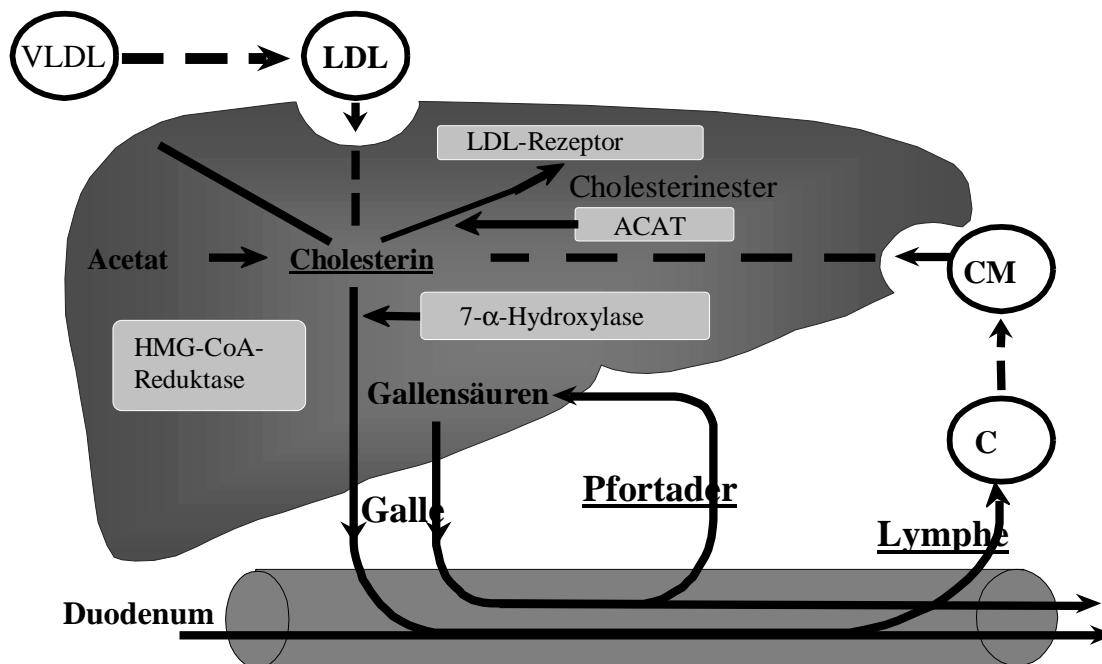
2.2.1.1 Cholesterin

Cholesterin ist ein Hauptbestandteil biologischer Membranen und die Vorstufe der Steroidhormone. Es wird mit der Nahrung aufgenommen oder von der Leber gebildet. Strukturell besteht es aus Acetyl-CoA-Einheiten als Grundbausteine mit insgesamt 27 Kohlenstoffatomen. Der Cholesterinmetabolismus der Leber unterliegt einem komplexen Regelmechanismus, wobei der Gehalt der Leberzelle an freiem Cholesterin weitestgehend konstant gehalten wird. Der Cholesterinpool des Hepatozyten wird dabei einerseits aus dem mit der Nahrung aufgenommenen und im Darm resorbierten, an Chylomikronen gebundenen Cholesterin gedeckt. Zusätzlich wird Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe, welches die Leber vorwiegend in Form von LDL erreicht, verstoffwechselt. Die dritte und wichtigste Quelle ist die hepatozelluläre Neusynthese von Cholesterin. Hierbei spielt das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase eine entscheidende Rolle. Die Verstoffwechslung des freien Cholesterins erfolgt einerseits zu Cholesterinestern, die in Form von VLDL aus der Zelle transportiert werden, und/oder andererseits wird es unverestert direkt in die Galle sezerniert. Schlüsselenzym dieses Mechanismus ist die ACAT (Nervi F, 1984). Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus des

Cholesterinmetabolismus liegt unter Kontrolle der mikrosomalen 7- α -Hydroxylase, die Cholesterin zu Gallensäuren verstoffwechselt. Durch eine veränderte Aktivität der Schlüsselenzyme (vermehrte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und/oder verminderte Aktivität der ACAT und/oder der Cholesterin-7- α -Hydroxylase) oder eine Vermehrung bzw. erhöhte Aktivität der Lipoprotein-Rezeptoren der Hepatozyten kann es zu einer Störung der Homöostase des Cholesterinstoffwechsels und konsekutiv zu einer Cholesterinhypersekretion in die Gallenflüssigkeit kommen (Abb. 2).

Zu einer Übersättigung der Gallenflüssigkeit mit Cholesterin führen prinzipiell zwei Mechanismen: eine erhöhte Cholesterinsynthese mit einer konsekutiv vermehrten biliären Cholesterinsekretion oder seltener eine verminderte Sekretion von Gallensäuren (Hay DW, 1990, b).

Abb. 2 Cholesterinstoffwechsel



2.2.1.2 Phospholipide

Phospholipide lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe leitet sich von Glycerin, einem C₃-Molekül, ab und wird dann Phosphoglyceride genannt. Phosphoglyceride bestehen aus einem Glycerinrückgrat, zwei Fettsäureketten und einer phosphorylierten alkoholischen Hydroxylgruppe. Die zweite Gruppe sind Sphingomyeline, bei welchen an Stelle des Glycerins Sphingosin, ein Aminoalkohol mit einer langen, ungesättigten Fettsäure tritt. Die Fettsäuren beider Gruppen enthalten normalerweise eine gerade Anzahl (zwischen 14 und 24) von Kohlenstoffatomen und können gesättigt oder ungesättigt sein. Die Fettsäureketten stellen einen hydrophoben, die Alkohol- oder Aminogruppe einen hydrophilen Bereich dar. Diese bipolare

Eigenschaft gibt den Phospholipiden eine wichtige Rolle bei den verschiedenen Transportformen von Lipiden in der Galleflüssigkeit.

2.2.1.3 Gallensäuren

Gallensäuren werden aus Cholesterin durch Hinzufügen einer Carboxylgruppe in der Leber gebildet. Die 7-alpha-Hydroxylase ist das Schlüsselenzym der Gallensäuresynthese. Sie gehört zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme (Agellon LB, 2000). Gallensäuren liegen nicht in freier Form vor, sondern werden in der Leber mit Glycin und Taurin konjugiert. Hierdurch werden sie wasserlöslicher. Der Gallensäurepool des Menschen beträgt ca. 3 – 4 g und passiert ca. zehnmal pro Tag eine enterohepatische Zirkulation. Hieraus resultiert eine Gallensäuresekretion von 20 – 40 g/Tag welche für die lipolytische Funktion der Gallensäuren während einer Mahlzeit notwendig ist. Nur 0,5 g dieser Menge werden über den Stuhl ausgeschieden und müssen durch eine De-novo-Synthese ersetzt werden (Trauner M, 2003). Chenodeoxycholsäure und Cholsäure sind hierbei primäre Gallensäuren, welche im Darm chemisch und/oder durch Bakterien modifiziert werden können in sekundäre (Desoxycholsäure, Lithocholsäure) und tertiäre (Ursodeoxycholsäure) Gallensäuren (Trauner M, 2003). Das Mengenverhältnis Chenodeoxycholsäure zu Cholsäure zu Deoxycholsäure beträgt 2 : 2 : 1. Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure machen nur einen sehr geringen Teil der Gesamtgallensäuren aus. Wie die Phospholipide besitzen Gallensäuren hydrophile (Carboxyl- und OH-Gruppen) und lipophile (Steroidkern und Methylgruppen) Anteile. Überschreitet die Konzentration von Gallensäuren in Wasser 1 – 2 mmol/l, bilden sie kugelige Gebilde, die Fette enthalten/transportieren können, so genannte Mizellen.

2.2.2 Transportformen von Lipiden in Galle

Cholesterin hat in menschlicher Gallenflüssigkeit einen Anteil von ungefähr 4 % (ausgedrückt als Trockengewichtsprozent). Da die Löslichkeit von Cholesterin bei ca. 10^{-7} mmol/l liegt, würde es ohne das Vorhandensein spezieller Transportformen zu einer sehr schnellen Ausfällung von Cholesterin und Bildung von Cholesterinkristallen kommen. Dies wird verhindert durch die Bildung von Aggregaten aus Cholesterin mit Gallensäuren und/oder Phospholipiden (Admirand WH, 1968; Capral DJ, 1989). Hierbei sind derzeit drei Formen bekannt (Cohen DE, 1993):

1. **Mizellen:** Mizellen sind 1 – 2 nm große, thermodynamisch stabile Aggregate, welche aus Gallensäuren oder Gallensäuren-Cholesterin gebildet werden. Sie enthalten ca. 10 – 18 Gallensäuremoleküle und bilden sich spontan aus – bei Vorhandensein der kritischen mizellaren Konzentration (1 – 2 mmol/l). Die hydrophile Seite der Gallensäuren orientiert

sich in Mizellen nach außen zur wässrigen Phase, die lipophile Seite nach innen. Die Aufnahme von Phospholipiden in die gemischte Mizelle erhöht die Cholesterinlösungskapazität und ermöglicht das Eindringen von Wasser, so dass die Mizelle bis zu 10 nm wachsen und quellen kann. Verschiedene Arten von Gallensäuren besitzen durch einen unterschiedlichen Grad an Hydrophilie bzw. Lipophilie eine unterschiedliche Fähigkeit, Mizellen zu bilden.

2. **Gemischte Mizellen:** Gemischte Mizellen sind etwas größer (2 – 4 nm) und enthalten zusätzlich Lecithin.
3. **Unilamelläre, metastabile Vesikel:** Diese Aggregatform besteht aus einem Gemisch aus Lecithin und Cholesterin (Somjen GJ, 1986). Die Größe bewegt sich zwischen 15 – 50 nm. Sie können aggregieren und dann multilamellare Vesikel bilden.
4. **Multilamellare Vesikel:** Diese Aggregatform enthält Cholesterin und Lecithin sowie Spuren von Gallensäuren. Die Größe reicht bis über 300 nm. Bei der Nukleation von Cholesterin kommt es zu einer Deformation dieser Gebilde.

Das Vorliegen des Typs, das Verhältnis zwischen den verschiedenen Typen sowie die chemische Zusammensetzung der drei verschiedenen Lipidaggregate in einer wässrigen Lösung ist beeinflusst durch multiple Faktoren. Die wichtigsten Faktoren sind die totale Konzentration der Gallensalze, Phospholipide und Cholesterol (Carey MC, 1992, b), die Konzentration der verschiedenen Gallensalze (Donovan JM, 1993) und der Sättigungsgrad der biliären Phospholipide (Jüngst D, 1993).

Phasen und chemische Zusammensetzung der Lipidaggregate sind ausführlich in Modellsystemen (Small DM, 1966) untersucht worden. Hieraus wurden Phasendiagramme entwickelt. Basierend auf diesen Studien können Maximalkonzentrationen von Cholesterol in der flüssigen Phase berechnet werden.

2.2.3 CSI

Der Cholesterol Saturation Index (CSI) wurde hierbei definiert, um den Sättigungsgrad der flüssigen Phase auszudrücken (Carey MC, 1978; Metzger AL, 1972). Es handelt sich hierbei um das Verhältnis von gelöstem zu maximal löslichem Cholesterin. Bei Vorliegen eines $CSI > 1$ spricht man von „lithogener“ Galle (d. h. einer gesteigerten Tendenz der Galle, Cholesterinkristalle und Gallensteine zu bilden).

Gallenflüssigkeit ist niemals im Gleichgewicht. Unilamellare Vesikel, die aus Phospholipiden und Cholesterol bestehen, werden zusammen mit monomeren Gallensalzen in die kanalikuläre Galle

ausgeschieden. Diese Lipidsekretion ist gefolgt von einer postkanalikulären Bildung von Mizellen. Cholesterol und zu einem noch größeren Anteil Phospholipide werden in gemischte Mizellen verschoben; und eine kontinuierliche Veränderung in der Zusammensetzung der Blasengalle ist begleitet von einem ständigen Umordnen der biliären Liposomen. Biliäre Liposomen werden als die Hauptquelle eines Cholesterinüberschusses in der Galle angesehen. Sie liefern das für die Kristallbildung und das Steinwachstum benötigte Cholesterin.

2.2.4 Proteine

Biliäre Proteine entsprechen einem Gewichtsanteil von 4 % in der Gallenflüssigkeit. Die häufigsten Proteine sind neben den Muzinen Albumin, APF, CBP und IGA. Der Großteil der Proteine stammt aus dem Serum und es wird angenommen, dass sie über parazelluläre Wege durch Tight junctions zwischen Hepatozyten und dem biliären Epithel in die Blasengalle gelangen (Reuben A, 1984). Die treibende Kraft hierfür ist ein Konzentrationsgradient zwischen der Konzentration von Proteinen in der Lebergalle, welche ca. 50 mal geringer ist als die Proteinkonzentration im Blutserum. Ein großer Teil des biliären Albumins wird von Hepatozyten in die Lebergalle direkt ausgeschieden (Saucan L, 1992). Wahrscheinlich geschieht dies auch mit anderen biliären Proteinen, die aus dem Serum stammen. Ein weiterer Transportweg von Serumproteinen in die Galle ist die Transzytose: Rezeptorvermittelt erfolgt eine Endozytose bestimmter Proteine am sinusoidalen Pol der Leberzelle (Pinozytose). Dieser Mechanismus konnte für IGA bei Ratten nachgewiesen werden (Fisher MM, 1979).

Ein kleiner Anteil biliärer Proteine ist an die kanalikuläre Membran gebunden und kann durch Gallensäuren losgelöst werden oder zusammen mit Phospholipiden in die Galle co-transportiert werden (Groen AK, 1995). Letztendlich können lysosomale Enzyme über Exocytose in die Galle sekretiert werden.

Man nimmt heute an, dass biliäre Proteine auch eine große Rolle in der Entstehung von Gallensteinen spielen. In einer Studie von Jüngst und Mitarbeitern fand sich eine höhere Gesamtproteinkonzentration in Patienten mit Gallensteinen (Jüngst D, 1991). Weiterhin wurde für einige Proteine eine die Gallensteinentstehung fördernde Aktivität („Pronukleatoren“) und für andere Proteine eine hemmende Aktivität („Antinukleatoren“) festgestellt (Burnstein MJ, 1983; Busch N, 1991). Hierauf soll in Kapitel 2.2.1 genauer eingegangen werden.

3 Pathogenese der Cholezystolithiasis

Die Pathogenese der Cholezystolithiasis ist in ihrer Gesamtheit nicht aufgeklärt. Im Einzelnen wird heute die Pathogenese durch folgende Ereigniskette erklärt:

1. Cholesterinübersättigung der Blasengalle
2. Cholesterinnukleation
3. Hypomotilität der Gallenblase und Stase
4. Steinwachstum

3.1 Cholesterinübersättigung der Blasengalle

Voraussetzung für die Entstehung von Gallensteinen ist eine Übersättigung der Blasengalle mit Cholesterin. Zum einen kann es hierzu exogen durch eine cholesterinreiche Ernährung kommen. Hierbei erreicht mehr Cholesterin aus der Nahrung, welches im Darm resorbiert und an Chylomikronen (CM) gebunden wird, den Hepatozyten. Zusätzliche endogene Cholesterinquellen sind die hepatozelluläre Neusynthese (Schlüsselenzym ist hierbei die HMG-CoA-Reduktase) sowie Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe, welches die Leber vorwiegend in Form von LDL erreicht. Der Gehalt des Hepatozyten an freiem Cholesterin bleibt weitgehend konstant. In den Hepatozyten wird das aus der Peripherie ankommende Cholesterin aufgenommen und zu den kanalikulären Membranen transportiert. Es resultiert eine Erhöhung des freien Cholesterins im endoplasmatischen Retikulum (Sahlin S, 1992) und im Zytosol (Smith JL, 1990) des Hepatozyten. Einerseits kann das freie Cholesterin zu Cholesterinestern verstoffwechselt werden (Schlüsselenzym ACAT) und in Form von VLDL aus der Zelle transportiert werden, zum anderen wird es unverestert direkt in die Galle sezerniert (Abb. 1).

Ein weiterer Regulationsmechanismus des Cholesterinmetabolismus liegt unter Kontrolle der mikrosomalen 7-alpha-Hydroxylase, welche Cholesterin zu Gallensäuren verstoffwechselt. Durch eine veränderte Aktivität der Schlüsselenzyme des Feedback-Systems (vermehrte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und/oder verminderte Aktivität der ACAT und/oder der Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase) oder eine Vermehrung bzw. erhöhte Aktivität der Lipoprotein-Rezeptoren der Hepatozyten kommt es zu einer Störung der Homöostase des Cholesterinstoffwechsels und konsekutiv zu einer Cholesterinhypersekretion in die Gallenflüssigkeit.

Eine Verminderung des Gallensäuregehaltes der Gallenflüssigkeit resultiert in erster Linie aus Störungen des enterohepatischen Kreislaufs und ist weitaus seltener als die Cholesterinübersättigung eine Ursache der Entstehung von Cholesterinsteinen.

3.2 Nukleation von Cholesterin

Die Cholesterinübersättigung alleine ist eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung der Gallensteinentstehung, ließ sich doch bei steinfreien Personen zu 40 – 80 % ebenfalls eine

Cholesterinübersättigung der Blasengalle nachweisen (Holzbach RT, 1973; Carey MC, 1992, a). Eine weitere wichtige Voraussetzung ist die Nukleation (und beschleunigte Nukleation) von Cholesterin in den Gallenwegen, d. h. der Übergang von gelöstem Cholesterin in eine Kristallform. Hierbei spielen die unter Kap. 1.8.2 vorgestellten Transportformen von Lipiden in der Galle eine entscheidende Rolle. Bei der Überschreitung der Transportkapazität für Cholesterin von Mizellen und Vesikeln kommt es zu einem instabilen physikalisch-chemischen Gleichgewicht, welches sich durch den CSI ausdrücken lässt. Bei leicht erhöhten CSI-Werten (1,0 – 1,3) entstehen aus cholesterinübersättigten Mizellen cholesterinreiche Vesikel. Hierdurch kann die Abgabe von Cholesterin in die Galle und damit eine Nukleation verzögert werden (Kibe A, 1985). Bei höheren CSI-Werten (1,3 – 2,0) vergrößern sich die Vesikel zunehmend und es entstehen die multilamellaren Vesikel, welche agglutinieren und als Nukleationskerne dienen können (Afdhal NH, 1995). In mit Cholesterin übersättigten Gallen wurden Vesikelmengen bis zu Werten von 21,7 g/dl gemessen (Halpern Z, 1986). Vesikel sind die Hauptquelle des Cholesterins bei der Gallensteinbildung (Somjen GJ, 1985). Cholesterin aus Vesikeln nukleiert doppelt so schnell wie Cholesterin aus Mizellen (Peled Y, 1988). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen schienen Cholesterinkristalle aus den größten Transporteinheiten, den multilamellaren Vesikeln, zu wachsen (Collins JJ, 1982).

Basierend auf den Beobachtungen von Halpern et al. (Halpern Z, 1986) beinhaltet die Theorie der Kristallisation von Cholesterin zwei Schritte: Die Aggregation und Fusion von cholesterinübersättigten Vesikeln führt zur Bildung von Flüssigkristallen, aus welchen sich über verschiedene Zwischenstufen (Nadeln und helikale Kristalle) tafelartige Cholesterinmonohydratkristalle, im Lichtmikroskop als flache rhomboide Gebilde erscheinend, bilden. Die Aggregation und Fusion von Vesikeln konnte jedoch niemals sichtbar gemacht werden. Auch scheint es eine Art der Kristallisation zu geben, die diese beiden Schritte auslöst (Wang DQ, 1996).

Mit Hilfe einer nach Holan und Mitarbeitern (Holan KR, 1979) entwickelten Methode kann in nativer Galle die so genannte Nukleationszeit (NT oder COT) bestimmt werden. Die Nukleationszeit ist definiert als die Zeit in Tagen, die benötigt wird, bis in ultrazentrifugierter, kristallfreier Galle im polarisierten Licht eines Lichtmikroskops Cholesterinmonohydratkristalle auftreten. Dieser Parameter ermöglicht zusammen mit dem CSI eine genauere Unterscheidung zwischen Gallenproben von Patienten mit Gallensteinen und Patienten ohne Gallensteine.

3.2.1 Pro- und Antinukleatoren

Da cholesterinübersättigte Galle nicht nur in Patienten mit Gallensteinen, sondern auch in Patienten ohne Steine gefunden wurde (Holzbach RT, 1973), wurden weitere Tests mit der Frage nach Unterschieden zwischen diesen verschiedenen Typen von Gallenflüssigkeit durchgeführt. Holan und Mitarbeiter (Holan KR, 1979) fanden 1979 deutliche Unterschiede zwischen den COT von Blasengallen mit gleichen CSI: Es fand sich keine Korrelation zwischen CSI und COT in der Gallensteingruppe sowie sehr kurze COT in einigen Patienten ohne Gallensteine mit cholesterinuntersättigter Gallenflüssigkeit. Diese Ergebnisse führten zur Annahme, dass zusätzlich zur Cholesterinübersättigung andere Faktoren die Nukleation und die Bildung von Gallensteinen begünstigen müssen.

3.3 Hypomotilität der Gallenblase und Stase

Ein weiterer, die Nukleation von Cholesterin und die Bildung von Gallensteinen begünstigender Faktor ist die Verweildauer der Galle in der Gallenblase. Hierbei scheint die Motilität der Gallenblase eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine Reihe von Studien zeigte, dass die Motilität der Gallenblase bei Vorliegen einer Cholezystolithiasis herabgesetzt ist (Pomeranz IS, 1985). Ob es sich hierbei um eine Ursache oder Folge der Erkrankung handelt, bleibt ungeklärt. Durch eine erhöhte Konzentration von Cholesterin in der Gallenflüssigkeit kommt es zur Einlagerung von Cholesterin in die glatte Muskulatur der Gallenblasenwand (Lamont JT, 1992, a), welches zu einer Beeinträchtigung der Kontraktilität führt. Dieser Effekt wird durch eine erhöhte Ausschüttung von Cholezystokinin versucht zu kompensieren (Behar JB, 1989). Dieser Mechanismus reicht zur Kompensation der Hypomotilität jedoch nicht aus und es kommt zu einem vergrößerten Nüchtern- und Residualvolumen (Lamont JT, 1992, a), einer verringerten fraktionierten Entleerung bei fettreichen Mahlzeiten (Kishk SMA, 1987) und einer verzögerten Wiederauffüllung der Gallenblase (Jazrawi RP, 1995). Die verlängerte Verweildauer der Blasengalle in der Gallenblase kann dann die Kristallisation von Cholesterin sowie das Wachstum von Cholesterinsteinen fördern. Als Beweis für diese Theorie kann die erhöhte Gallensteininzidenz bei Patienten mit reduzierter Gallenblasenmotilität aufgrund parenteraler Ernährung gewertet werden. Ein weiterer Beweis für diese Theorie sind Versuche, die zeigten, dass sich bei Pigmentsteinträgern ein normales Kontraktionsverhalten zeigte (Howard PJ, 1991). Es besteht der Verdacht, dass eine passive molekulare Absorption von Cholesterin durch die Gallenblasenmucosa und Muskelzellen in den frühen Stadien der Cholesterinübersättigung eine wichtige Rolle in der Muskeldysfunktion spielt (Lamont JT, 1992, a). In In-vitro-Versuchen wurde die Möglichkeit der Absorption von Cholesterinvesikeln durch die Gallenblasenmucosa bewiesen (Purdum PP, 1992). Die Diffusion,

Anreicherung und Speicherung von Cholesterinmolekülen aus der übersättigten Galle in der sarkolemmlen Membran scheint die Freisetzung eines Second Messengers aus der Zellmembran zu verhindern (Behar JB, 1992) und im Verlauf die Muskelkontraktionen zu verhindern.

Eine weitere Theorie der Entstehung der Gallenblasenhypomotilität bezieht sich auf Sauerstoffradikale, die an isolierten Muskelstreifen aus Gallenblasen deren Kontraktionsfähigkeit reduzierten (Moummi C, 1991). Demnach könnten entzündliche Prozesse, bei denen Sauerstoffradikale freigesetzt werden, zur verminderten Kontraktion der Gallenblase führen. Auch eine gesteigerte Prostaglandinesynthese (Chapman WC, 1989) und ein Defekt der Cholezystokinin-Rezeptoren der Gallenblase (Sitzmann JV, 1990) wurde als eine Ursache der Motilitätsstörung der Gallenblase diskutiert.

Mit den verschiedenen Methoden der Visualisierung wie Sonographie, Cholezystographie oder Choleszintigraphie fanden sich widersprüchliche Ergebnisse. Verzögerte Entleerungen der Gallenblase fanden sich bei Patienten ohne Gallensteine (Everson GT, 1980) und bei Patienten mit Cholesterinkristallen (Brugge WR, 1986). Daher ist es derzeit unklar, ob die Hypomotilität der Gallenblase eine Ursache oder Folge der Gallensteinentstehung ist.

3.3.1 Viskosität

Die Viskosität ist die Zähigkeit einer Flüssigkeit oder eines Gases und ist eine physikalische Stoffkonstante. Neben der Hypomotilität der Gallenblasenwand spielt auch die Viskosität der Galle eine Rolle bei der Entstehung einer Stase und somit bei der Entstehung der Cholelithiasis. Die Gallenflüssigkeit ist eine Non-Newtonsche Flüssigkeit (Bouchier IAD, 1965; Gottschalk M, 1986). Dies bedeutet, dass sich in der Fließkurve ein sehr charakteristischer Verlauf zeigt: Die Viskosität zeigt höhere Werte, je langsamer die auf die Flüssigkeit ausgeübte Bewegung ist. Ein gleiches Phänomen zeigt menschliches Blut, wenn es in den großen Gefäßen des Körpers bei hoher Fließgeschwindigkeit zu einer niedrigeren Viskosität als in den kleinen Gefäßen kommt. Die Viskosität der Blasengalle wird durch die Gesamtkonzentration der Proteine und Hexosamine bestimmt (Shoda J, 1997). Hexosamine stammen hierbei hauptsächlich von löslichen Muzinen in der Galle. In einer neueren Arbeit unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die Viskosität der Blasengalle vor allem durch Muzine und Phospholipide bestimmt wird (Jüngst D, 2001). In einer aktuellen Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass Ursodeoxycholsäure als wirksame Therapie der Cholezystolithiasis zu einer Reduktion der Viskosität der Blasengalle führt (Fischer S, 2004). Eine erhöhte Viskosität der Blasengalle kann zur längeren Verweildauer bzw. zur Stase führen und damit die Entstehung von Gallenblasensludge und Gallensteinen begünstigen.

3.3.2 Biliärer Sludge

Biliärer Sludge ist eine Substanz, die aus Cholesterinmonohydratkristallen und Kalziumsalzen in einer Matrix aus Protein-Muzin-Komplexen besteht (Carey MC, 1988). Unter bestimmten Bedingungen kann Gallenblasensludge sonographisch nachgewiesen werden: schneller Gewichtsverlust, Schwangerschaft, Therapien mit Ceftriaxon oder Octreotiden, Knochenmarks- oder andere Organtransplantationen und eine lang andauernde parenterale Ernährung. Gallenblasensludge kann als vorübergehendes Phänomen auftreten, kann aber auch eine Vorstufe in der Entstehung von Gallensteinen darstellen. So konnte im Zentrum von Cholesteringallensteinen ein Muzin-Bilirubinatkomples identifiziert werden, der eine dem Gallenblasensludge identische Zusammensetzung aufwies (Smith BF, 1985). Es wird angenommen, dass biliärer Sludge wichtig für die Stabilisation von Vesikelaggregaten und Kristallen ist und somit als ein „Wachstumskern“ (Nidus) während der Entstehung des Gallensteinkeims fungieren kann.

3.4 Steinwachstum

Die Schritte der Gallensteinentstehung nach der Nukleation von Cholesterin sind in ihrer Gesamtheit nicht aufgeklärt. Wahrscheinlich kommt es zu einer Anlagerung von Cholesterinkristallen aneinander, welche v. a. im biliären Sludge stattfindet. Die sich auf diese Art ausbildenden „Cholesterinplatten“ nehmen durch die Kontraktionen der Gallenblase langsam Kugelgestalt an. Durch Einlagerung von Kalzium und Mucus nehmen die Gallensteine in 2 – 5 Jahren eine Größe von 10 mm und ein Gewicht von 500 mg an.

Multiple Cholesterinsteine bilden sich über kreisförmige Aneinanderlagerungen von Cholesterinkristallen. Etwa 20.000 Kristalle bilden eine Kugel mit einem Durchmesser von 0,5 mm. Mehrere dieser Kugeln lagern sich zu den so genannten Maulbeer-Steinen zusammen. Dies dauert etwa drei Monate. Es schließt sich eine ca. 2 – 3 Jahre dauernde Phase an, in welcher sich einzelne Cholesterinkristalle in zahlreichen Schichten an die unebene Oberfläche der Steine anlagern. Das Zerbrechen dieser Steine kann der Beginn einer neuen Steingeneration sein (Wolpers C, 1993).

Spezieller Teil

4 Pro- und Antinukleatoren

Zur Erklärung kürzerer Nukleationszeiten von Cholesterin bei verschiedenen Gallen mit gleichen CSI wurde in den schneller nukleierenden Gallen die Anwesenheit einer oder mehrerer, die Nukleation fördernder Substanzen (Pronukleatoren) bzw. die Abwesenheit einer oder mehrerer, die

Nukleation hemmender Substanzen (Antinukleatoren) oder eine Kombination aus beidem postuliert.

4.1 Antinukleatoren

Seit bekannt war, dass Blasengalle von Patienten ohne Gallensteine cholesterinübersättigt sein kann, wurde die Anwesenheit von die Nukleation hemmenden Substanzen in diesen Blasengallen postuliert. Apolipoprotein I und II fanden sich als Proteine, die die Nukleation hemmen (Kibe A, 1984). Busch und Mitarbeiter bestätigten, dass Apolipoprotein I die Nukleationszeiten verlängern und die Wachstumsrate der Cholesterinkristalle vermindern konnte. In späteren Studien wurde die Wirkungsart von Apolipoprotein I durch eine Stabilisierung von cholesterinreichen Vesikeln und eine Verhinderung von deren Fusion beschrieben (Yamashita Y, 1996). Ein Unterschied in der Konzentration von Apolipoprotein I und II in Patienten mit Gallensteinen im Vergleich zu Patienten ohne Gallensteine konnte jedoch nicht gezeigt werden (Sewell R, 1983). Als weitere Stoffe mit inhibitorischer Wirkung auf die Cholesterinnukleation konnten ein 128k-Dalton-Glykoprotein (Ohya T, 1993) und IGA (Busch N, 1998) identifiziert werden. IGA als Antinukleator ist hierbei jedoch umstritten (Upadhya GA, 1993).

4.2 Pronukleatoren

Burnstein und Mitarbeiter zeigten 1983, dass ein Hinzufügen kleiner Mengen schnell nukleierender Gallenflüssigkeit zu langsam nukleierender Gallenflüssigkeit die COT in dieser Mischung deutlich verringert (Burnstein MJ, 1983). Im Folgenden wurde dann eine große Anzahl von Bestandteilen der Gallenflüssigkeit auf ihre pronukleatorischen Eigenschaften getestet. Die untersuchten Bestandteile können in drei Gruppen aufgeteilt werden.

4.2.1 Lipidkomposition

Zum ersten wurde bewiesen, dass verschiedene Parameter der Lipidkomposition der Galle wie die totale Lipidkonzentration, die Hydrophobizität der Gallensalze, das Verhältnis von Gallensalzen zu Lecithin und das Verhältnis von Cholesterin zu Lecithin in den Vesikeln die Kinetik der Cholesterinkristallisation beeinflussen (Holzbach RT, 1991).

4.2.2 Kalziumsalze, Mikrobakterien und biliärer Sludge

Zum zweiten sind Kalziumsalze, Kontamination mit Mikroorganismen und biliärer Sludge wichtige Parameter in der Regulation der Cholesterinkristallisation. Hierbei werden Kalziumsalze, vor allem Bilirubinate und Phosphate, regelmäßig im Zentrum und zusammen mit Muzinen und

anderen Proteinen in konzentrischen, gürtelförmigen Ablagerungen von Gallensteinen gefunden (Malet PF, 1986; Ostrow JD, 1990; Taylor DR, 1995). Die Entstehung der gürtelförmigen Ablagerungen kann erklärt werden durch Präzipitation von Kalziumkarbonat in einer organischen Matrix, ein Prozess, der analog zur Biomineralisation in anderen Geweben wie z. B. Knochen gesehen werden kann. Es wurde berichtet, dass kalziumbindende Proteine mit niedrigem Molekulargewicht AFP (anionic protein fraction) und CBP (calcium binding protein) zusammen mit Kalzium regulatorische Wirkung auf die Cholesterinnukleation haben. In Modellgalle verminderte APF die Masse der Cholesterinpräzipitation, verringerte aber nicht die COT, wobei Kalzium den gegenteiligen Effekt hatte (Konikoff FM, 1997).

Nachdem im Kern einiger Cholesteringallensteine – aber nicht in der Peripherie – bakterielle DNA gefunden wurde, wurde auch eine Beteiligung von Mikroorganismen an den frühen Entstehungsphasen von Gallensteinen postuliert (Swidsinski A, 1995). Obgleich diese Ergebnisse später wieder bezweifelt wurden (Swidsinski A, 1998), ist eine Beteiligung von Bakterien an der Entstehung von Gallensteinen nicht unwahrscheinlich. Ob jedoch Bakterien die Ursache einer Entzündungsreaktion am Gallenblasenepithel sind, welche dann zur Entstehung des Nidus und zur Steinentstehung führt, oder aber auch die direkte Ursache der Nidusbildung oder aber auch beides zusammen sind, bleibt unklar.

4.2.3 Non-Muzin-biliäre Proteine

Eine große Anzahl biliärer Proteine wurde auf pronukleatorische Eigenschaften untersucht. Zunächst fanden Groen und Mitarbeiter ein Nicht-Muzin-Glykoprotein, welches die Kristallisation beschleunigte (Groen AK, 1988). Weiterhin wurden IGM und IGG (Chijiwa K, 1991) mit starker, Fibronektin mit fraglicher (Chijiwa K, 1991; Miquel JF, 1994), Albumin, verschiedene Glykoproteine (Miquel JF, 1992), Aminopeptidase N (Nunez L, 1993), Haptoglobin (Yamashita G, 1996), Phospholipase C (Pattinson NR, 1990), CEACAM1-85 (Jirsa M, 2000), α_1 -Antitrypsin (Zijlstra AI, 1996), α_1 -Antichymotrypsin (Zijlstra AI, 1996) und α_1 -Acid-Glykoprotein (Abei M, 1993) mit pronukleatorischer Wirkung identifiziert.

Um die Rolle der vielen verschiedenen Proteine an der Nukleation von Cholesterin genauer zu definieren, forderten Harvey und Strasberg (Harvey PR, 1993) Kriterien, die zutreffen müssen, damit eine pronukleatorische Aktivität vorausgesetzt werden kann: Die Substanz sollte zum ersten in schnell kristallisierender Galle in einer qualitativ oder quantitativ unterschiedlichen Form vorkommen als in normaler Galle; nach Entfernung der Substanz aus der schnell nukleierenden Galle sollte die Kristallisation verzögert sein. Als weiteres Kriterium forderten sie, dass nach

Zugabe der Substanz zu normaler Galle die Nukleationsgeschwindigkeit erhöht sein muss. Groen und van den Berg fügten diesen Kriterien die Forderung hinzu, dass das Protein einer Zerstörung durch Pronasen widerstehen muss. Die einzigen Proteine, die gegen alle – bis auf das erste – Kriterium getestet wurden, sind Muzine und IGG. Obgleich beide Proteine in Modellgalle die Nukleation deutlich förderten, führte eine Entfernung aus nativer Galle nicht zu einer Nukleationszeitverlängerung (Gallinger S, 1985; Miquel JF, 1998). Weiterhin war die pronukleatorische Wirkung sensitiv gegenüber Pronase-Einwirkung (Zijlstra AI, 1996). Trotz intensiver Forschung bleibt es unklar, ob eines der Proteine oder eine Kombination von Proteinen verantwortlich für eine beschleunigte Nukleation ist.

5 Muzin-Glykoprotein

5.1 Muzine Allgemeines

Muzine sind große, stark glykosilierte Makromoleküle, die zu ungefähr 80 % aus Kohlenhydraten und 20 % aus Proteinen bestehen. Muzin-Glykane sind meistens über Sauerstoffbrücken in einem Abstand von 8 – 20 Zuckerresten verbunden. Die Glykane bestehen aus neutralen Zuckern, welche ein Rückgrat bilden, an welches Sialsäure und Sulfatester gebunden sein können (Strous GJ, 1992; Devine PL, 1992; Seregni E, 1997; Nieuw Amerongen AV, 1998; Klein A, 2000). Verschiedene Typen von Muzinen, wie zum Beispiel respiratorische, zervikale oder gastrointestinale Muzintypen, haben eine ähnliche Struktur: ein Proteinkern, der umgeben ist von einer Hülle aus Kohlenhydrat-Seitenketten verschiedenster Länge und Anzahl. Der Proteinkern ist hierbei teilweise nicht glykosiliert und damit zugänglich für eine enzymatische Degradation. Gelbildende Muzine polymerisieren durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen cysteinreichen Abschnitten der Muzin-Moleküle.

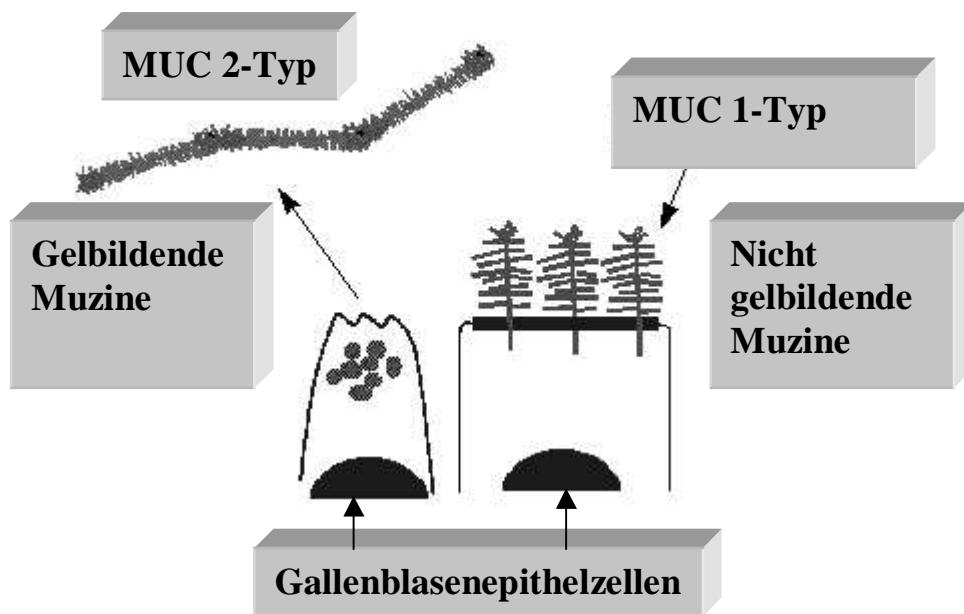
5.2 Gastrointestinale Muzine/Genetik

Neun MUC-Gene, welche für unterschiedliche Muzin-Proteine kodieren, wurden bisher identifiziert: MUC 1 – MUC 4, MUC 5A, MUC 5B und MUC 6 – MUC 8 (Seregni E, 1997; Shankar V, 1994; Shankar V, 1997).

Im Gastrointestinaltrakt gibt es zwei Haupttypen von Muzinen. Typ 1 ist membrangebunden, wird ubiquitär exprimiert und führt nicht zur Entstehung eines Gels. Das Gen MUC 1 (Ho SB, 1993) kodiert für diesen Muzintyp. Typ 2 ist gelbildend und nicht membrangebunden. Für Typ 2 wurden verschiedene Genloci wie MUC 1 – MUC 4, MUC 5 A, MUC 5 B und MUC 6 – MUC 8 (Seregni E, 1997; Nieuw Amerongen AV, 1998; Klein A, 2000) identifiziert. In der Gallenblase kodieren MUC 3 und MUC 5B für die Hauptmuzinarten (Offner GD, 2000, Abb. 3). Es fanden sich

Hinweise auf die Existenz von Genloci für die Akkumulation von Muzinen in der Gallenblase (Wittenburg H, 2002).

Abb. 3 Muzintypen der Gallenblase



5.3 Struktur der gastrointestinalen Muzine

Die Primärstruktur von MUC 3 und MUC 5B sind ähnlich. Beide bestehen aus einem N-terminalen Ende, einem „tandem repeat“ und einem C-terminalen Ende. Beide sind wenig glykosiliert am N-Terminus, der aus drei cysteinreichen Domänen besteht. Der Tandem-repeat-Bereich enthält 7 stark glykosilierte R-Domänen, unterteilt durch 7 kurze, cysteinreiche Cys-Subdomänen. Die Muzin-Untereinheiten mit niedrigem Molekulargewicht sind über intermolekulare Schwefelbrücken zwischen den cysteinreichen Domänen miteinander verbunden und bilden so ein Polymer (Pearson J P, 1982).

Nach posttranslationalen Modifikationen (v. a. Glykosilierung) werden Muzine in sekretorischen Granula im Epithelium der Gallenblase gespeichert. Durch Verschmelzung dieser Granula mit der apikalen Zellmembran wird Muzin in das Lumen der Gallenblase freigesetzt (Wahlin T, 1974). Der Auslöser für eine Muzin-Hypersekretion wurde hierbei postuliert in der Lebergalle zu liegen, da

Versuche mit Präriehunden, welche mit einer lithogenen, cholesterinreichen Nahrung gefüttert wurden, nach Ligation des Ductus cysticus keine Hypersekretion von Muzinen in der Gallenblase zeigten (Lee SP, 1987). Prostaglandine und ihre Vorstufe, die Arachidonsäure, wurden hierbei als erstes als Induktoren einer Entzündungsreaktion für die Hypersekretion von Muzinen verantwortlich gemacht (Lee SP, 1981, a; LaMont JT, 1983; LaMorte WW, 1986). Die Rolle dieser Substanzen bleibt jedoch fraglich, da andere Studien diese Ergebnisse nicht zeigten (Cohen BI, 1991) und in klinischen Studien am Menschen eine Gabe von nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR) das Risiko der Gallensteinentstehung nicht beeinflussten (Broomfield PH, 1988; Hood K, 1988). Andere Bestandteile der Lebergalle, wie Lysophosphatidylcholine (LaMorte WW, 1986), Tumornekrose Faktor alpha (TNF alpha) (Cheung CH, 1998; Eder M, 1998), Gallensalze und Cholesterol (Afdhal NH, 1993, a) scheinen eine Muzin-Hypersekretion auslösen zu können. Von Cholesterin wird dabei angenommen, dass es die Bildung von NO (Offner GD, 2000) am Gallenblasenepithel durch Herabsetzung der Membranflüssigkeit induzieren kann. NO konnte als Auslöser einer Muzinhypersekretion in anderen Geweben nachgewiesen werden (Offner GD, 2000).

Im Gallenblasenlumen verbinden sich die Muzin-Untereinheiten durch non-kovalente Bindungen zu großen Polymeren. Die Hauptfunktion von Gallenblasen-Muzinen ist wahrscheinlich der Schutz der Gallenblasenmukosa vor chemisch oder mikrobiologisch erzeugtem Schaden (LaMont JT, 1992, b).

5.4 Muzine als Pronukleatoren

Viele Studien haben den Mukus oder Sludge als ein Milieu beschrieben, welches für die Entstehung von Cholesteringallensteinen günstig ist (Admirand WH, 1968; Lamont JT, 1984). Es gibt verschiedene Gründe, warum die Beteiligung von Muzin-Glykoproteinen an der Entstehung von Gallensteinen in einer frühen Phase angenommen wird:

Zum Ersten wurde schon sehr früh von Womack und Mitarbeitern Muzin in hohen Konzentrationen im Kern von Gallensteinen gefunden (Womack NA, 1963). Malet und Mitarbeiter bestätigten später die Anwesenheit von Muzinen im Kern von Cholesterinsteinen (Malet PF, 1989). Dies führte zur Spekulation, dass Muzine eine Matrix bilden, in welcher sich Kalzium, Cholesterinkristalle und organische Substanzen ablagern können. Später konnten Muzine mit spezifischen Antikörpern im Kern von Cholesterin und gemischten Gallensteinen als auch im Sediment von Gallensteinträgern eindeutig nachgewiesen werden (De la Porte L, 2000).

Zum Zweiten konnte eine Hypersekretion von Muzin, die der Bildung von Gallensteinen vorausging, in Tieren (Lee SP, 1987; Malet PF, 1989) und Menschen (Lee SP, 1981, b) nach Gabe einer cholesterinreichen Diät festgestellt werden.

Weiterhin konnte in verschiedenen Untersuchungen festgestellt werden, dass die Muzinkonzentrationen in Patienten mit Gallensteinen höher lagen als bei Patienten ohne Steine (Bouchier IAD, 1965; Lee SP, 1979; Swobodnik W, 1991). Während die Konzentration von Muzinen in der Blasengalle von 1 bis 4 mg/ml reichte, kann eine Hypersekretion in Konzentrationen von 10 bis 20 mg/ml in der Gelschicht am Gallenblasenepithel resultieren.

Zum Dritten fanden Lee und Mitarbeiter eine durch bovines Muzin beschleunigte Nukleationszeit in Modell-Galle (Lee TJ, 1989) und die Gruppe von LaMont eine durch bovines Muzin beschleunigte Nukleationszeit in menschlicher Galle (Levy PF, 1984). 1985 konnte diese pronukleatorische Aktivität dann von Gallinger und Mitarbeitern auch in menschlicher Blasengalle nachgewiesen werden (Gallinger S, 1985). Versuche mit rekombinanten Muzinen zeigten später wiederum diese Aktivität von Muzinen (Nunes DP, 1999). Diese pronukleatorischen Aktivitäten waren zeit- und dosisabhängig.

Zwischen der pronukleatorischen Aktivität von Muzinen, die von Patienten mit Gallensteinen gewonnen wurden, und Muzinen von Patienten ohne Gallensteine konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Gallinger S, 1985). Auch konnte durch die Konzentration von Muzinen nicht in Blasengallen von Gallensteinpatienten bzw. in Blasengallen von Patienten ohne Gallensteine unterschieden werden (Gallinger S, 1985, Levy PF, 1984).

Eine wichtige Eigenschaft von Muzinen ist die Fähigkeit, biliäre Lipide und andere hydrophobe Substanzen binden zu können (Smith BF, 1984). Diese Eigenschaft verliert sich, wenn Muzine mit Enzymen behandelt werden, welche selektiv die wenig glykosilierten Bereiche des Moleküls zerstören. Nach solcher Behandlung zeigten Muzine keine pronukleatorischen Eigenschaften mehr (Smith BF, 1987).

Über die Art, wie Muzine pronukleatorisch wirken können, besteht heute folgende Theorie:

In Modellgalle konnte gezeigt werden, dass Muzine die Fusion und Aggregation von Vesikeln beschleunigen können. Hierbei ermöglichten die hydrophoben Bindungsstellen die Fusion der Vesikel, die Aggregation wurde durch die Zuckerketten des Muzinmoleküls erleichtert (Afdhal NH, 1995). Ob jedoch große multilamellare Vesikel Cholesterinkristalle in Anwesenheit von Muzinen schneller generieren, bleibt eine Hypothese. Weiterhin scheint ein hauptsächlicher Pathomechanismus hierin zu bestehen, dass Muzine eine Gelschicht in der Nähe der Gallenblasenwand bilden, in deren maschendrahtartigen hydrophoben Bereichen cholesterinreiche

Vesikel gebunden, die Nukleation ausgelöst und Cholesterinkristalle gefangen und verankert werden (Smith BF, 1987; Lee SP, 1988).

5.5 Muzine und Cholezystolithiasis

Neben der postulierten pronukleatorischen Aktivität wird angenommen, dass Muzine zusätzlich eine sekundäre Rolle in der Entstehung der Cholezystolithiasis spielen. Mechanismen, die auch als „Epieffekte“ bezeichnet werden können, sind hier zum Beispiel eine Erhöhung der Viskosität in der Blasengalle und hieraus resultierende Stase. Unsere Gruppe konnte in einer früheren Arbeit zeigen, dass Muzine und Phospholipide die Viskosität der Blasengalle deutlich beeinflussen (Jüngst D, 2001). Ab einer Konzentration von 4 mg/ml ist bekannt, dass Muzine die Viskosität von Flüssigkeiten deutlich erhöhen.

Es bleibt unklar, ob Muzine eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Entstehung einer Cholezystolithiasis (Nukleation) spielen, oder ob sie hauptsächlich in einem späten Entwicklungsstadium, z. B. im Mukus, eine sekundäre Rolle bei der Steinentstehung einnehmen. Die überwiegende Mehrzahl aller älteren Studien bzgl. Muzinen wurden in Modellgallen-Systemen durchgeführt. Zudem wurde vorwiegend mit bovinem oder porcinem Muzin gearbeitet.

6 Fragestellung der Arbeit

Die Fragestellung dieser Arbeit besteht darin, ob und wenn ja in welcher Ausprägung in der Blasengalle gelöste Muzine einen Einfluss auf die Nukleation von Cholesterin bei Patienten mit Gallensteinen haben. Hierzu wurden ausschließlich menschliche Proben von Blasengallen von Patienten mit Gallensteinen verwendet, um frühere Resultate aus Versuchen in Modellgalle zu überprüfen und widersprüchliche Ergebnisse zu klären.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Frage nach der quantitativen Zusammensetzung der Blasengallen bezüglich Muzinen, Lipiden, Proteinen, Gallensäuren und der Viskosität. Charakterisierung der Nukleationsbereitschaft der Blasengallen durch Berechnung des Cholesterinsättigungsindex (CSI) und Bestimmung der COT. Unterschiede zwischen der Gruppe der Gemischt- und Cholesterin- sowie Pigmentsteine.
2. Frage nach Unterschieden der Muzinkonzentrationen in Pat., aufgeteilt nach solitären und multiplen Gallensteinen, aufgeteilt nach Cholesterin-/Gemischtsteinen/Pigmentsteinen, aufgeteilt nach Geschlecht der Patienten, aufgeteilt nach schnell nukleierenden und langsam nukleierenden Gallen.

3. Bestimmung der COT der Blasengalle mit und ohne Muzinzusatz in physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen.
4. Bestimmung der Kristallzahl der Blasengallen mit und ohne Muzinzusatz in physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen.
5. Frage nach geschlechtsspezifischen Verteilungsmustern innerhalb des Patientenkollektivs/geschlechtsspezifischer Verteilung der Muzinmenge.
6. Frage nach Korrelationen zwischen Muzingehalt und den übrigen Gallebestandteilen sowie Korrelationen zwischen Muzingehalt und Kristallzahl.

7 Patientenkollektiv

Es wurden Patienten des Klinikums Großhadern, München, mit röntgenologisch oder sonographisch nachgewiesener Cholezystolithiasis, welche sich aufgrund vorausgegangener Symptomatik im beschwerdefreien Intervall einer laparoskopischen Cholezystektomie unterzogen, in die Studie aufgenommen. Die Gallenblasenfunktion wurde mittels einer nach einer flüssigen Testmahlzeit bestimmten Entleerung des Gallenblasenvolumens von mindestens 30 % bestimmt. Patienten mit deutlich geringerer Gallenblasenfunktion, fehlender Reservoirfunktion der Gallenblase oder einer Obstruktion des Ductus cysticus wurden von der Studie ausgeschlossen. Keiner der Patienten wurde vor der Cholezystektomie medikamentös gegen Gallensteine (z. B. mit Ursodeoxycholsäure) behandelt.

Es wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die vor der Operation nach einer detaillierten Erklärung des Vorgehens ihr Einverständnis zur Teilnahme gegeben hatten. Das Studienprotokoll richtete sich nach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki 1975. Die Durchführung der Studie wurde von der ethischen Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität in München genehmigt.

7.1 Einteilung der Patienten

Nach dem Cholesteringehalt der Steine wurden die Patienten eingeteilt in drei Gruppen:

- Cholesterinsteinträger (50 – 100 % Cholesterin),
- Mischsteinträger (10 – 50 % Cholesterin),
- Pigmentsteinträger (< 10 % Cholesterol).

7.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen von der Studie wurden Patienten mit akuten Cholezystitiden oder Gallenblasenkarzinomen. Ebenfalls wurden mit Blut kontaminierte Proben (mittels Hämocult-Test), Proben von so genannter „weißer Galle“ (welche bei Verschluss des Ductus cysticus entsteht), Proben mit einem zu geringen Gesamtlipidgehalt (< 3 g/dl), Proben ohne lichtmikroskopisch nachweisbare Cholesterinkristalle (in Nativgalle und Sediment) und Proben, deren Volumen – meist aufgrund sehr hoher Viskosität und/oder einer die Gallenblase ausfüllenden Menge von Konkrementen – unter 5 ml lag.

Nachträglich nach Bestimmung der einzelnen Parameter wurden eine infizierte Probe und drei Proben mit zu geringem Gesamtlipidgehalt (< 3 g/dl) ausgeschlossen. So wurden homogene Gruppen von Cholesterin-/Gemischtsteinen und Pigmentsteinen untersucht.

B Material und Methoden

8 Gewinnung der Proben

Von 94 Patienten mit symptomatischer Cholelithiasis bei sonographisch oder röntgenologisch nachgewiesenen Konkrementen wurden während ausschließlich laparoskopischer Cholezystektomien Gallenproben und Gallensteine in der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern gewonnen. Hierbei wurde die Gallenblase unter Sicht im Pneumoperitoneum mit einer großlumigen Kanüle (18 Gauge) steril punktiert und die gesamte Gallenflüssigkeit aspiriert (Gollish SH, 1983). Aufgrund der Stratifikationsmöglichkeiten der Blasengalle (Tera H, 1960) wurde die möglichst komplette Aspiration der Flüssigkeit angestrebt. Der Zeitpunkt der Aspiration lag vor dem Beginn der chirurgischen Manipulationen (Ligatur der A. cystica und des Ductus

cysticus sowie der Präparation der Gallenblase aus dem Leberbett), um eine Kontamination der Blasengalle mit Blut oder Gewebeabschilferungen zu vermeiden.

Die Proben, deren Volumina zwischen 5,5 und 24 ml lagen, wurden sofort bei 37 °C ins Labor transportiert. Ein Teil wurde sofort weiterverarbeitet, ein anderer Teil unter Stickstoff bei -30 °C aufbewahrt. Konkremente wurden aus der Gallenblase nach erfolgter Cholezystektomie entnommen und ebenfalls weiterverarbeitet.

9 Aufbereitung der Proben

Nach Bestimmung des Volumens und Mischen der Gallenflüssigkeit wurden drei Aliquots jeder Probe lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Cholesterinmonohydratkristallen, Vorformen (wie Nadeln) sowie auf eventuelle Kontamination mit Blut oder Bakterien untersucht. Hierzu wurden jeweils 10 µl einer Probe auf einen Objektträger aufgebracht und bei 128facher Vergrößerung meanderförmig mit einem Zeiss-Phasenkontrastmikroskop (Neofluar PH2 mit 16fach-Objektiv) abgefahren. Ein Teil der Gallenproben wurde routinemäßig nach jeder Operation mikrobiologisch untersucht. Danach wurde die gesamte Gallenflüssigkeit mit 0,02 %-Natrium-Azid-Lösung (5 µl/ml) zur Erhaltung der Keimfreiheit versetzt. 2 ml wurden zur späteren Verarbeitung als „Nativprobe“ mit Flüssig-Stickstoff schockgefroren und bei -30 °C aufbewahrt.

9.1 Ultrazentrifugation

Die restliche Gallenflüssigkeit wurde 60 min bei 100.000 g und 37 °C in einer Beckman-Ultrazentrifuge (Modell L5-65 mit Festwinkel-Rotor Beckman Typ Ti-50) ultrazentrifugiert. Dies stellt die effektivste Methode zur Herstellung einer cholesterinkristallfreien Galle dar (De Bruijn MAC, 1992). Eine zusätzliche Filtration, wie sie in früheren Studien durchgeführt wurde, wurde im Hinblick auf die mögliche Entfernung von Nukleationskernen und damit eine Verfälschung der Zusammensetzung der Gallen nicht durchgeführt. Im Folgenden wurde die oberste Schicht (ca. 1 mm) der Isophase, die als Liquidphase bezeichnet wird, vorsichtig in den Überstand eingerührt, um den ursprünglichen Lipidgehalt nicht zu verfälschen. Der Überstand, die so genannte Isophase, wurde mit Pasteurpipetten in zunehmender Eintauchtiefe vom Sediment in drei Aliquots abgetrennt. Das dritte, dem Sediment am nächsten gelegene Aliquot wurde verworfen, die beiden anderen gemischt und lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Cholesterinkristallen untersucht. Zeigten sich weiterhin Cholesterinkristalle, wurde erneut zentrifugiert. Auch das Sediment wurde lichtmikroskopisch auf Cholesterinkristalle untersucht, da eine geringe Anzahl von Cholesterinkristallen in nicht zentrifugierter Galle übersehen werden kann. Hierdurch wurde

differenziert zwischen primär cholesterinkristallfreier und cholesterinkristallhaltiger Galle. Aus der Literatur ist bekannt, dass ca. 79 % aller Gallenproben von Cholesterinsteinträgern Cholesterinkristalle enthalten (Holan KR, 1979).

9.2 Nukleationszeit

Die ultrazentrifugierte, lichtmikroskopisch cholesterinkristallfreie so genannte isotrope Phase wurde mit folgenden Antiproteasen versetzt: 1 mmol PMSF, 5 mmol EDTA, 10 mmol N-Ethylmaleinimid. Nach intensivem Mischen für 5 Minuten auf dem Vortex-Mixer wurde die Probe in 5 Aliquots zu 1 ml in Eppendorfgefäße pipettiert und bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Alle 24 h wurde eine Probe entnommen, für eine Minute auf dem Vortex-Mixer gemischt und 20 µl bei 128facher Vergrößerung lichtmikroskopisch nach Cholesterinkristallen untersucht. Das Zeitintervall zwischen dem Ansetzen der Probe bei 37 °C und der Entdeckung des ersten Cholesterinmonohydratkristalls wurde als Nukleationszeit bzw. Cholesterol observation time (COT) definiert (Holan KR, 1979). Es wurde versucht möglichst schnell zu arbeiten, um ein Abkühlen der Proben zu vermeiden. Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

9.3 Anzahl der Kristalle

Da durch die Methode der COT-Bestimmung der genaue Zeitpunkt der Cholesterinkristallisation nicht präzise bestimmt werden kann bzw. Vorstufen von Cholesterinkristallen nicht erkannt werden, enthält diese Methode einen intrinsischen Fehler. Zusätzlich ist die Methode nur eine semi-qualitative und keine quantitative Bestimmung. Deshalb wurde in dieser Studie zusätzlich zur COT in 20 Proben die Anzahl der Cholesterinkristalle täglich bestimmt. Diese Methode stellt eine sehr sensitive, aber auch sehr arbeitsintensive Methode dar. Alle 24 h wurde hierzu eine Probe aus dem Inkubator entnommen, für eine Minute auf dem Vortex-Mixer gemischt und lichtmikroskopisch die Anzahl der Cholesterinkristalle ausgezählt. Dies geschah semiquantitativ durch Aufbringen von 20 µl der Probe auf eine Zählkammer (Fast Read 102, Madaus, Darmstadt). Das Volumen über der Zählkammer betrug 7 µl. Es wurden jeweils 4 Quadrate an 4 auseinander liegenden Bereichen der Kammer ausgezählt. Hierbei wurden auch auf dem Rand der Quadrate liegende Kristalle mitgezählt. Es wurden ausschließlich typische Cholesterinmonohydratkristalle (dünne, fensterscheibenglasartige Parallelogramme mit zum Teil abgebrochenen Ecken) berücksichtigt. Häufig auftretende, haufenförmig aneinander gelagerte Cholesterinkristalle, so genannte Cluster, wurden hierbei als ein Kristall gezählt.

Die Anzahl der Kristalle am jeweiligen Tag pro μl ergab sich dann aus dem Mittelwert der 4 ausgezählten Quadrate multipliziert mit 160, da die Zählkammer 160 Kleinstquadrate enthielt. Dieser Wert musste entsprechend dem Gesamtvolumen der Zählkammer (7 μl) durch 7 dividiert werden.

10 Isolierung von humanem Muzin-Glykoprotein

Um humanes Muzin-Glykoprotein zu erhalten, wurde so genannte weiße Galle, welche sehr muzinreich und zusätzlich lipidarm ist, von Patienten mit Gallensteinen gewonnen, gepoolt und nach der Methode von Pearson und Harvey verarbeitet (Pearson JP, 1982; Harvey PRC, 1986). Dabei wurden zwei besondere Eigenschaften des Muzinmoleküls ausgenutzt: 1. ein hohes Molekulargewicht ($\text{MG} > 2 \text{ Mio.}$) und 2. eine hohe schwebende Dichte (ca. 1,48 g/ml). Nach dieser Methode wurde die gepoolte Galle zunächst bei 4 °C für 72 Stunden gegen Aqua bidest. und 0.02 % NaN_3 dialysiert. Dann wurde das Dialysat für 30 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert, um Lipide zu entfernen. Der Überstand wurde sofort auf eine Sepharose-2B-Gel Säule (80 x 2.6 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen und mit 20 mmol Tris-HCL-Puffer (pH 8,0) mit 25 mmol Taurocholatsäure (zur Vermeidung der Bildung von Lipidaggregaten) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/h eluiert. Proteine, Gallensalze und Pigmente konnten so entfernt werden. Es wurden jeweils 5 ml Volumenfraktionen gesammelt. Die Fraktionen, welche die Glykoproteine enthielten, wurden gepoolt und durch Ultrafiltration im Volumen eingengt. Danach erfolgte eine nochmalige Dialyse gegen Aqua bidest. und eine Lyophilisierung. Mit käuflichem bovinem Muzin (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde zur Aufreinigung genauso verfahren.

Zur Bestimmung des Ausschlussvolumens, zur Eichung und zur Überprüfung des Auflösungsvermögens der Säule wurden Dextranblau 2000 (MG 2 Mio), Kälberserumalbumin (MG 67000), Chymotrypsinogen (MG 25000), Ovalbumin (MG 43000) und Ribonuklease (MG 13500) verwendet. Aliquots des lyophilisierten Muzinpulvers wurden in Wasser gelöst und lichtmikroskopisch auf die Anwesenheit von Mikrokristallen überprüft. In den untersuchten Aliquots konnten keine Mikrokristalle nachgewiesen werden.

Um eine Lipidkontamination der gereinigten und gepoolten Glykoproteinfraktionen zu überprüfen, wurde eine Dünnschichtchromatographie mit einer Silicagel-G-Platte (20 x 20 cm, 200 μm) durchgeführt (Slomiany A, 1983). Hierzu wurden die Lipide der dialysierten und lyophilisierten Proben (15 – 20 mg) in folgender Anordnung mit 50 Volumen Chloroform : Methanol (2 : 1), Chloroform : Methanol (1 : 1), Chloroform : Methanol (1 : 2) und Chloroform : Methanol : Wasser

(65 : 35 : 8) extrahiert (Slomiany A, 1983). Als Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie wurde Petroleumbenzin : Diethylether : Essigsäure (90 : 10 : 1) verwendet, um neutrale Lipide zu trennen. Um zusätzlich eventuelle Phospholipidkontaminationen des gereinigten Muzins nachweisen zu können, wurde ein Aliquot des Lipidextraktes mit Chloroform : Methanol : Ammoniak (65 : 25 : 5) chromatographiert. Es konnte in diesen Versuchen keine eindeutige Lipidkontamination nachgewiesen werden.

11 Chemische Analysen

Bei allen Proben wurde die Konzentration von Phospholipiden, Cholesterin, Gesamtgallensäuren, Gesamtprotein und Mucus-Glykoprotein sowohl in der nativen Probe (nur unter Zusatz von NaN_3), in der isotropen Phase (nach Ultrazentrifugation) und in den einzelnen Fraktionen nach gelochromatographischer Trennung der isotropen Phase bestimmt. Die Messungen wurden als Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Intravarianz ($< 5\%$) wurde durch 10fache Bestimmung einiger Proben, die Intervarianz ($< 5\%$) durch fortlaufende Mitbestimmung von spezifischen Standards und von Gallenproben eines Patienten kontrolliert.

11.1 Cholesterinbestimmung

Cholesterin wurde colorimetrisch nach dem Verfahren von Liebermann und Burchard (Abell LL, 1952), modifiziert nach Watson (Watson D, 1960), bestimmt. Aufgrund der starken Eigenfärbung der Galle mußte zweimalig ein Lipid-Extraktionsverfahren durchgeführt werden. Es wurden 300 μl Galle im ersten Schritt mit 1 ml Methanol, im zweiten mit 3 ml Methanol und im dritten mit 2 ml Petroleumbenzin versetzt und jeweils 15 sec „gevortext“. Die Petroleumbenzinphase wurde schließlich abpipettiert und die wässrige Phase getrocknet. Das zurückbleibende Cholesterin wurde in einem Farbreagenz, bestehend aus 7 mmol/l Essigsäure und 6,5 mmol/l Essigsäureanhydrid gelöst. Nach 10-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgte eine Unterschichtung mit 300 μl konzentrierter Schwefelsäure, worauf erneut für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert wurde, damit sich der entstehende Farbkomplex voll entwickeln konnte. Dieser wurde bei 578 nm im Spektralphotometer (Ultrospec Plus, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) gemessen. Als Standard wurden 250, 500 und 1000 μl einer Cholesterinlösung mit einer Konzentration von 0,516 mmol/l mitgeführt. Die Extinktionswerte hieraus waren die Grundlage zur Erstellung einer Standardkurve, die zur Berechnung der Werte der Proben diente.

11.2 Cholesterinbestimmung in Gallensteinen

Nach der Methode von Nakayama (Nakayama F, 1968) wurden die aus der Gallenblase entfernten Gallensteine mit Aqua bidest. gewaschen, getrocknet und mit einem Mörser möglichst fein zerkleinert. Der Cholesterinanteil im Steinpulver wurde dann nach der modifizierten Methode von Smallwood et al. (Smallwood RA, 1972) extrahiert und quantifiziert. 20 mg des Steinpulvers wurden mit 10 ml 2-Propanol für 1 h bei 85 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung wurde die Lösung in einen 10 ml-Meßkolben filtriert und mit 2-Propanol aufgefüllt. Für die Cholesterinbestimmung wurden dann in einer Doppelbestimmung je 50 µl und 100 µl dieser Lösung in Reagenzgläsern unter N₂-Dampf eingeengt. Die weitere Bestimmung entsprach der unter 2.3.1 dargestellten Cholesterinbestimmung. Der Cholesteringehalt der Steine wurde dann als prozentualer Anteil am Trockengewicht angegeben.

11.3 Phospholipidbestimmung

Die Konzentration der Phospholipide in den Proben wurde durch Bestimmung des anorganischen Phosphors nach dem Verfahren von Fiske-Subbarow (Fiske CH, 1925) colorimetrisch gemessen. Bei dieser Methode bildet sich ein Farbkomplex durch die Veraschung von Phosphor mit Perhydrol und Reduktion mit dem Fiske-Subbarow-Reagenz in Anwesenheit von Schwefelsäure und Ammoniumheptamolybdat.

Zu 10 µl Galle wurden 2 ml 10n-Schwefelsäure zugegeben und anschließend für drei Stunden bei 150 °C verascht. Nach dem Abkühlen wurden jeweils zwei Tropfen Wasserstoffperoxid hinzugegeben und die Proben nochmals für eineinhalb Stunden bei 150 °C im Trockenschrank inkubiert. Die abgespaltenen Phosphatreste bildeten dabei mit Ammoniumheptamolybdat, katalysiert durch 1-Amino-2-Hydroxynaphthalin-4-Sulfonsäure durch Reduktion mit Natriumdisulfid, einen blauen Farbkomplex, der bei 830 nm im Spektralphotometer gemessen wurde. Aus den Extinktionswerten von L-alpha-Phosphatidylcholin-Dimyristoyl in den Konzentrationen 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 und 4 mmol/l wurde eine Standardkurve erstellt, die als Grundlage für die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Proben diente.

11.4 Gallensäurebestimmung

Die Gesamtgallensäurekonzentration wurde mittels einer modifizierten 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase-Methode nach Talalay (Talalay P, 1960) bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Umwandlung der 3-alpha-Hydroxygruppe der Gallensäure in eine Ketogruppe durch die NAD⁺-abhängige 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase und letztlich auf

der photometrischen Bestimmung des entstandenen NADH bei 340 nm. Es wurden 20 µl Probe mit 200 µl Methanol bei -18 °C über Nacht inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurden 20 µl des Überstandes entnommen. Dieser wurde anschließend mit 1 ml Glycinpuffer überlagert und mittels 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase (0,07 U/Test) und 0,1 ml 5,4 mmol NAD-Lösung oxydiert. Die Extinktionszunahme nach NADH-Bildung wurde bei 340 nm bestimmt und in die Gallensäurekonzentration mittels unterschiedlicher Cholsäurekonzentrationen als Standard umgerechnet.

11.5 Berechnung der Gesamtlipidkonzentration

Aus der Summe der Konzentrationen von Gallensäuren, Phospholipiden und Cholesterin konnte unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes (MG Gallensäuren = 492, MG Phospholipide = 759 und MG Cholesterin = 387) die Gesamtlipidkonzentration in g/dl berechnet werden.

11.6 Berechnung des Cholesterinsättigungsindex (CSI)

Die maximale theoretische Löslichkeit von Cholesterin in Gallenflüssigkeit wird als Cholesterinsättigungsindex (CSI) bezeichnet. Er ließ sich anhand der kritischen Tabellen von Carey (Carey MC, 1978) folgendermaßen berechnen:

Zuerst wurde der relative Cholesteringehalt am unter 2.3.5 berechneten Gesamtlipidgehalt in Prozent ausgedrückt. Dann wurde das Verhältnis der Phospholipide zu der Summe aus Gesamtgallensäuren und Phospholipiden berechnet. Dies ergab den Wert „N“ für die y-Achse der kritischen Tabellen. Der Wert für die x-Achse war die Konzentration der Gesamtlipide in g/dl. Der Schnittpunkt beider Achsen in der Tabelle ergab den „t“-Wert, den „Tafel-Wert“. Der Quotient aus errechnetem Cholesterinanteil und dem gefundenen Tabellenwert ergab den entsprechenden CSI.

11.8 Gesamtproteinbestimmung

Proteine wurden nach der Methode von Lowry (Lowry OH, 1951), modifiziert nach Jüngst et al. (Jüngst D, 1991), bestimmt. Hierbei werden Proteine in der Galle durch 20 % Trichloressigsäure ausgefällt, gewaschen, zentrifugiert und in einem Ether-Ethanol-Gemisch (3 : 1) bestimmt. 50 µl Probe wurde mit gleichem Volumen der 20 % Trichloressigsäure gemischt und bei 4 °C 24 h inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 3000 UPM zentrifugiert (Tischzentrifuge Sigma 3K 30) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Sediment wurde dann in 1 ml Diethylether-Ethanol-Gemisch (2 : 1) re-suspendiert und im Ultraschallgerät (Heat-Systems-Ultrasonics. Inc.,

NY, USA.) gelöst. Hierauf erfolgte eine erneute Zentrifugation und Wiederholung des Waschvorgangs. Darauf wurde das Sediment in 500 µl 1N-NaOH gelöst und 1 h bei 37 °C inkubiert. 20 µl dieser Lösung wurden dann mit 1N-NaOH auf 100 µl aufgefüllt. Hierzu wurde 1 ml alkalisches Reagenz (50 ml 2 % NaCO₃ + 1 ml CuSO₄ + 1 ml 2 % Na-K-Tartrat) zugefügt und 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl Folin-Reagenz : H₂O (1 : 1) beigefügt, 30 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 750 nm gemessen. Die Gesamtproteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer durch eine Rinderalbumin-Standardreihe erstellten Eichkurve errechnet.

11.8 Muzin-Glykoproteinbestimmung

Zur Muzin-Glykoproteinbestimmung in Blasengalle wurde eine von Miquel (Miquel JF 1995) neu etablierte Methode eingesetzt. Diese hat gegenüber älteren Methoden (Pearson J P, 1982) den Vorteil, dass die Gallemuzinkonzentration nur selten falsch als niedrig gemessen wird. Weiterhin ist sie kürzer, kostengünstiger und hat eine höhere Reproduzierbarkeit. Außerdem sind weitere Verfahren, wie CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation, nicht mehr notwendig. Man erhält eine hochmolekulare Glykoproteinfraktion, die überwiegend frei von Pigmenten und Lipiden ist. Die Bestimmung der Muzinkonzentration erfolgte dann nach der PAS-Methode von Mantle und Allen (Mantle M, 1978). Dieses Verfahren beruht auf der Oxidation von Polysacchariden durch Periodsäure und anschließender Kopplung mit einer Schiff'schen Base (PAS).

11.8.1 Vorbereitung der Blasengalle

1 ml isotrope Blasengalle wurde in Tris-Puffer (pH 7,4) mit 0,44 M KSCN und 25 mmol Taurocholsäure verdünnt (1 : 1, v/v) und 24 h bei 4 °C inkubiert. Thiocyanat senkte die Viskosität der Probe, während Taurocholsäure eine vollständige Mizellierung der Lipide bewirkte und dadurch eine lipidfreie Muzinfraktion in der späteren Gelchromatographie gewonnen werden konnte. Es folgte eine Zentrifugation mit 15.000 g über 15 min. 1 ml des Überstandes wurden dann auf eine Sepharose-2B-Säule aufgetragen.

11.8.2 Präparation der Gelchromatographie

Nach gründlichem Waschen der 100 cm langen und 2 cm durchmessenden Glassäulen mit Aqua bidest. wurde Sepharose-2B-Gel eingefüllt, aushärten lassen und über 24 h mit Elutionslösung (0,2 M NaCl, 0,03 % NaN₃, pH von 7,0) gespült. Nach der Spülung wurden die Säulen mit verschiedenen Eichlösungen, deren exaktes MG bekannt war, geeicht. Das Ausschlussvolumen

(V_0) wurde mit Dextran Blau 2000 (MG 2.000.000), V_t mit Mercaptoethanol (MG 78,13) bestimmt. Weitere Eichlösungen zur Überprüfung des Auflösungsvermögens der Säulen waren Rinderserum Albumin (MG 67.000), Ovalbumin (MG 43.000) sowie Chymotrypsin A (MG 25.000) und Ribonuklease A (MG 13.000).

Nach diesen Vorbereitungen konnte die Blasengalle aufgetragen werden.

Das Grundprinzip der Gelchromatographie beruht auf kleinen, im Gel enthaltenen Kugeln, in welche kleinere Moleküle eindringen können, größere aber nicht. Hierdurch werden größere Moleküle wie Muzine in den vorderen Fraktionen, kleinere Moleküle wie z. B. Bilirubin in den hinteren Fraktionen des Kollektors wiedergefunden.

11.8.3 Durchführung der Säulenchromatographie

1 ml des Überstandes der unter 2.3.8.1 beschriebenen aufbereiteten Gallenflüssigkeit wurden vorsichtig auf die Geloberfläche aufgebracht, die Säule mit PBS-Taurocholatlösung (pH 7,4) eluiert (0,3 ml/min) und 36 Fraktionen von 1 ml im Fraktionskollektor gesammelt. Die hochmolekularen Glykoprotein-Fractionen wurden gepoolt und gegen Aqua bidest. 24 h dialysiert, um das Na-Taurocholat zu entfernen. Die Bestimmung der dialysierten hochmolekularen Glykoprotein-Fraktion erfolgte dann nach der PAS-Methode (173).

11.8.4 PAS-Assay

Bei der PAS-Reaktion wird 1,2 Diolen durch Periodsäure (HJO_4) oxidiert, wobei Dialdehyde entstehen, die mit dem Schiff'schen Reagenz nachgewiesen werden können. Schiff'sche Lösung wurde zu jeder Bestimmung frisch zubereitet durch Lösen von 1 g basischem Fuchsin in 100 ml siedendem Aqua bidest.; Zugabe von 20 ml 1 mol HCL und Abkühlung auf 50 °C. Danach Aufschütteln der Lösung mit 300 mg Aktivkohle 5 min und anschließende Filtration über einen Doppelfilter. Das dunkelrote Filtrat wurde in einer dunklen Flasche gelagert. Vor Gebrauch wurde zu 6 ml dieser Lösung 100 mg Natriummetabisulfit zugegeben und bei 37 °C etwa 90 min bis zur Farblosigkeit der Lösung inkubiert.

2 ml Probe wurden dann mit 0,2 ml Periodsäurelösung (10 µl 50 % Periodsäure + 10 ml 7 % Essigsäure) gemischt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml der Schiff'schen Lösung dazugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde dann bei 555 nm gemessen und die Konzentration durch Erstellung eines Muzinstandards mit gereinigtem Blasengallenmucin errechnet.

11.9 Bestimmung der Viskosität

Die Viskosität ist eine physikalische Größe, die die innere Reibung eines Stoffes beschreibt. Die dynamische Viskosität ist eine für Flüssigkeiten charakteristische Konstante und wird auch als Koeffizient der inneren Reibung beschrieben. Sie ist abhängig von Temperatur und Druck. Die dynamische Viskosität ist eine Scherviskosität für die Scherströmung unter der Schubspannung T . Nach dem Fließverhalten kann man Flüssigkeiten in Newtonsche Flüssigkeiten, deren Viskosität nur durch Druck und Temperatur beeinflusst werden, und Non-Newtonsche Flüssigkeiten, deren Viskosität von der Scherströmung unter der Schubspannung T abhängig sind, unterteilen. Danach kann die Gallenflüssigkeit als Non-Newtonsche Flüssigkeit definiert werden. Die Viskosität wurde mit einem Contraves-low-shear-Rotationsviskosimeter (Contraves AG, Zürich, Schweiz) bestimmt.

12 Additionsexperimente

Isotrope Galle von 10 Patienten wurde sofort nach der Gewinnung mit humanem und weitere 10 Proben mit bovinem Muzin versetzt. Das Muzin-Pulver wurde zu Aliquots von 1 ml Galle zugefügt mit steigender Konzentration (0,2; 1; 2 und 4 mg/ml), für mindestens 5 Minuten auf dem Vortex-Mixer gemischt und täglich auf das Auftreten von Cholesterinmonohydratkristallen hin untersucht. Die Anzahl der Kristalle wurde ebenfalls täglich mittels der oben beschriebenen Methoden in einer Zählkammer bestimmt. Diese Werte wurden verglichen mit einer Kontrollprobe derselben Galleprobe ohne Muzinzusatz.

Dieselbe Verfahrensweise wurde für das gereinigte käufliche bovine Muzin angewandt in weiteren 10 Galleproben.

13 Reagenzien und Gefäße/Geräte

13.1 pH-Messung

- pH-Meter Mikroprozessor Fa WTW 537
- Vortex-Mixer

13.2 Cholesterinbestimmung in der Galle

- Ethanol 60 % p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Petrolbenzin p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Essigsäure 100 % p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Essigsäureanhydrid p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure konz. p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Cholesterin p. a., Fa. Merck, Darmstadt

13.3 Cholesterinbestimmung in den Gallensteinen

- Propanol-2 p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Cholesterin p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Essigsäure 100 % p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Essigsäureanhydrid p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure konz. p. a., Fa. Merck, Darmstadt

13.4 Phospholipidbestimmung

- 1-Amino-2-Hydroxy-Naphtalinsulfonsäure-(4), Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumdisulfid, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumsulfit, Fa. Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure 10 n (aus konzentrierter Schwefelsäure der Fa. Merck, Darmstadt)
- Perhydrol p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Ammoniumheptamolybdat, Fa. Merck, Darmstadt
- L-alpha-Phosphatidylcholin-Dimyristoyl, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Wärmeschrank Baureihe T 6060, Fa. Heraeus, Hanau

13.5 Gallensäurebestimmung

- NaOH-Rotuli p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Hydrazinsulfat, Fa. Merck, Darmstadt
- Titriplex, Fa. Merck, Darmstadt
- NAD Grad 1, 100 %, Fa. Boehringer, Mannheim
- 3-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Fa. Worthington Biochemicals
- Cholsäure, Fa. Calbiochem, LA, USA
- Glycin 99 % p. a., Fa. Sigma, Deisenhofen
- Methanol p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Präzisionskuvetten aus Quarzglas, Fa. Hellma, Müllheim
- Spektralphotometer Ultrospec Plus, Modell 4054, Fa. Pharmacia, Freiburg

13.6 Proteinbestimmung

- Trichloressigsäure 10 % (aus Trichloressigsäure 10 % p. a., Fa. Merck, Darmstadt)
- Di-Natriumcarbonat p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Kupfersulfat p. a., Fa. Merck, Darmstadt

- Kaliumnatriumtartrat p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, Fa. Merck, Darmstadt
- Humanalbumin, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Precilip, Fa. Boehringer, Mannheim

13.7 Mucus-Glykoproteinbestimmung

- Blue Dextran 2000 (Pharmacia)
- Pig Gastric Mucus, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Parasolaniline, Fuchsin, Fa. Sigma, Deisenhofen
- 1 mol HCL, Fa. Merck, Darmstadt
- Charcoal activated, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Natriumbisulfit, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Periodsäure, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Essigsäure 7 % (hergestellt aus Essigsäure 100 %, Fa. Merck, Darmstadt)
- bovines Muzin, Fa. Sigma, Deisenhofen

13.8 Gelchromatographie

- Glassäulen
- Gel Sepharose 2 B
- NaCl 0,2 mol
- NaN₃
- Fraktionskollektor Golden Retriever

13.9 Weitere Chemikalien

- Taurocholsäure (Approx. 98 %), Fa. Sigma, Deisenhofen
- Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF), Fa. Sigma, Deisenhofen
- Periodsäure, Fa. Sigma, Deisenhofen
- N-Ethylmaleinimid, Fa. Sigma, Deisenhofen
- EDTA (Ethylendiamintetraacetat), Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol p. a., Fa. Merck, Darmstadt
- Periodsäure, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Diethylether z. A., Fa. Merck, Darmstadt
- Trizma Base, Fa. Sigma, Deisenhofen
- Stickstoff, Fa. Linde, Pullach/München

- Aqua bidest.

13.10 Weitere Geräte

- Amicon Ultrafiltrationskammer, Modell 8010, Amicon Co., Danvers
- Amicon S Diaflo Ultrafiltrations-Membranen PM10, Amicon, USA
- Cyanopropyl Siloxan Kapillarsäule für GLC (CP-Sil 88; Chrompak), Middleburg, The Netherlands
- Dialyseschläuche Spectra/Por (Membrane MWCO: 3500), Spectrum Houston, Texas, USA
- Feinwaage, JL 200, reproduzierbar 0,1 mg, Fa. asa, Schermbeck
- Tischzentrifuge Labofuge GL, Fa. Heraeus, Hanau
- Rüttler, Dual Press-to-mix, Fa. Snijders, Breda, Niederlande
- Ultrazentrifuge Beckman L5-65, Fullerton, CA, USA
- Gefriertrockner (Lyophilisierung) Christ
- Eppendorf Inkubations-Thermostat 5320, Metheler und Hinz GmbH, Weilheim
- Ultraschallgerät Heat Systems-Ultrasonic. Inc, NY, USA
- Fraktionskollektor RediFrac, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
- Dünnschichtkammer, Fa. Schubert, München
- Hamilton Pipette, 701 SN, 10 µl, Hamilton, Bonaduz, Schweiz
- Kieselgeldünnschichtplatten, Fa. Merck, Darmstadt
- Minivals, Vial mit Schraubverschluss, Fa. Zinser, Frankfurt a. M.
- Zeiss Phasenkontrastmikroskop (Neofluar PH2 mit 16fach Objektiv), Zeiss
- Fast Read 102 new grids Zählkammer, Madaus, Darmstadt

14 Statistik

Die Werte aller Gruppen von parametrischen Daten sind ausgedrückt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) oder als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler). Nicht-parametrische Daten (z. B. COT) sind als Median und Range ausgedrückt. Gruppenvergleiche für parametrische Daten wurden mit dem Student-t-Test für normal verteilte, nicht verbundene und für nicht-parametrische Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test oder Wilcoxon-rank-Test durchgeführt. Spearmans Korrelationskoeffizient wurde zwischen den Variablen berechnet. Die einzelnen Variablen wurden mit einem Pearson-Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz untersucht. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant, bezeichnet. P-Werte $< 0,0001$ als hoch signifikant.

C Ergebnisse

15 Patientenkollektiv

15.1 Gruppeneinteilung, Steinzusammensetzung, COT

- Es wurden Proben von n = 94 Patienten untersucht. 60 Patienten waren hiervon weiblich, 34 männlich. Das mittlere Alter betrug 49 Jahre (Range: 26 – 73 Jahre). Anhand der Anzahl der Gallensteine wurde in eine Gruppe mit solitärem Gallenstein (n = 26, hiervon 13 weiblich und 13 männlich) und eine Gruppe mit multiplen Gallensteinen (n = 47, hiervon 33 weiblich und 14 männlich) unterschieden. Aufgrund der Steintypen wurden zusätzlich zwei Gruppen von Patienten unterschieden: 73 Patienten hatten Gallensteine mit einem Cholesterinanteil von mehr als 50 % des Totalgewichtes (Gruppe Cholesterin- und Gemischtsteine, N = 73, 46 weiblich, 27 männlich) und 21 Patienten hatten Pigmentsteine mit einem Cholesteringehalt von unter 10 % (N = 21, 14 weiblich, 7 männlich) (Tab. 1).

Lichtmikroskopisch wurde die Nukleationszeit (COT) in allen Proben festgestellt. In der Gruppe der Cholesterin-/Gemischtsteine fanden sich bei den solitären Steinen eine COT (Medianwert) von 2 Tagen (Range 1 – 21 Tage) und bei den multiplen Steinen eine COT von 1 Tag (Range 1 – 5 Tage). Dieser Trend einer kürzeren COT bei Patienten mit multiplen Gallensteinen im Vergleich zu Patienten mit solitären Gallensteinen erreichte kein Signifikanzniveau. In der Gruppe der Pigmentsteine fand sich eine COT von 21 Tagen (Range 3 – 21 Tage). Die Unterschiede der Nukleationszeit waren in allen Gruppen signifikant ($P < 0,01$).

Tab. 1

Verteilung des Patientenkollektivs auf verschiedene Gruppen

	Cholesterin- und gemischte Gallensteine		Pigmentsteine
	Solitärsteine	Multiple Steine	
Anzahl Patienten (N)	26	47	21
Geschlecht (W/M)	W = 13, M = 13	W = 33, M = 14	W = 14, M = 7
COT (Tage)	2 **	1 **	21
(Median/Range)	(1 – 21)	(1 – 5)	(3 – 21)

** $P < 0,01$ (solit./mult. Cholesterin- und Gemischtsteine vgl. mit Pigmentsteinen)

Die COT fand sich hierbei signifikant kürzer in der Gruppe der Cholesterin- und gemischten Gallensteine als in der Gruppe der Pigmentsteine ($P < 0,01$). Eine signifikante Differenz in der Geschlechtsverteilung zwischen Solitärsteinen, multiplen Steinen und Pigmentsteinen konnte nicht gefunden werden.

16 Zusammensetzung der biliären Lipide

Die Konzentrationen von Cholesterin, Phospholipiden, Gallensäuren aus der isotropen Phase (nach Ultrazentrifugation) sowie die hieraus errechnete Konzentration der Gesamtlipide und der CSI sind in Tabelle 2, aufgeteilt nach den Steingruppen, dargestellt (Tab. 2).

Es fanden sich in der Gruppe der Cholesterin- und Gemischtsteine signifikant höhere Werte für Cholesterin und den CSI als in der Gruppe der Pigmentsteine. Zwischen solitären und multiplen Cholesterin- und Gemischtsteinen fanden sich keine signifikanten Differenzen in den gemessenen Werten.

Es zeigte sich eine deutliche Korrelation des Cholesterins zur COT ($R = -0,39$, $P = 0,007$, Abb. 4). Phospholipide, Gallensäuren, Gesamtlipide und CSI zeigten keine Korrelation zur COT.

Tab. 2

Zusammensetzung der biliären Lipide

	Cholesterin- und Gemischsteine		Pigmentsteine
	Solitäre Steine	Multiple Steine	
Cholesterin (mmol/l)	16,4 ± 12,2*	16,2 ± 8,3*	14,0 ± 7,5
Phospholipide (mmol/l)	34,5 ± 17,0	46,1 ± 18,8	41,6 ± 20,8
Gallensäuren (mmol/l)	106,1 ± 55,0	112,8 ± 46,9	117,9 ± 49,4
Gesamtlipide (g/dl)	8,6 ± 4,2	10,1 ± 3,7	9,5 ± 4,0
CSI	1,60 ± 0,40*	1,35 ± 0,49*	1,17 ± 0,36

* $P < 0,05$ (im Vergleich zur Pigmentsteingruppe)

Abb. 3 Verteilung der einzelnen Galleparameter auf die Gruppen der Pigmentsteine (N = 21) und Cholesterin-/Gemischtsteine (N = 73)

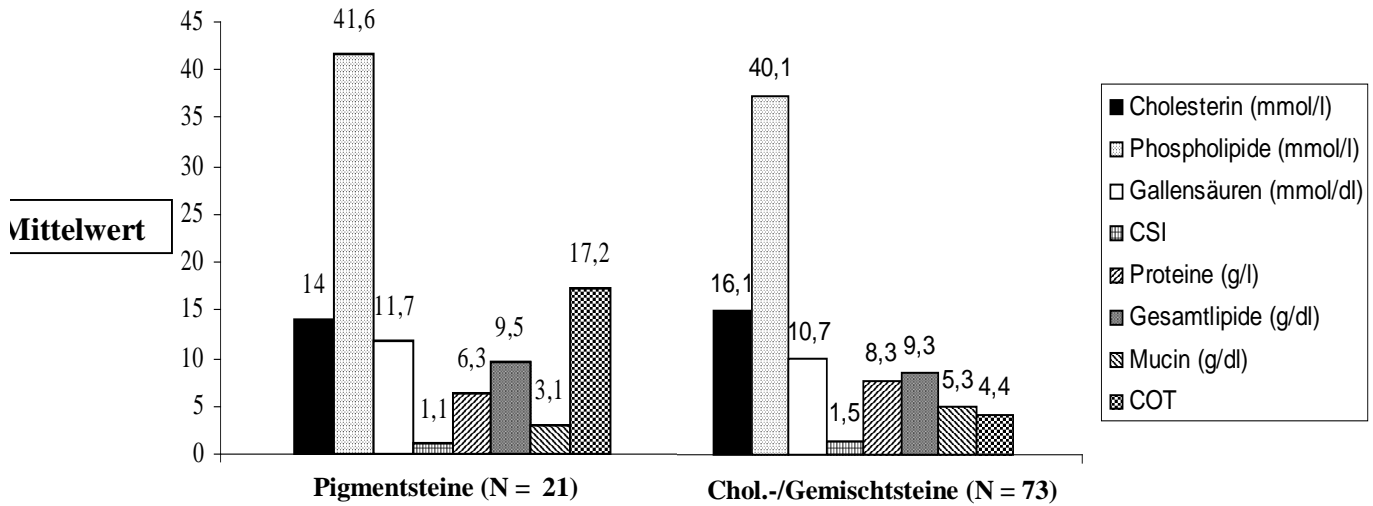
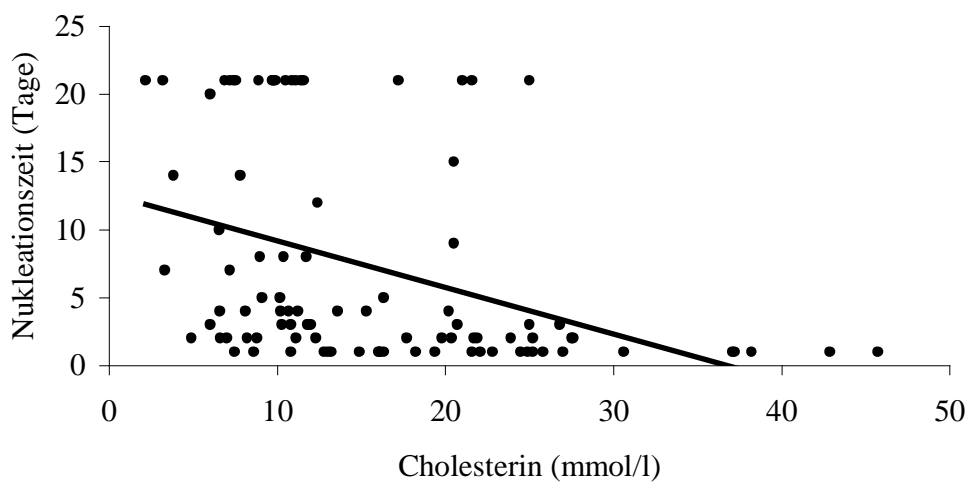


Abb. 4

Korrelation zwischen COT und Cholesteringehalt der Gallenproben (N = 94, R = -0,39, P = 0,007)



17 Muzin-Glykoproteine

17.1 Muzin-Glykoproteine in den verschiedenen Gruppen

Muzin-Glykoproteine wurden in der isotropen Phase von Blasengallen gemessen. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse in den verschiedenen Gruppen (Tab. 3). Die Menge von Muzinen in der Gruppe der Cholesterin-/Gemischtsteine war signifikant höher als in der Gruppe der Pigmentsteine. In der Gruppe der multiplen Steine zeigte sich im Vergleich zur Gruppe der Solitärsteine eine erhöhte Muzinmenge, welche jedoch kein Signifikanzniveau erreichte.

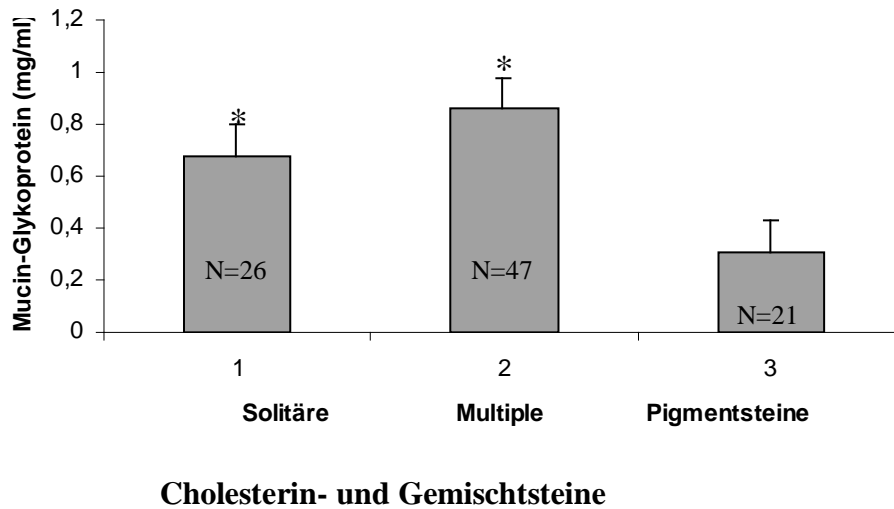
Tab. 3

Muzin-Glykoproteinkonzentration in den verschiedenen Gruppen

	Cholesterin- und Gemischtsteine		Pigmentsteine
	Solitärsteine (N = 26)	Mult. Steine (N = 47)	(N = 21)
Muzin-Glykoprotein (mg/ml)	0,68 ± 0,12*	0,86 ± 0,20*	0,31 ± 0,03

* P < 0,05 (Differenz zur Pigmentsteingruppe)

Abb. 5. Konzentration von Muzin-Glykoprotein in den verschiedenen Gruppen

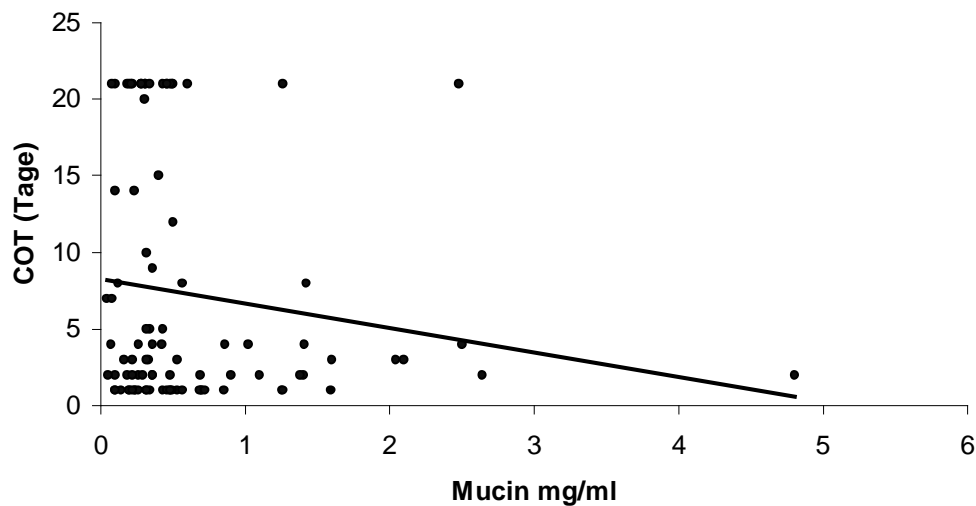


* P < 0,05 zur Gruppe der Pigmentsteine

17.2 Muzin-Glykoproteine und COT

Zwischen der COT aller Patienten ($N = 94$) und der Muzinmenge konnte keine signifikante Korrelation errechnet werden, obgleich sich ein Trend zu einer inversen Korrelation andeutete ($R = -0,12$, Abb. 6). Auch in der Untergruppe der Cholesterin- und Gemischtsteine konnte keine signifikante Korrelation errechnet werden. In dieser Gruppe konnte auch kein Trend zu kürzerer COT bei höherem Muzingehalt errechnet werden.

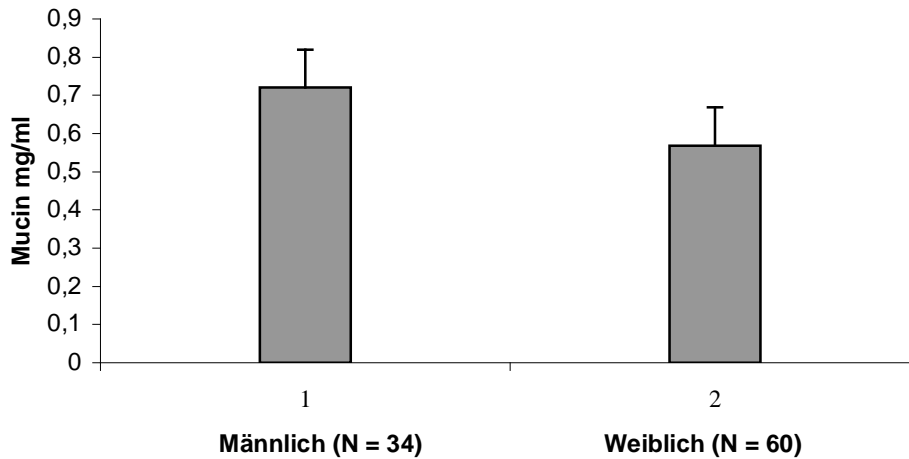
Abb. 6: COT (Tage) korreliert zur Muzinmenge im Gesamtkollektiv ($N = 94$). Nicht-signifikanter Trend zur inversen Korrelation ($R = -0,12$)



17.3 Muzin-Glykoproteine und Geschlechtsverteilung

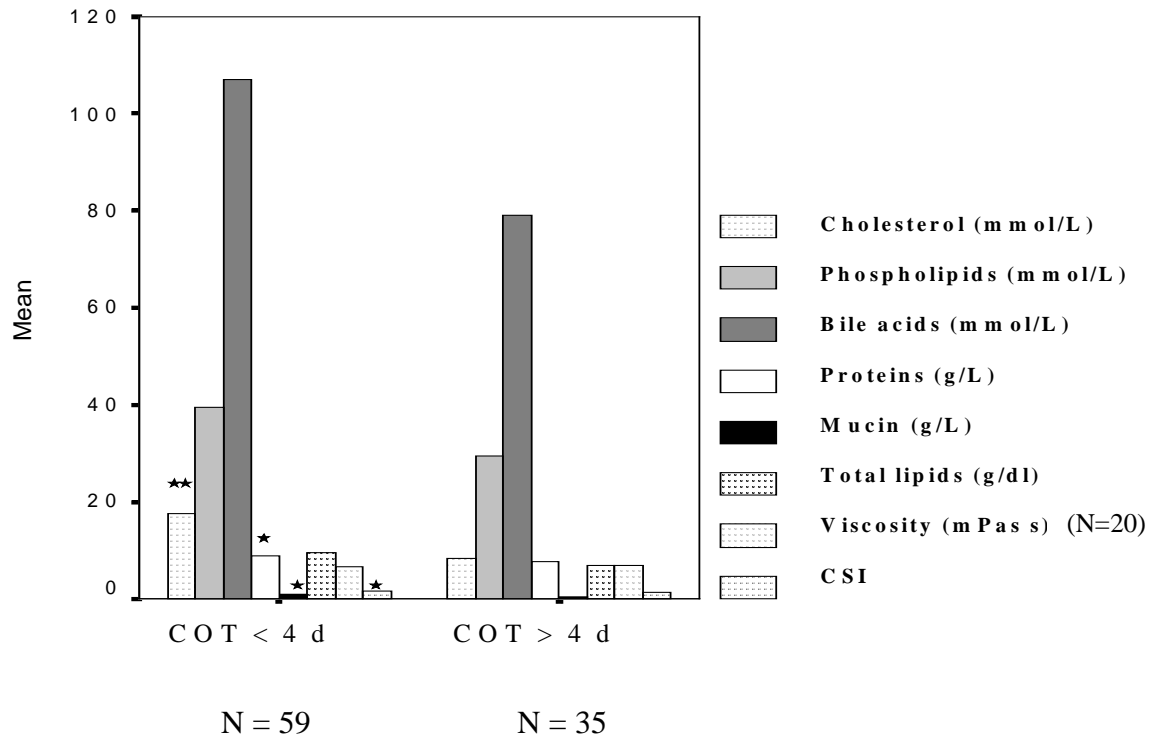
In der Gesamtgruppe der Patienten aufgeteilt nach Geschlecht (Abb. 7) sowie in der Untergruppe der Cholesterin- und Gemischtsteinpatienten konnte keine signifikante Differenz des Muzingehaltes bzgl. des Geschlechtes errechnet werden.

Abb. 7 Konzentration von Muzin-Glykoprotein im Gesamtkollektiv (N = 94), aufgeteilt nach Geschlecht (keine Signifikanz)



18 Aufteilung des Gesamtkollektivs in lang (COT > 4 Tage) und kurz (COT < 4 Tage) nukleierende Gallenproben

Teilte man das gesamte Patientenkollektiv (N = 94) in kurz (COT < 4 Tage, N = 59) und lang (COT ≥ 4 Tage, N = 35) nukleierende Gallen ein, ergab sich folgendes Diagramm (Abb. 8). Es fanden sich signifikante Unterschiede in der Konzentration von Cholesterin und dem CSI ($1,25 \pm 0,69$ gegen $1,49 \pm 0,53$; $P = 0,03$), Proteinen ($6,42 \pm 5,02$ gegen $8,71 \pm 5,14$; $P = 0,01$) und Muzinen ($0,73 \pm 0,1$ mg/ml gegen $0,43 \pm 0,07$ mg/ml, $p < 0,05$). Der stärkste Unterschied fand sich in der Cholesterinkonzentration ($18,51 \pm 7,65$ gegen $10,79 \pm 4,06$, $P = 0,007$). Der Unterschied in der Cholesterinkonzentration hatte eine höhere Signifikanz als der Unterschied zwischen dem CSI der beiden Gruppen und dem Unterschied in der Protein- und Muzinmenge. Keine Unterschiede fanden sich zwischen der Viskosität beider Gruppen, Phospholipiden, Gallensäuren und Gesamtlipiden (Abb. 8).

Abb. 8**Aufteilung des Patientenkollektivs in lang und kurz nukleierende Gallen und Darstellung der gemessenen Galleparameter**

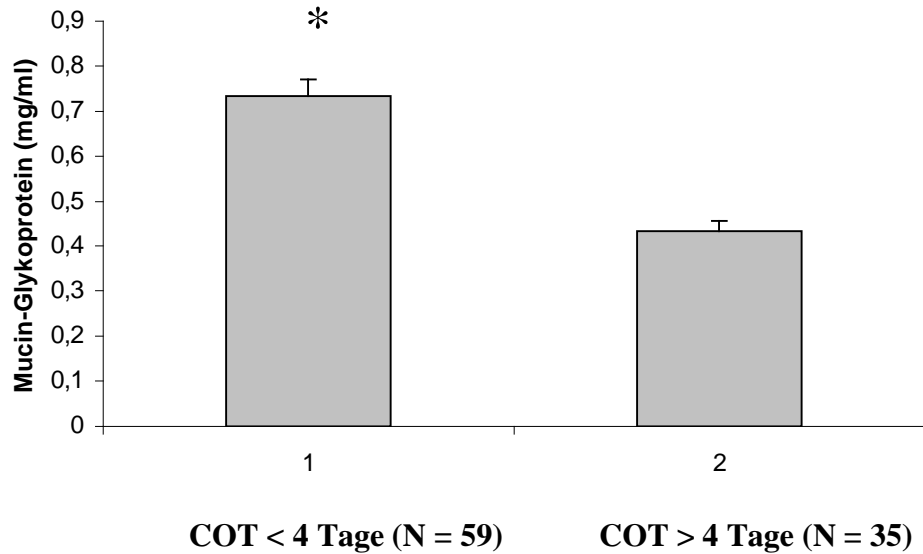
* $P < 0,05$

** $P < 0,005$

18.1 Muzin-Glykoproteine nach Aufteilung des Kollektivs in lang (COT > 4 Tage) und kurz (COT < 4 Tage) nukleierende Gallen

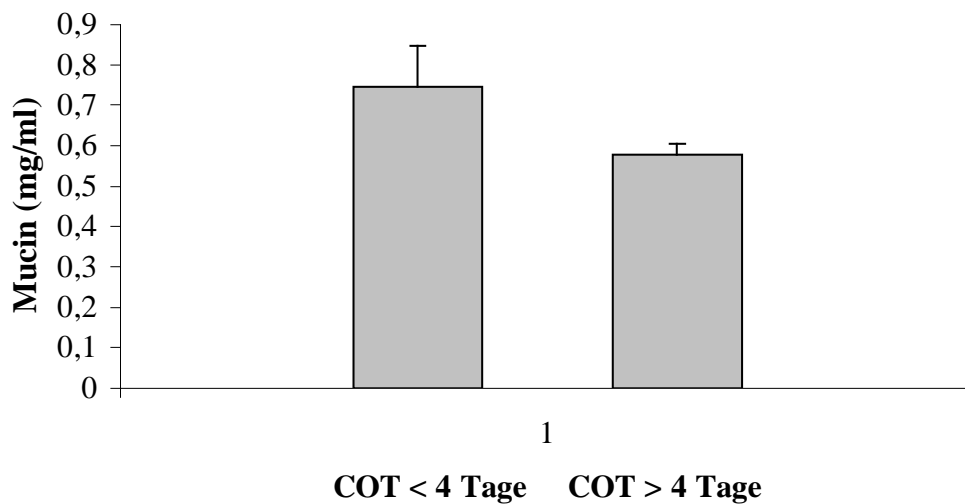
Fokussiert man auf den Muzingehalt in den lang nukleierenden Gallen (COT > 4 Tage) verglichen mit den kurz nukleierenden Gallen (COT < 4 Tage) ergab sich ein signifikanter Unterschied ($0,73 \pm 0,1$ mg/ml gegen $0,43 \pm 0,07$ mg/ml, $p < 0,05$) (Abb. 9). Dieser Unterschied fand sich ebenfalls in der Untergruppe der Patienten mit Cholesterin- und Gemischtsteinen (N = 73), erreichte jedoch keine Signifikanz ($0,74 \pm 0,10$ mg/ml gegen $0,57 \pm 0,15$ mg/ml) (Abb. 10).

Abb. 9 Mucin-Glykoproteinkonzentrationen (Mittelwert \pm SEM) in der isotropen Galle von 94 Patienten, aufgeteilt in lang nukleierende (COT > 4 Tage, N = 35) und kurz nukleierende (COT < 4 Tage, N = 59) Gallen



* P < 0,05

Abb. 10

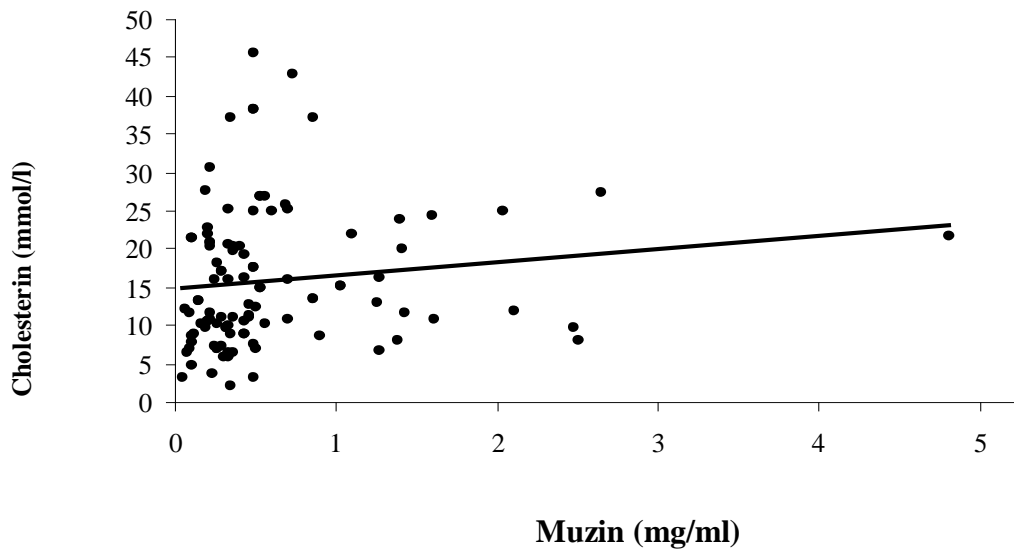


Muzingehalt aufgeteilt in schnell und langsam nukleierende Gallenproben von Patienten mit Cholesterin- und Gemischtsteinen (N = 73, keine Signifikanz)

19 Muzin-Glykoprotein und Korrelation zu den Gallebestandteilen

Die Korrelation vom Gehalt der Muzin-Glykoproteine zu der Menge des Cholesterins in den isotropen Gallenblasen aller Patienten (N = 94) ergab eine signifikante Korrelation (R = 0,262) (Abb. 11).

Abb. 11 Korrelation zwischen Cholesterin und Muzin-Glykoprotein im Gesamtkollektiv der Patienten (N = 94, R = 0,262, P = 0,007)



Eine weitere Korrelation zeigte sich zwischen Muzinen und Proteinen. Alle anderen Parameter zeigten keine Korrelationen zum Muzingehalt (Tab. 4).

Tab. 4 Korrelationskoeffizient (R) zwischen Muzinen und den Gallenbestandteilen/Parametern

	Muzin (mg/ml)		
Cholesterin (mmol/l)	R = 0.26	S	P < 0,007
Phospholipide (mmol/l)	R = 0.15	NS	
Total Protein (g/l)	R = 0.24	S	P < 0,05
Total Lipide (g/dl)	R = 0.15	NS	
Gallensäuren (mmol/l)	R = 0.06	NS	
Viskosität (mPa•s)	R = 0.12	NS	
Crystal observation time	R = -0,12	NS	

(Tage)	
CSI	R = 0,001 NS

S = signifikant

NS= nicht signifikant

20 Additionsversuche

20.1 Addition von bovinem Muzin

Nach der Aufreinigung von Muzinen über eine Sepharose-2B-Gelchromatographie und Lyophilisierung konnte zunächst bovines und später humanes Muzin in Pulverform nach genauem Wiegen in insgesamt 20 Proben (13 w, 7 m) isotroper Galle von Cholesterin- und gemischten Gallensteinpatienten gelöst werden.

Um ein möglichst genaues Abbild der physiologischen Bedingungen zu erhalten, wurden Muzinkonzentrationen von 1 – 4 mg/ml gewählt. Zudem sollte vermieden werden, durch pathophysiologische Konzentration über eine Erhöhung der Viskosität die Ergebnisse zu beeinflussen.

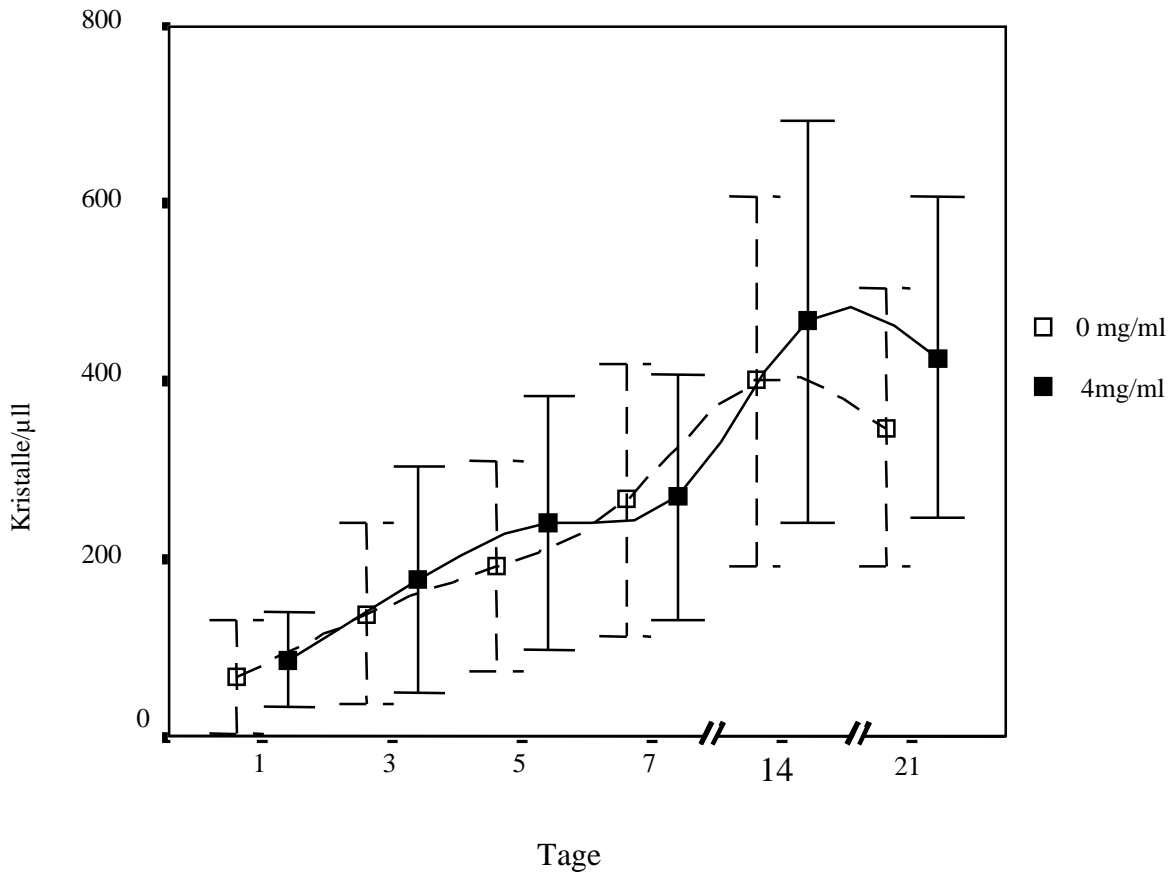
Zunächst wurden 10 Gallenproben (8 w, 2 m) mit unterschiedlichen Konzentrationen von käuflichem, bovinem Muzin versetzt und COT sowie die Kristallzahl über 21 Tage bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 0 (Kontrolle), 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml und 4 mg/ml gewählt. Es zeigten sich hierbei in keiner der Konzentrationen signifikante Erhöhungen der Zahl der neu entstandenen Cholesterinkristalle gegenüber der Kontrollprobe.

Tab. 5 Geschlechtsverteilung, Muzingehalt, COT, Kristallzahl am 7. Tag und Kristallzahl am 7. Tag mit Zusatz von 4 mg/ml bovinem Muzin

Nummer	Geschlecht	Muzin (mg/ml)	COT (Tage)	Kristalle/ μ l am 7. Tag	Kristalle/ μ l am 7. Tag nach Zusatz von 4 mg/ml bovinem Muzin
1	w	0,26	1	503	480
2	w	0,42	4	68	68
3	w	0,04	7	45	91
4	w	0,34	2	571	549
5	w	0,12	6	183	160
6	w	0,56	6	91	114
7	w	0,22	1	594	526
8	w	0,26	2	68	68
9	m	0,32	2	274	366
10	m	0,04	1	200	200

Es fanden sich keine Korrelationen zwischen Muzingehalt und COT, Muzingehalt und Kristallzahl am 7. Tag oder signifikante Unterschiede in der Geschlechtsverteilung und der Muzinmenge. Die Kristallzahl am 7. Tag ohne Muzinzusatz zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kristallzahl am 7. Tag mit Zusatz von 4 mg/ml bovinem Muzin. Eine Verkürzung der COT nach Zusatz von bovinem Muzin konnte in dieser Gruppe von Patienten nicht beobachtet werden.

Abb. 12 Anzahl der neu entstandenen Cholesterinmonohydratkristalle nach Addition von verschiedenen Konzentrationen gereinigtem, käuflichem bovinem Muzin (dargestellt sind die Kontrollgruppe und die höchste Muzinkonzentration von 4 mg/ml)



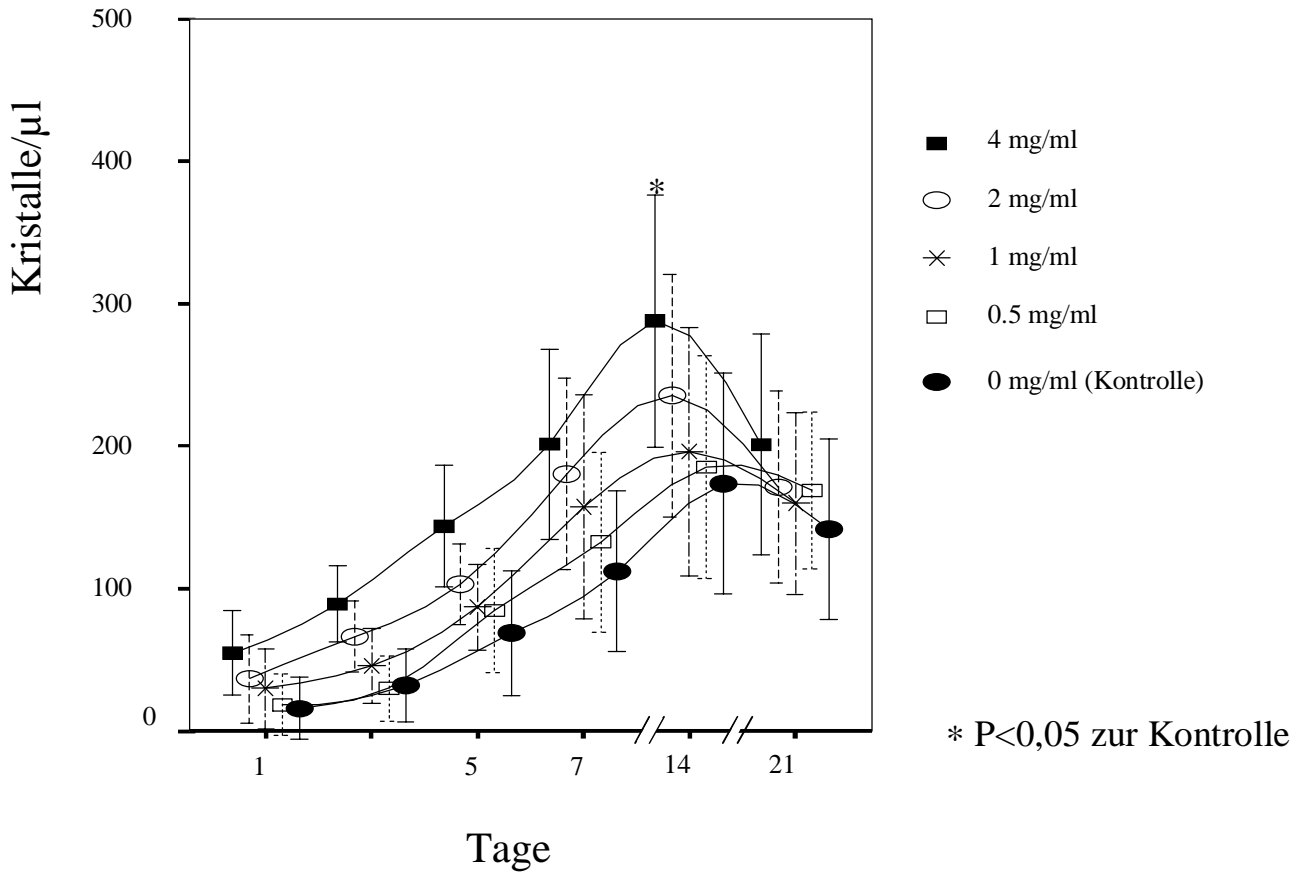
In den Additionsversuchen mit humanem Muzin wurden 10 Gallenproben von Patienten mit Cholesterin- oder gemischten Gallensteinen (5 w, 5 m) mit unterschiedlichen Konzentrationen von aus gepoolter weißer Galle gewonnenem und gereinigtem humanem Muzin-Glykoprotein versetzt und COT sowie die Kristallzahl über 21 Tage bestimmt (Tab.). Es wurden Konzentrationen von 0 (Kontrolle), 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml und 4 mg/ml gewählt. Es zeigte sich ein Trend zu höheren Kristallzahlen mit höheren Muzinmengen (Abb. 13). Dieser Trend erreichte jedoch aufgrund der hochvariablen Fähigkeit der Galleproben, Cholesterinkristalle zu bilden, nur in der Konzentration von 4 mg/ml statistische Signifikanz ($P < 0,05$).

Tab. 6 Charakteristika der mit humanem Muzin versetzten Gallenproben und Kristallzahlen

Nummer	Geschlecht	Muzin (mg/ml)	COT (Tage)	Kristalle/ μ l am 7. Tag	Kristalle/ μ l am 7. Tag nach Zusatz von 4 mg/ml humanem Muzin
1	m	2,48	1	160	206
2	m	0,32	2	137	320
3	m	0,35	1	45	68
4	w	0,32	2	45	137
5	w	0,08	2	23	68
6	w	0,16	3	114	229
7	m	0,36	2	274	320
8	w	0,46	2	68	160
9	w	0,28	1	229	366
10	m	3,18	1	68	137

Es konnten keine Korrelationen zwischen Muzingehalt und COT, Muzingehalt und Kristallzahl am 7. Tag oder signifikante Unterschiede in der Geschlechtsverteilung und der Muzinmenge errechnet werden. Die Kristallzahl am 7. Tag der Zählung ohne Zusatz von Muzinen, verglichen mit der Kristallzahl am 7. Tag nach Zusatz von 4 mg/ml humanem Muzin-Glykoprotein, ergab eine signifikante Differenz ($P < 0,05$). Nach Zusatz von niedrigeren Konzentrationen von Muzin konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kristallzahl bestimmt werden. Es konnte keine Verkürzung der COT nach Zugabe von Muzinen beobachtet werden. Auch in der Geschlechtsverteilung zeigte sich kein Unterschied in der Muzinkonzentration.

Abb. 13 Anzahl der Cholesterinmonohydratkristalle nach Addition von gereinigtem, lipidfreiem humanem Muzin-Glykoprotein in verschiedenen Konzentrationen zu menschlichen Galleproben



20.3 Veränderung der verschiedenen Galle-Parameter nach Muzinzusatz

Um eine eventuelle Veränderung in der Lipidzusammensetzung der Galle nach Zusatz von bovinem und humanem Muzin festzustellen, wurden in allen 20 Proben der Additionsexperimente Cholesterin, Proteine, Phospholipide und Gallensäuren nach dem Zusatz von Muzin nochmalig bestimmt und mit den Werten der Kontrollgruppe ohne Muzinzusatz verglichen. Es fanden sich hierbei keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Proben mit verschiedenen Konzentrationen von zugesetztem Muzin bezüglich Cholesterin, Phospholipiden oder Gallensäuren.

D Diskussion – Interpretation der Ergebnisse

21 Diskussion

21.1 Patientenkollektiv/Proben

Die Anzahl von weiblichen und männlichen Patienten spiegelt das Ergebnis epidemiologischer Studien bezüglich Geschlechtsverteilung der Cholezystolithiasis wider (Barbara L, 1987; GREPCO 1988). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Geschlechtsverteilung zwischen den verschiedenen Gruppen der Pigmentsteine, Cholesterin-/Gemischtsteine oder zwischen den Gruppen der multiplen und solitären Gallensteine.

Die COT in der Gruppe der multiplen Gallensteine war kürzer als in der Gruppe solitärer Gallensteine. Diese Beobachtung erreichte jedoch kein Signifikanzniveau. Dies spiegelt die Ergebnisse älterer Studien wider (Jüngst D, 1992; Van Erpecum K, 1998) und ist ein weiterer Beleg für diesen Zusammenhang.

21.2 Zusammensetzung der Blasengallen

21.2.1 Lipide

In der Gruppe der Cholesterin- und Gemischtsteine fanden sich signifikant höhere Werte für Cholesterin und den CSI gegenüber der Pigmentsteingruppe. Diese Ergebnisse entsprechen älteren Studien (LaMont T, 1983) und waren erwartet. Auch die signifikant kürzeren COT der Cholesterin-/Gemischtsteingruppe gegenüber der Pigmentsteingruppe waren ein erwartetes Ergebnis.

Die signifikant höhere Cholesterinkonzentration in der Gruppe der schnell nukleierenden Blasengallen (COT < 4 Tage) verglichen mit der Gruppe der langsamer nukleierenden Blasengallen (COT > 4 Tage) war ebenfalls ein Ergebnis, welches mit früheren Arbeiten übereinstimmt (Miquel JF, 1998). Die in dieser Arbeit gefundene deutliche Korrelation zwischen COT und Cholesteringehalt der Proben des gesamten Patientenkollektivs ist ein weiterer Beleg für die Cholesterinkonzentration als einen der wichtigsten Faktoren in der Entstehung der Cholezystolithiasis und entspricht ebenfalls Ergebnissen aus älteren Studien (Miquel JF, 1998).

21.2.2 Proteine

Die signifikant erhöhte Proteinmenge in der Gruppe der schnell nukleierenden Blasengallen entspricht früheren Ergebnissen (Gallinger S, 1987), in welchen gezeigt werden konnte, dass die Proteinkonzentration in Cholesterinsteingallen im Vergleich zu Kontrollgruppen höher liegt. Ferner scheint eine gesteigerte Proteinkonzentration mit dem Auftreten von Cholesterinkristallen assoziiert zu sein (Jüngst D, 1991). Diese Beobachtung war einer der Auslöser für die Suche nach pronukleatorischen Proteinen in Blasengallen von Gallensteinpatienten. Eine eindeutige Korrelation zwischen der COT und der Proteinmenge konnte in unserer Arbeit jedoch nicht gefunden werden. Dies steht im Kontrast zu älteren Arbeiten. Wodurch die Proteinerhöhung bei Gallensteinpatienten zustande kommt, ist aktuell nicht geklärt. Eine Hypothese hierzu ist jedoch, dass häufige Entzündungen der Gallenblasenwand bei Cholesterinsteinpatienten zu finden sind (Conter RL, 1992). Dies könnte zu einer Erhöhung der mukosalen Permeabilität des Gallenblasenepithels mit einer entsprechend erhöhten Freisetzung von Serumproteinen führen, wie es in mukosalen Zellen des Intestinaltraktes unter cytotoxischer Aktivität von entzündlichen, aktivierten Zellen beschrieben wurde (Von Ritter C, 1993). Es ist denkbar, dass auf diese Weise eine höhere Proteinmenge in die Gallenblase gelangen könnte und dass diese anschließend die Cholesterinkristallbildung begünstigt.

21.2.3 CSI

Ein signifikant höherer CSI zeigte sich sowohl in der Gruppe der Cholesterin-/Gemischtsteine gegenüber der Gruppe der Pigmentsteine ($P < 0,05$) als auch in der Gruppe der schnell nukleierenden ($COT < 4$ Tage) gegenüber der langsam nukleierenden ($COT > 4$ Tage) Gallenproben ($P < 0,05$). Diese Ergebnisse entsprechen früheren Studien und waren erwartet (Miquel JF, 1998).

21.2.4 Viskosität

Obgleich die Viskosität der Gallenproben in der Gruppe der Cholesterin-/Gemischtsteine höher lag als in der Gruppe der Pigmentsteine und weiterhin in der Gruppe der schnell nukleierenden Gallenproben höher lag als in der Gruppe der langsam nukleierenden Gallenproben, erreichten diese Werte keine Signifikanz. Auch zeigten sich im Kontrast zu einer älteren Arbeit unserer Gruppe (Jüngst D, 2001) keine eindeutigen Korrelationen der Viskosität zu den anderen gemessenen Galleparametern. Da es zur Bestimmung der Viskosität einer bestimmten Menge von Gallenflüssigkeit bedarf (min. 1 ml) und diese Bestimmung an den Schluss aller

Untersuchungen gestellt wurde, wurde die Viskosität insgesamt nur in 20 Proben gemessen. Die Diskrepanz der Ergebnisse zu früheren Studien könnte durch die kleine Fallzahl der Untersuchung bedingt sein.

21.3 Muzin-Glykoproteine

21.3.1 Muzine in Gallensteingruppen

Die Muzinmenge lag in der Gruppe der Cholesterin-/Gemischtsteine signifikant höher als in der Gruppe der Pigmentsteine. Dieses Ergebnis entspricht älteren Studien (Miquel JF, 1998). Zusätzlich zeigte sich eine Differenz in der Muzinmenge zwischen der Gruppe der solitären und der Gruppe der multiplen Cholesterin- und Gemischtsteine. Diese Differenz erreichte jedoch keine Signifikanz. In früheren Studien wurden hierzu widersprüchliche Ergebnisse beobachtet (Jüngst D, 1992; Juvonen T, 1994; Wolpers C, 1993).

21.3.2 Muzine und Geschlechtsverteilung

Eine deutliche geschlechtsspezifische Verteilung der Muzinmenge konnte weder im Gesamtkollektiv, noch in den einzelnen Untergruppen oder in den Additionsexperimenten gefunden werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Muzine nicht das entscheidende Trennungsmerkmal zwischen männlichen und weiblichen Gallensteinpatienten darstellen. Die höhere Prävalenz der Cholezystolithiasis (GREPCO, 1988; Braveman DZ, 1980; Maringhini A, 1987) kann mit den Daten dieser Studie nicht durch eine höhere Konzentration von Muzinen bei weiblichen Patienten erklärt werden.

21.3.3 Muzine und COT

Auffallend war, dass sich zwar ein Trend zur inversen Korrelation, aber keine signifikante Korrelation zwischen der COT und dem Muzingehalt der einzelnen Proben im Gesamtkollektiv aller Patienten (N = 94) fand. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu früheren Studien, in welchen signifikante inverse Korrelationen zwischen COT und Muzinen beschrieben wurden (Gallinger S, 1985; Afdhal NH, 1993, a). Eine Interpretation könnte sein, dass erst ab einer bestimmten, kritischen Muzinmenge eine Verkürzung der COT zustande kommt. Diese Muzinmenge liegt eventuell höher und kann nur in bestimmten Kompartimenten der Gallenblase (am Epithel oder im Fundus der Gallenblase als Sludge) erreicht werden. In der Blasengalle gelöstes Muzin scheint keine, zumindest keine lineare Korrelation zur COT aufzuweisen.

Nach Aufteilung des gesamten Patientenkollektivs in lang nukleierende Gallen (COT > 4 Tage) und kurz nukleierende Gallen (COT < 4 Tage) fand sich jedoch eine deutliche und signifikante Differenz in der Menge der Muzine ($0,73 \text{ mg/ml} \pm 0,1$ gegen $0,43 \text{ mg/ml} \pm 0,07$; $P < 0,05$).

Dieses Ergebnis entspricht früheren Studien (Miquel JF, 1998).

Eine Interpretationsmöglichkeit ist hierbei zum einen eine pronukleatorische Wirkung von Muzinen und damit eine verkürzte COT bei erhöhter Muzinmenge. Zum anderen ist aber auch die Cholesterinkonzentration in der Gruppe der schneller nukleierenden Gallen signifikant erhöht, so dass eine durch die Cholesterinübersättigung oder andere unbekannte Faktoren ausgelöste – sekundäre – Muzinhypersekretion in Galle von Patienten mit Gallensteinen ebenso postuliert werden kann. Durch eine Cholesterinübersättigung der Blasengalle ausgelöste Muzin-Hypersekretionen sind hierbei in der Literatur zumindest im Tiermodell beschrieben (Afdhal NH, 1993, b). Die verkürzte COT in der Gruppe der schnell nukleierenden Gallen könnte hierbei alleinig durch die in dieser Gruppe ebenfalls erhöhte Cholesterinkonzentration bedingt sein. Die erhöhte Muzinmenge in dieser Gruppe wäre dann ein sekundärer Effekt, ein Versuch des Organismus, das Gallenblasenepithel vor toxischen Effekten der Cholesterinübersättigung zu schützen.

Es konnte weiterhin keine Verkürzung der COT bei den Additionsversuchen, weder nach Zugabe von bovinem noch nach Zugabe von humanem Muzin, gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu früheren Studien (Gallinger S, 1985). Da fast alle Gallenproben bei diesen Experimenten sehr kurze Nukleationszeiten aufwiesen, war eine Differenzierung über den Parameter der COT jedoch kaum möglich, da nur einmal pro 24 Stunden jede Probe untersucht wurde. Eine Analyse in kürzeren Zeitintervallen hätte eventuell eine Differenz der COT zwischen den verschiedenen Proben mit verschiedenen Muzinkonzentrationen ergeben.

In diesem Kontext ist die Definition der COT ein kritischer Punkt. Dieser Parameter wurde etabliert, um die Lithogenität von Galle besser bestimmen zu können, nachdem klar wurde, dass auch Patienten ohne Gallensteine eine cholesterinübersättigte Galle haben können. Es sollte ein Parameter geschaffen werden, welcher die Nukleationsfähigkeit von Galle unabhängig von der Cholesterinsättigung beschreibt. Der genaue Zeitpunkt der Nukleation ist experimentell jedoch kaum ermittelbar, so dass es sich nur um eine semi-qualitative Methode handelt. Weiterhin ignoriert die alleinige Bestimmung der COT die Tatsache, dass einige Patienten mit Cholesterin oder gemischten Gallensteinen *in vitro* eine COT über 21 Tage besitzen bzw. überhaupt nicht kristallisieren. Deshalb wurde neben anderen Verfahren die simple Zählung der Kristalle als ein sensitiveres Verfahren zur Unterscheidung von verschiedenen Gallen etabliert. Diese Methode

wurde auch in dieser Studie eingesetzt. Die Mengen von entweder bovinem oder humanem Muzin, welche zu lithogener Galle zugesetzt wurden (0,5 – 4 mg/ml), sind höhere Mengen als sich Muzin in der wässrigen Phase von Blasengalle findet (Lee SP, 1988) und deshalb supraphysiologisch genannt. Diese Mengen waren jedoch niedriger als 10 mg/ml, um die bekannte Veränderung der Galle bezüglich der Viskosität (Jüngst D, 2001) und eine hierdurch bedingte Beeinflussung des Nukleationsprozesses zu vermeiden.

21.3.4 Korrelation der Muzin-Glykoproteine zu den anderen gemessenen Gallebestandteilen und zur Zahl der Cholesterinkristalle

Nach der Korrelation der verschiedenen gemessenen Galleparameter mit Muzin-Glykoprotein ergab sich erstaunlicherweise eine deutliche Korrelation zu Cholesterin. ($R = 0,26$). Obgleich diese Korrelation zumindest mitbestimmt sein kann durch einige Ausreißer, könnte dies ein weiterer Beleg für die Assoziation von Muzinen und Cholesterin darstellen. So konnte in früheren Arbeiten in Kunstgallen gezeigt werden, dass sich sowohl Phospholipide als auch Cholesterin an gereinigtes, menschliches Blasengallenmuzin binden können. In mit Cholesterin übersättigten Blasengallen fanden sich zudem bedeutend mehr Cholesterin-Muzin-Bindungen als Phospholipid-Muzin-Bindungen (Smith BF, 1983). Diese Daten deuteten darauf hin, dass nicht-mizelläres Cholesterin in übersättigter Galle vorzüglich Blasengallenmuzin bindet und dadurch die Cholesterinkristallbildung fördern könnte. Die Bindungstypen von Muzinen an Lipide wurden in älteren Studien zum größten Teil als nicht kovalent, zum Teil aber auch als kovalente Bindungen beschrieben (Slomiany A, 1984). Beide Lipidbindungstypen scheinen die physikochemischen Eigenschaften von Muzinen, insbesondere die Viskosität und Permeabilität (Sarosiak J, 1984) zu beeinflussen. Weiterhin könnten sie eine Rolle spielen zum Schutz der Mukus-Glykoproteine gegen die Proteolyse (Slomiany A, 1984). Weiterhin ist in diesem Kontext zu erwähnen, dass im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass zumindest ein Stimulus für die Muzin-Hypersekretion eine Cholesterinübersättigung der Blasengalle ist (Afdhal NH, 1993, b). Korrelationen von Muzinen zu Phospholipiden oder Gallensäuren konnten in unserer Arbeit nicht errechnet werden. Wobei ältere Arbeiten zeigten, dass im Tiermodell auch Gallensäuren eine Muzinhypersekretion auslösen können (Klinkspoor JH, 1998).

21.3.5 Additionsversuche

Nach der Addition von gereinigtem bovinem und humanem Muzin zu jeweils 20 Galleproben von Cholesterin- oder Gemischtsteinpatienten wurde täglich die Kristallzahl bestimmt. Durch diese Methode können genauere Aussagen über die Nukleation von Gallenproben getroffen

werden als mit der alleinigen Bestimmung der COT. Hierbei fanden sich keine Korrelationen zwischen dem ursprünglichen Muzingehalt (vor Addition) und der Kristallzahl nach 7 Tagen. Weder die Addition von bovinem noch von humanem Muzin konnte die Nukleationszeit verkürzen. Die Addition von bovinem Muzin zeigte auch in der höchsten zugefügten Konzentration von 4 mg/ml keine Erhöhung der Kristallzahl. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu älteren Arbeiten in Modellgalle (Lee, TJ, 1989). Nach Zusatz von gereinigtem, lipidfreiem humanem Muzin zeigte sich ein Trend zu höheren Kristallzahlen mit steigender Konzentration des zugesetzten Muzins. In der höchsten Konzentration von 4 mg/ml erreichte dieser Trend Signifikanzniveau. Dieses Ergebnis bestätigt die einzige in menschlicher Galle durchgeführte Studie von Gallinger und Mitarbeitern (Gallinger S, 1985).

Zieht man in Betracht, dass im Sludge oder im Bereich des Gallenblasenfundus weitaus höhere Muzinkonzentrationen (30 – 37 mg/ml) vorliegen können (De la Porte L, 2000; Lee SP, 1988), ist hier eine pronukleatorische Aktivität von Muzinen wahrscheinlich.

Die Kristallzahl nach 7 Tagen wurde in den Experimenten dieser Studie gewählt, da Galle nicht länger in der Gallenblase verweilt als im Durchschnitt 7 Tage. Hierbei ist es auffallend, dass immer wieder auch Galleproben von Patienten mit Gallensteinen gefunden werden, welche auch nach 21 Tagen keine Cholesterinkristalle gebildet haben. Hypomotilität und Stase der Galle können jedoch zu verlängerten Verweilzeiten der Galle in der Gallenblase führen (Stolk MFJ, 1995).

E Diskussion – Zusammenfassung und Interpretation

Muzin-Glykoproteine sind Substanzen, welche das Gallenblasenepithelium vor einer Vielzahl von in der Galleflüssigkeit enthaltenen, potentiell zerstörerischen und zytotoxischen Substanzen, wie zum Beispiel Gallensäuren, Lysophospholipiden und Sauerstoffradikalen schützen müssen. Dies ist mit höchster Wahrscheinlichkeit ihre physiologische Hauptaufgabe (LaMont JT, 1992, b). Es gibt jedoch eine Vielzahl von Hinweisen, dass Muzine zusätzlich zur protektiven Funktion in der Gallenblase eine Hauptrolle in der Pathogenese der Cholezystolithiasis spielen. Es gilt heute als gesichert, dass die Entwicklung von Gallensteinen multifaktoriell bedingt ist (Carey MC, 1992, b) und zum Ersten durch eine hepatische Sekretion von cholesterinübersättigter Galle, zum Zweiten durch eine beschleunigte Nukleation von Cholesterin zu Cholesterinmonohydratkristallen und zum Dritten durch eine eingeschränkte Motilität der Gallenblase mit folgender Stase, welche die Anlagerung von Kristallen und das Steinwachstum begünstigt, bedingt ist.

Blasengalle von Patienten mit Cholesterinsteinen enthält häufig biliären Sludge, eine Suspension von Cholesterinmonohydratkristallen oder Kalziumbilirubin-Granula eingelagert in Mukus, einer Mischung von Muzin und Proteinen (Carey MC, 1988; Lee SP, 1986). Muzin-Hypersekretion und Muzin-Akkumulation in der Gallenblase in Form eines visko-elastischen Gels gehen der Bildung von Gallensteinen in Tier- und Menschenstudien voraus (Lee SP, 1981, b; Harvey PRC, 1986; Hulten O, 1968; Womack NA, 1963). Einige Studien haben gezeigt, dass die initiale Nukleation von Cholesterin im Mukus der Gallenblase stattfindet (Lee SP, 1981, b; Hulten O, 1968; Womack NA, 1963).

Ogleich Muzine als ein wichtiger pronukleatorischer Faktor in Studien in Modellgalle gefunden wurden, ist die Situation in menschlicher Galle weniger eindeutig (Levy PF, 1984; Gallinger S, 1985; Afdhal NH, 1993, a; Smith BF, 1990). Die Nukleation von Cholesterin durch Muzine scheint durch die hydrophoben Bindungsorte des nicht-glykosilierten Anteil des Proteinkerns ausgelöst zu werden, da gezeigt werden konnte, dass proteolytische Enzyme die Lipidbindung sowie die pronukleatorischen Eigenschaften der Muzine verhindern können (Afdhal NH, 1995; Smith BF, 1984). Immunofluoreszenzstudien von biliärem Sediment mit spezifischen Antikörpern gegen Muzin-Glykoproteine haben gezeigt, dass Cholesterinkristalle lose zu Muzin assoziiert sind und dass Cluster von Cholesterol-Phospholipid-Vesikeln in eine Muzinmatrix eingelagert sind (De la Porte L, 2000). Diese letzten Ergebnisse entsprechen Studien in Modellgalle, in welchen Interaktionen zwischen Muzinen und Vesikeln elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten (Afdhal NH, 1995).

Unsere Untersuchungen in einer vergleichsweise großen Gruppe von Gallensteinpatienten zeigen signifikant höhere Mengen von in der Blasengalle gelösten Muzinen in Blasengalle von Cholesterin- und Gemischtsteinpatienten verglichen mit Pigmentsteinpatienten.

Die Mediatoren oder intrazellulären Signalwege, welche zu einer erhöhten Muzinsekretion führen, bleiben unklar; es wurden jedoch einige potentielle Mechanismen diskutiert. Am Präriehund konnte gezeigt werden, dass die durch eine cholesterinreiche Diät ausgelöste Muzin-Hypersekretion durch eine Ligatur des Ductus cystikus verhindert werden konnte (Lee SP, 1981, a). Hieraus kann gefolgert werden, dass der Stimulus für die Muzin-Hypersekretion in die Blasengalle aus der Lebergalle transportiert wird. Ob hierbei die Cholesterinübersättigung der Galle der Stimulus ist, oder ob andere Substanzen, welche durch die Leber in die Galle ausgeschieden werden, hierfür verantwortlich sind, bleibt unklar. Die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen Muzinen und Cholesterin kann die Hypothese erhärten, dass die Cholesterinübersättigung der Galle ein Stimulus für die Hypersekretion von Muzinen sein kann. Cholesterin könnte hierbei eine lokale Entzündungsreaktion am Gallenblasenepithel auslösen. Die Toxizität von cholesterinübersättigter Galle am Gallenblasenepithel wurde in einer früheren Studie nachgewiesen (Van den Berg A, 2000). Die Relevanz der von uns gefundenen Korrelation, welche mitbedingt ist durch einige Ausreißer, bleibt jedoch unsicher. Zusätzlich ist der Korrelationskoeffizient eher niedrig und es ist schwierig, weitere Schlussfolgerungen aus diesem Ergebnis zu ziehen.

Weiterhin könnte man aus einer anderen Perspektive argumentieren, dass die (evtl. durch Cholesterinübersättigung ausgelöste) Muzin-Hypersekretion einen Schutzversuch der Gallenblase darstellt, um Cholesterineinlagerungen in die Membranen des Gallenblasenepithels und konsekutive Schädigungen (z. B. Hypomotilität) zu verhindern. Es kann spekuliert werden, dass es sich hierbei um den Versuch des Organismus handelt, eine größere Menge Muzin im Sinne eines Transportermoleküls für vermehrt anfallende Cholesterinkristalle bereitzustellen. Eingebettet in eine Matrix aus Muzin (z. B. im Sludge im Gallenblasenfundus) ließe sich so durch Gallenblasenkontraktionen eine weit höhere Menge von Cholesterinkristallen eliminieren als ohne zusätzliche Mukusbildung. Zusätzlich könnten allenfalls vorhandene Mikroorganismen – entsprechend den physiologischen Prozessen im Lungenepithel – an Muzine gebunden und durch Kontraktionen der Gallenblase ausgeschieden werden. Muzin hätte in diesem Kontext betrachtet zusätzlich zur epithelprotektiven Wirkung eine wichtige Funktion als Transportmolekül. Im Bereich physiologischer Muzinkonzentrationen oder auch bei nur kurzzeitigem Auftreten von pathophysiologischen Konzentrationen könnten Muzine dann die Entwicklung der Cholezystolithiasis verhindern. Wird jedoch die Kapazität dieses Transporters überstiegen, z. B. bei weiter andauernder Cholesterinübersättigung oder/und zusätzlich auftretender Hypomotilität und

Stase in der Gallenblase, überwiegen die pronukleatorischen Effekte der Muzine und es kommt zur Bildung von Gallensteinen. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass auch kleinere Konkrementen bei funktionierender Gallenblase eliminiert werden können und hierdurch wiederum vom Organismus überschüssiges Cholesterin abgegeben werden kann. Das in dieser Studie gefundene Ergebnis einer erhöhten Cholesterinkonzentration als wichtigstem unterscheidendem Parameter zwischen schnell ($COT < 4$ Tage) und langsam ($COT > 4$ Tage) nukleierenden Gallen sowie einer deutlichen Korrelation zwischen COT und der Cholesterinkonzentration entspricht dem Ergebnis einer großen Studie von Miquel et al. (Miquel JF, 1998) und kann als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass die Cholesterinkonzentration in der Galle einen der wichtigsten Faktoren in der Entstehung der Cholezystolithiasis darstellt. Auch eine Arbeit, die zeigte, dass durch die Therapie mit Ursodeoxycholsäure (UDCA) eine Verminderung der Cholesterinkonzentration und der Muzinmenge erreicht werden konnte (Fischer S, 2004), kann diese Hypothese erhärten. Weiterhin konnte in einer neueren Studie der Effekt einer Langzeitgabe von UDCA auf den Expressionsgrad von niedrigmolekularer sekretorischer Phospholipase A2 (PLA2) und Muzingenen in der Gallenblase bei Patienten mit Cholesterinsteinen untersucht werden (Kano M, 1998). In der Blasengalle war hierbei die Konzentration von PLA2-IIA deutlich vermindert in der Gruppe der mit UDCA behandelten Patienten. Auch die Konzentration von Proteinen, Muzinen und freien Fettsäuren war vermindert. Die Autoren dieser Studie interpretieren diese Veränderungen im Sinne einer Verringerung der Entzündung in der Gallenblasenmucosa. Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Cholesterinübersättigung der Galle zur Entzündungsreaktion, erhöhter Proteinsekretion und Muzin-Hypersekretion führen kann.

Eine durch die Cholesterinübersättigung oder andere Faktoren ausgelöste Muzin-Hypersekretion und hieraus resultierende Pronukleation wäre dann der Versuch des Organismus, durch die Umwandlung von gelöstem in kristallförmiges Cholesterin (oder sogar in Form von kleinen Konkrementen) einen verbesserten Transport von Cholesterin aus der Gallenblase zu erwirken und somit eine Reduktion der Gesamtcholesterinmenge des Organismus zu erzielen. Die in Gallensteinpatienten gemessenen höheren Muzinmengen sowie die höheren Muzinmengen in schneller nukleierenden Blasengallen (Miquel JF, 1998), die auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnten, und die beschleunigten Nukleationszeiten durch Muzine wären dann Epieffekte und der Versuch des Organismus, mehr Cholesterin auszuschcheiden. Obgleich die Interpretation unserer Studienergebnisse diese Hypothese stützen kann, bleibt sie Spekulation und bedarf genauerer Klärung durch weitere Studien.

In unserer Studie fand sich eine signifikante Konzentrationsdifferenz von Muzinen zwischen der Gruppe der schnell nukleierenden Blasengalle und der Gruppe der langsam nukleierenden Blasengallen des Gesamtkollektivs, jedoch keine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Nukleation und der Muzinmenge sowie keine Korrelation zwischen der Muzinmenge und der Kristallzahl in 20 Patienten mit Cholesterin- und Gemischtsteinen. Deshalb kann in dieser Arbeit postuliert werden, dass die Muzine in physiologischen Konzentrationen die Geschwindigkeit der Cholesterinkristallisation nicht beeinflussen. Zusätzlich konnten in den Additionsexperimenten mit gereinigtem bovinem Muzin bis zu einer Konzentration von 4 mg/ml kein Einfluss auf die Anzahl der Kristalle bis zu einer Untersuchungszeit von 21 Tagen gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Daten aus Versuchen mit Modellgalle, welche zeigten, dass bovines Gallenblasenmucin die Nukleation von Cholesterinkristallen aus Cholesterin transportierenden Vesikeln beschleunigt und das Wachstum von Kristallen beschleunigt (Afdhal NH, 1993, a; Lee, TJ, 1998). Die Versuche in menschlicher Blasengalle mit menschlichem Muzin, welches aus weißer Galle isoliert wurde, konnten jedoch frühere Ergebnisse in Modellgallen bestätigen, welche einen dosisabhängigen pronukleatorischen Effekt gezeigt hatten (Levy PF, 1984; Smith BF, 1990). Es ergibt sich der Eindruck, dass die Kristallisation von Cholesterin in Modellgalle leichter ausgelöst werden kann als in menschlicher Galle. Außer in einer Studie von Gallinger et al. (Gallinger S, 1985), in welcher erhitzte menschliche Galle als das Effektorsystem benutzt wurde, zogen alle anderen Untersucher Modellgallen vor, um die Effekte verschiedener Muzinarten und die Cholesterinnukleation zu untersuchen. Aus unserer Sicht ist der Einsatz menschlicher Galle ein der Physiologie besser angenäherter Versuch und sollte in folgenden Studien der Verwendung von Modellgallen vorgezogen werden.

Humanes Muzin wurde aus so genannter weißer Galle gewonnen. Es ist bekannt, dass die Obstruktion des Ductus cysticus zu einer deutlichen Erhöhung der Muzinsekretion am Gallenblasenepithel führt. Die Muzinkonzentration kann hierbei bis auf das 10fache ansteigen, weswegen wir diese Gallenproben zur Muzingewinnung für die Additionsexperimente nutzten. Alle Experimente wurden mit derselben gepoolten Muzinpräparation von verschiedenen weißen Gallen durchgeführt. Dies lässt keine Aussage darüber zu, ob diese Muzine sich von Muzinen in normaler Blasengalle unterscheiden, die Vorbereitung über die Sepharose-2B-Säule versichert jedoch, dass unser isoliertes Muzin keine Glykoproteine mit niedrigerem Molekulargewicht enthält. Deshalb lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Ergebnisse der Additionsversuche gültig sind für Muzine, welche aus weißer Galle isoliert wurden, und sie können daher nicht notwendigerweise auf die Eigenschaften von gelöstem Muzin in normalen Gallen übertragen werden.

Die Muzinkonzentration, welche in den Additionsexperimenten erreicht wurde, deckt die gesamte physiologische Spannweite von Muzinkonzentrationen ab, welche in Blasengallen gemessen wurde. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Änderungen in der Muzinkonzentration die frühen Stadien der Gallensteinentstehung beeinflussen.

In dieser Arbeit konnten keine Geschlechtsunterschiede betreffend der Muzinkonzentration in der COT oder der Kristallzahl am 7. Tag der Zählung ohne und mit Zusatz von Muzinen gezeigt werden.

Weiterhin jedoch scheinen Muzine eine wichtige Rolle in späteren Stadien der Entwicklung der Cholezystolithiasis z. B. bei der Anlagerung von Cholesterinkristallen in der Gelphase des Gallenblasenepithels zu spielen. In einer früheren Studie unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass eine beschleunigte COT der einzige Parameter in Blasengalle war, welcher die Wiederkehr von Cholesteinen nach laparoskopischer Cholezystektomie vorhersagen konnte (Jüngst D, 1997). Unsere Arbeit zeigt, dass lösliches Muzin in der Blasengalle ein pronukleatorischer Faktor zu sein scheint und somit für die deutliche Differenz der COT zwischen Blasengallen von Patienten mit Cholesterin- und gemischten Gallensteinen und Blasengallen von Patienten mit Pigmentsteinen mitverantwortlich ist. Hierzu werden jedoch mehr Studien benötigt, um weitere Pronukleatoren in Blasengallen ausfindig zu machen wie zum Beispiel eine neuere Arbeit, in welcher das „carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM) als ein 85 kDa pronaseresistentes Glykoprotein identifiziert wurde, welches die Bildung von Protein-Lipid-Komplexen niedriger Dichte beschleunigt (Jirsa M, 2001).

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit einen dosisabhängigen Effekt von humanem Muzin, jedoch nicht von bovinem Muzin auf die Kristallisation von Cholesterin in Blasengalle von Patienten mit Cholesteinen zeigt. Zusätzlich konnten Ergebnisse aus früheren Arbeiten wie z. B. ein erhöhter Muzingehalt in Patienten mit kürzeren Nukleationszeiten, verglichen mit Patienten mit längeren Nukleationszeiten, oder ein erhöhter Muzingehalt in Patienten mit Cholesterin oder gemischten Gallensteinen, verglichen mit Patienten mit Pigmentsteinen, bestätigt werden.

Eine Korrelation zwischen der Nukleationszeit aller Patienten sowie dem Muzingehalt konnte jedoch nicht gefunden werden. Es fanden sich ebenfalls keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Muzinkonzentration.

Eine Korrelation zwischen dem Cholesteringehalt und dem Muzingehalt des gesamten Patientenkollektivs wurde ebenfalls gefunden, könnte jedoch auch auf einigen Ausreißern beruhen

und wies einen niedrigen Korrelationskoeffizienten auf, so dass eine Schlussfolgerung aus diesem Ergebnis nur vorsichtig gezogen werden sollte.

Unabhängig von Muzinen konnte in dieser Arbeit eine deutliche Korrelation zwischen Cholesterinkonzentration und COT nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht älteren Studien und ist ein erneutes Indiz für den Cholesteringehalt als wahrscheinlich wichtigsten Faktor in der Entstehung der Cholezystolithiasis.

Unsere Daten zeigen im Gegensatz zu älteren Studien, die vor allem in Modellgalle durchgeführt wurden, keine starken pronukleatorischen Effekte von Muzinen in menschlicher Blasengalle. Eine Rolle der Muzine als „Nidus“ für die Cholesterinkristallisation vor allem in Kompartimenten, in denen höhere Muzinkonzentrationen (> 4 mg/ml) auftreten (Gallenblasenfundus und am Gallenblasenepithel), oder als „Klebesubstanz“, welche die Akkumulation der Cholesterinkristalle erleichtert, scheint jedoch wahrscheinlich.

Auch eine Wirkung von Muzinen im Sinne von „Epiphänomenen“, z. B. der Erhöhung der Viskosität, kann die Entstehung von Gallensteinen begünstigen.

Die beobachtete Korrelation zwischen gelöstem Muzin und Cholesteringehalt könnte ein Indiz dafür sein, dass die Muzin-Hypersekretion durch den Cholesteringehalt der Blasengalle ausgelöst werden kann. Muzin würde dann gemäss seiner physiologischen Funktion das Gallenblasenepithelium vor Schädigungen schützen und durch eine pronukleatorische Aktivität den Abtransport von Cholesterin in Form von Cholesterinkristallen ermöglichen.

Zusammenfassend erscheint die erhöhte Konzentration von Muzinen bei Patienten mit Gallensteinen eher als eine Wirkung denn als Ursache.

F Literaturverzeichnis

1. Abei M, Schwarzendrube J, Nuutinen H, Broughan TA, Kawczak P, Williams C, Holzbach RT, Cholesterol crystallization-promoters in human bile: comparative potencies of immunoglobulins, alpha1-acid glycoprotein, phospholipase C, and aminopeptidase N1. *J Lip Res* 34: 1993, 1141 – 1148.
2. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE, A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 195: 1952, 357 – 366.
3. Admirand WH, Small DM, The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 47: 1968, 1043 – 1052.
4. Afdhal NH, Niu N, Gantz D, Small DM, Smith BF, Bovine gallbladder mucin accelerates cholesterol monohydrate crystal growth in model bile. *Gastroenterology* 104(5): 1993, 1515 – 1523.(a)
5. Afdhal NH, Niu N, Nunes DP, Bansil R, Cao XX, Gantz D, Small DM, Offner GD, Mucin-vesicle interactions in model bile: Evidence for vesicle aggregation and fusion before cholesterol crystal formation. *Hepatology* 22: 1995, 856 – 865.
6. Afdhal NH, Williams N, Offner GD et al., Cholesterol supersaturation is the stimulus for gallbladder mucin hypersecretion in the prairie dog. *Gastroenterology* 104: 1993, A868.(b)
7. Agellon LB, Torchia EC, Intracellular transport of bile acids. *Biochim Biophys Acta* 26: 2000, 198 – 209.
8. Aigner A, Bauer A, Gallensäuren, *Med Mol Pharm* 11: 1988, 369 – 375.
9. Apstein MD, Carey MC, Biliary tract stones and associated diseases. *Internal medicine*, 4th ed. St. Louis: Mosby Yearbook, 1993.
10. Barbara L, Sama C, Morselli Labate AM, Taroni F, Rusticali AG, Festi D, Sapio C, Roda E, Banterle C, A population study on the prevalence of gallstone disease. The Sirmione study. *Hepatology* 7: 1987, 913 – 917.
11. Behar JB, Lee KY, Thompson WR, Biancani P, Gallbladder contraction in patients with pigment and cholesterol stones. *Gastroenterology* 97: 1989, 1479 – 1484.
12. Behar JB, Rhim BY, Thompson WR, Bancani P, Impaired signal transduction in human gallbladder muscle exposed to lithogenic bile with cholesterol. 3rd World Congress on Biliary Lithotripsy, Orlando, Florida. 1992.

13. Bilbao MK, Dotter CT, Lee TG, Katon RM, Complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). A study of 10000 cases. *Gastroenterology* 70: 1976, 314 – 320.
14. Bouchier IA, The characteristics of “white bile”. *Gastroenterology* 49(4): 1965, 354 – 359.
15. Bouchier IAD, Cooperband KJ, El Kods BM, Mucous substances and viscosity of normal and pathological human bile. *Gastroenterology* 49: 1965, 343 – 353.
16. Braveman DZ, Johnson ML, Kern F Jr., Effects of pregnancy and contraceptive steroids on gallbladder function. *N Engl J Med* 302: 1980, 362 – 364.
17. Broomfield PH, Chopra R, Sheinbaum RC, Bonorris GG, Silverman A, Schoenfield LJ, Marks JW, Effects of ursodeoxycholic acid and aspirin on the formation of lithogenic bile and gallstones during loss of weight. *N Engl J Med* 319: 1988, 1567 – 1572.
18. Brugge WR, Brand DL, Atkins H, Lane B, Abel WG, Gallbladder dyskinesia in chronic acalculous cholecystitis. *Dig Dis Sci* 1986, 31: 461 – 467.
19. Burnstein MJ, Ilson RG, Petrunka CN, Taylor RD, Strasberg SM, Evidence for a potent nucleating factor in the gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 85: 1983, 801 – 807.
20. Busch N, Lammert F, Matern S, Biliary secretory immunoglobulin A is a major constituent of the new group of cholesterol binding proteins. *Gastroenterology* 115(1): 1998, 129 – 138.
21. Busch N, Matiuck NV, Sahlin S, Pillay SP, Holzbach RT, Inhibition and promotion of cholesterol crystallisation by protein fractions from normal gallbladder bile. *J Lipid Res* 32: 1991, 695 – 702.
22. Cahalane MJ, Neubrand MW, Carey MC, Physical-chemical pathogenesis of pigment gallstones. *Semin Liver Dis* 8: 1988, 317 – 328.
23. Capral DJ, Small DM, Physical chemistry of bile. In: *The salivary handbook of physiology. Section 6, The Gastrointestinal System. Vol. 3, Bethesda, Md: Am Physiological Society* 1989, 621 – 662.
24. Carey MC, Cahalane MJ, Whither biliary sludge? *Gastroenterology* 95: 1988, 508 – 523.
25. Carey MC, Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J Lipid Res* 19: 1978, 945 – 955.
26. Carey MC, Lamont JT, Cholesterol gallstone formation. *Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. Prog Liver Dis* 10: 1992, 139 – 163.(a)
27. Carey MC, Pathogenesis of gallstones. *Recenti Prog Med* 83: 1992, 379 – 391.(b)
28. Cetta F, The role of bacteria in pigment gallstone formation. *Ann Surg* 213: 1991, 315 – 326.

29. Chapman WC, Peterkin GA, LaMorte WW, Williams LFJR, Alterations in biliary motility correlate with increased gallbladder prostaglandin synthesis in early cholelithiasis in prairie dog. *Dig Dis Sci* 34: 1989, 1420 – 1424.
30. Cheung CH, Moore EW, Prystowsky JB, Rege RV, TNF alpha stimulates mucus secretion in gallbladder epithelial cells. *Gastroenterology* 114: 1998, A1224.
31. Chijiwa K, Koga A, Yamasaki T, Shimada K, Noshiro H, Nakayama F, Fibronectin: a possible factor promoting cholesterol monohydrate crystallization in bile. *Biochim Biophys Acta* 1086: 1991, 44 – 48.
32. Cohen BI, Mosbach EH, Ayyad N, Yoshii M, McSherry C, Aspirin does not inhibit cholesterol cholelithiasis in two established animal models. *Gastroenterology* 101: 1991, 1109 – 1116.
33. Cohen DE, Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Curr Opin Lipidol* 10: 1999, 295 – 302.
34. Cohen DE, Kaler EW, Carey MC, Cholesterol carriers in human bile: are „lamellae“ involved? *Hepatology* 18: 1993, 1522 – 1531.
35. Collins JJ, Philips MC, The stability and structure of cholesterol rich codispersions of cholesterol and phosphatidylcholine. *J Lipid Res* 23: 1982, 291 – 298.
36. Conter RL, Washington JL, Liao Ch, Kauffman GL, Gallbladder mucosal blood flow increases during early cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* 102: 1992, 1764 – 1770.
37. De Bruijn MAC, Norrdam C, Goldhorn BG, Tytgat GNJ, Groen AK, The validity of the cholesterol nucleation assay. *Biochim Biophys Acta* 1138: 1992, 41 – 45.
38. De la Porte L, Lafont H, Domingo N, Meyer G, Müller I, Zündt B, Jüngst D, Composition and immunofluorescence studies of biliary sludge in patients with cholesterol or mixed gallstones. *J Hepatology* 33: 2000, 352 – 360.
39. Del Pozo R, Nervi F, Covarrubias C, Ronco B, Reversal of progesterone induced biliary cholesterol output by dietary cholesterol and ethynylestradiol. *Biochim Biophys Acta* 753: 1983, 164 – 170.
40. Devine PL, McKenzie IF, Mucins: structure, function and association with malignancy. *Bioessays* 14: 1992, 619 – 625.
41. Donovan JM, Jackson AA, Carey MC, Molecular species composition of inter-mixed micellar/vesicular bile salt concentrations in model bile: dependence upon hydrophilic-hydrophobic balance. *J Lipid Res* 34: 1993, 1131 – 1140.

42. Eder M, Nunes DP, Afdhal NH, Offner GD, TNF alpha stimulates mucin secretion, but not mucin synthesis, in human gallbladder epithelial cells. *Gastroenterology* 114: 1998, A1238.
43. Everson GT, Breaverman DZ, Johnson ML, Kern F jr., A critical evaluation of real-time ultrasonography for the study of gallbladder volume and contraction. *Gastroenterology* 79: 1980, 40 – 46.
44. Fischer S, Müller I, Zündt B, Jüngst C, Meyer G, Jüngst D, Ursodeoxycholic acid decreases viscosity and sedimentable fractions of gallbladder bile in patients with cholesterol gallstones. *European J of Gastroenterol and Hepatol* 16: 2004, 1 – 7.
45. Fisher MM, Nagy B, Bazin H, Underdown BJ, Biliary transport of IgA: role of secretory component. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1979, 2008 – 2012.
46. Fiske CH, Subbarow Y, The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66: 1925, 375 – 400.
47. Gallinger S, Harvey PRC, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM, Biliary proteins and the nucleation defect in cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 92: 1987, 867 – 875.
48. Gallinger S, Taylor RD, Harvey PRC, Petrunka CN, Strasberg SM, Effect of mucous glycoprotein on nucleation time of human bile. *Gastroenterology* 89: 1985, 648 – 658.
49. Gilat T, Feldman C, Halpern Z, Dan M, Bar-Meir S, An increased familial frequency of gallstones. *Gastroenterology* 84: 1983, 242 – 246.
50. Goldmann G, Kahn PJ, Alon R, Wiznitzer T, Biliary colic treatment and acute cholecystitis prevention by prostaglandin inhibitor. *DigDisSci* 34(6): 1989, 108 – 110.
51. Gollish SH, Burnstein MJ, Ilson RG, Petrunka CN, Strasberg SM, Nucleation of cholesterol monohydrate crystals from hepatic and gall-bladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gut* 24: 1983, 836 – 844.
52. Gottschalk M, Die rheologischen Eigenschaften der Gallenflüssigkeit und ihre mögliche Bedeutung für die Lithogenese. *Dtsch Z Verdau-Stoffwechselkrankheiten* 46: 1986, 323 – 326.
53. GREPCO, The epidemiology of gallstone disease in Rome, Italy. Part I. Prevalence data in men. The Rome Group for Epidemiology and Prevention of Cholelithiasis (GREPCO), *Hepatology* 8: 1988, 904 – 906.
54. Groen AK, Stout JP, Drapers JA, Hoek FJ, Grijm R, Tytgat GN, Cholesterol nucleating-influencing activity in T-tube bile. *Hepatology* 8: 1988, 347 – 352.
55. Groen AK, Van Wijland MJ, Frederiks WM, Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Regulation of protein secretion into bile: studies in mice with a disrupted *mdr2* p-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 109: 1995, 1997 – 2006.

56. Halpern Z, Dudley MA, Kibe A, Lynn MP, Breuer AC, Holzbach RT, Rapid vesicle formation and aggregation in abnormal human bile. A time-lapse video-enhanced contrast microscopy study. *Gastroenterology* 90: 1986, 875 – 885.
57. Harvey PR, Strasberg M, Will the real cholesterol-nucleating and antinucleating proteins please stand up? *Gastroenterology* 104: 1993, 646 – 650.
58. Harvey PRC, Rupar CA, Gallinger S, Petrunka CN, Strasberg SM, Quantitative and qualitative comparison of gallbladder mucus glycoprotein from patients with or without gallstones. *Gut* 27: 1986, 374 – 381.
59. Hay DW, Carey MC, Chemical species of lipids in bile. *Hepatology* 12: 1990, 6S – 14S.(a)
60. Hay DW, Carey MC, Pathophysiology and pathogenesis of cholesterol gallstone formation. *Semin Liver Dis* 10: 1990, 159 – 170.(b)
61. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS, Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53: 1993, 641 – 651.
62. Holan KR, Holzbach RT, Hermann RE, Cooperman AM, Claffey WJ, Nucleation time: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology* 77: 1979, 611 – 617.
63. Holzbach RT, Busch N, Nucleation and growth of cholesterol crystals. Kinetic determinants in supersaturated native bile. *Gastroenterol Clin North Am* 20(1): 1991, 67 – 84.
64. Holzbach RT, Marsh M, Olszewski M, Holan K, Cholesterol solubility in bile: evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* 52: 1973, 1467 – 1479.
65. Hood K, Gleeson D, Ruppin DC, Dowling RH, Prevention of gallstone recurrence by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Lancet* 2: 1988, 1223 – 1225.
66. Howard PJ, Murphy GM, Dowling RH, Gallbladder emptying patterns in response to a normal meal in healthy subjects and patients with gallstones: Ultrasound study. *Gut* 32: 1991, 1406 – 1411.
67. Hulten O, Formation of gallstones II. *Acta Chir Scand* 134: 1968, 557 – 561.
68. Jazrawi RP, Pazzi P, Petroni ML, Prandini N, Paul C, Adam JA, Gullini S, Northfield TC, Postprandial gallbladder motor function: Refilling and turnover of bile in health and in cholelithiasis. *Gastroenterology* 109: 1995, 582 – 591.
69. Jirsa M, Muchova L, Draberova L, Draber P, Smid F, Kuroki M et al., Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 is the 85-kilodalton pronase-resistant biliary glycoprotein in the cholesterol crystallisation promoting low density protein-lipid complex. *Hepatology* 34: 2001, 1075 – 1082.

70. Jirsa M, Muchova L, Draberova L, Draber P, Smid F, Marecek Z, Kuroki M, Groen AK, Identification of the 85kDa glycoprotein in the cholesterol crystallization promoting low density particle as carcinoembryonic antigen like cell adhesion molecule 1 (CEACAM1). Abstract. *J Hepatol* 32(1): 2000, 120.
71. Jüngst D, de Pozo R, Dolu MH, Schneeweiss SG, Frimberger E, Rapid formation of cholesterol crystals in gallbladder bile is associated with stone recurrence after laparoscopic cholecystectomy. *Hepatology* 25: 1997, 509 – 513.
72. Jüngst D, Lang T, Huber P, Lange V, Paumgartner G, Effect of phospholipids and bile acids on cholesterol nucleation time and vesicular/micellar cholesterol in gallbladder bile of patients with cholesterol stones. *J Lipid Res* 34: 1993, 1457 – 1464.
73. Jüngst D, Lang T, von Ritter C, Paumgartner G, Role of high total protein in gallbladder bile in the formation of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 100: 1991, 1724 – 1729.
74. Jüngst D, Lang T, von Ritter C, Pratschke E, Paumgartner G, Cholesterol nucleation time in gallbladder bile of patients with solitary or multiple cholesterol gallstones. *Hepatology* 15: 1992, 804 – 808.
75. Jüngst D, Niemeyer A, Müller I, Zündt B, Meyer G, Wilhelmi M, de Pozo R, Mucin and phospholipids determine viscosity of gallbladder bile in patients with gallstones. *World J Gastroenterol* 7(2): 2001, 203 – 207.
76. Juvonen T, Niemälä O, Mäkelä J, Kairatuoma MI, Characteristics of symptomatic gallbladder disease in patients with either solitary or multiple cholesterol gallstones. *Hepato-Gastroenterology* 41: 1994, 263 – 266.
77. Kano M, Shoda J, Irimura T, Ueda T, Iwasaki R, Urasaki T et al., Effects of long term ursodeoxycholate administration on expression levels of secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and mucin genes in gallbladders and biliary composition in patients with multiple cholesterol stones. *Hepatology* 28: 1998, 302 – 313.
78. Kibe A, Dudley MA, Halpern Z, Lynn MP, Breuer AC, Holzbach RT, Factors affecting cholesterol monohydrate crystal nucleation time in model bile systems of supersaturated bile. *J Lipid Res* 26: 1985, 1102 – 1111.
79. Kibe A, Holzbach RT, LaRusso NF, Mao SJ, Inhibition of cholesterol crystal formation by apolipoproteins in supersaturated model bile. *Science* 225: 1984, 514 – 516.
80. Kishk SMA, Darweesh RMA, Dodds WJ, Lawson TL, Stewart ET, Kern MK, Hassanein EH, Sonographic evaluation of resting gallbladder volume and postprandial emptying in patients with gallstones. *AJR Am J Roentgenol* 148: 1987, 875 – 879.

81. Klein A, Strecker G, Lamblin G, Roussel P, Structural analysis of mucin-type o-linked oligosaccharides. *Methods Mol Biol* 125: 2000, 191 – 209.
82. Klinkspoor JH, Yoshida T, Lee SP, Bile salts stimulate mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells independent of their detergent effect. *Biochem J* 332: 1998, 257 – 262.
83. Konikoff FM, Lechene de la Porte P, Laufer H, Domingo N, Lafont H, Gilat T, Calcium and the anionic polypeptide fraction (APF) have opposing effects on cholesterol crystallization in model bile. *J Hepatol* 27: 1997, 707 – 715.
84. Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G, Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 32: 2000, 3 – 18.
85. Lammert F, Carey MC, Paigen B, Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 120: 2001, 221 – 238.
86. Lamont JT, Carey MC, Cholesterol gallstone formation. Pathobiology and pathomechanics. *Prog Liver Dis* 10: 1992, 165 – 191.(a)
87. LaMont JT, Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann NY Acad Sci* 664: 1992, 190 – 201.(b)
88. LaMont JT, Smith BF, Moore JR, Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Hepatology* 4(suppl 5): 1984, 51S – 56S.
89. LaMont JT, Turner BS, DiBenedetto D, Handin R, Schafer AI, Arachidonic acid stimulates mucin secretion in prairie dog gallbladder. *Am J Physiol* 245: 1983, G 92 – 98.
90. LaMont T, Ventola AS, Trotman BW, Soloway RD, Mucin glycoprotein content of human pigment gallstones. *Hepatology* 3: 1983, 377 – 382.
91. LaMorte WW, LaMont JT, Hale W, Booker ML, Scott TE, Turner B, Gallbladder prostaglandins and lysophospholipids as mediators of mucin secretion during cholelithiasis. *Am J Physiol* 251: 1986, G701 – 709.
92. Lee SP, Carey MC, La Mont JT, Aspirin prevention of cholesterol gallstone formation in prairie dogs. *Science* 211: 1981, 1429 – 1431.(a)
93. Lee SP, Hypersecretion of mucus glycoprotein by the gallbladder epithelium in experimental cholelithiasis. *J Pathol* 134: 1987, 199 – 207.
94. Lee SP, LaMont JT, Carey MC, Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones. *J Clin Invest* 67: 1981, 1712 – 1723.(b)
95. Lee SP, Lim TH, Scott AJ, Carbohydrate moieties of glycoproteins in human hepatic and gallbladder bile, gallbladder mucosa and gallstones. *Clin Sci* 56: 1979, 533 – 538.

96. Lee SP, Maher K, Nicholls JF, Origin and fate of biliary sludge. *Gastroenterology* 94: 1988, 170 – 176.
97. Lee SP, Nichols JF, Nature and composition of biliary sludge. *Gastroenterology* 90: 1986, 677 – 686.
98. Lee, TJ, Smith BF, Bovine gallbladder mucin promotes cholesterol crystal nucleation from cholesterol-transporting vesicles in supersaturated model bile. *J Lip Res* 30: 1989, 491 – 498.
99. Levy PF, Smith BF, LaMont JT, Human gallbladder mucin accelerates nucleation of cholesterol in artificial bile. *Gastroenterology* 87(2): 1984, 270 – 275.
100. Liddle RA, Goldstein RB, Saxton J, Gallstone formation during weight reduction dieting. *Arch Intern Med* 149: 1989, 1750 – 1753.
101. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 1951, 265 – 275.
102. Malet PF, Deng SQ, Soloway RD, Gallbladder mucin and cholesterol and pigment gallstone formation in hamsters. *Scand J Gastroenterology* 24(9): 1989, 1055 – 60.
103. Malet PF, Williamson CE, Trotman BW, Soloway RD, Composition of pigmented centers of cholesterol gallstones. *Hepatology* 6: 1986, 477 – 481.
104. Mantle M, Allen A, A colorimetric assay for glycoprotein based on the periodic acid/Schiff stain. *Biochem Soc Trans* 6: 1978, 607 – 609.
105. Maringhini A, Marceno MP, Lanzarone F, Caltagirone M, Fusco G, DiCuonzo F, Cittadini E, Pagliaro L, Sludge and stones in gallbladder after pregnancy. Prevalence and risk factors. *J Hepatol* 5: 1987, 218 – 223.
106. McPhee MS, Greenberger NJ, Diseases of the gallbladder and bile ducts. In *Harrisons Principles of Internal Medicine*, Isselbacher KJ et al. (eds.). 11th edition, New York: McGraw-Hill Book Company (2) 253: 1987, 1359 – 1368.
107. Metzger AL, Heymsfield S, Grundy SM, The lithogenic index – a numerical expression for the relative lithogenicity of bile. *Gastroenterology* 62: 1972, 499 – 501.
108. Miquel JF, Groen AK, van Wijland MJ, del Pozo R, Eder MI, von Ritter C, Quantification of mucin in human gallbladder bile: a fast, specific, and reproducible method. *J Lipid Res* 36(11): 1995, 2450 – 2458.
109. Miquel JF, Nunez L, Amigo L, Gonzalez S, Raddatz A, Rigotti A, Nervi F, Cholesterol saturation, not proteins or cholecystitis, is critical for crystal formation in human gallbladder bile. *Gastroenterology* 114: 1998, 1016 – 1023.

110. Miquel JF, Rigotti A, Rojas E, Brandan E, Nervi F, Isolation and purification of human biliary vesicles with potent cholesterol-nucleation-promoting activity. *Clin Sci (Colch)* 82: 1992, 175 – 180.
111. Miquel JF, von Ritter C, del Pozo R, Lange V, Jüngst D, Fibronectin in human gallbladder bile: cholesterol pronucleating and/or mucin "link"protein? *Am J Physiol* 267(3 Pt 1): 1994, G393 – 400.
112. Moumami C, Gullikson GW, Grisham MB, Gaginella TS, Differential effects of reactive oxygen metabolites on neurally stimulated and nonstimulated guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther.* 256:1991, 266-71.
113. Nakayama F, Quantitative microanalysis of gallstones. *J Lab Clin Med* 72: 1968, 602 – 611.
114. Nakayama F, Studies on calculus versus milieu: Gallstone and bile. *J Lab Clin Med* 77: 1971, 366 – 377.
115. Nervi F, Bronfman M, Allalon W, Deperieux E, Del Pozo R, Regulation of biliary cholesterol secretion in the rat: role of hepatic cholesterol esterification. *J Clin Invest* 74: 1984, 2226 – 2237.
116. Nieuw Amerongen AV, Bolscher JG, Bloemena E, Veerman EC, Sulfomucins in the human body. *Biol Chem* 379: 1998, 1 – 18.
117. Nunes DP, Afdhal NH, Offner GD, A recombinant bovine gallbladder mucin peptide binds biliary lipids and accelerates cholesterol crystal appearance time. *Gastroenterology* 116: 1999, 936 – 942.
118. Nunez L, Amigo L, Rigotti A, Puglielli L, Mingrone G, Greco AV, Nervi F, Cholesterol crystallization-promoting activity of aminopeptidase-N isolated from the vesicular carrier of biliary lipids. *FEBS* 329: 1993, 84 – 88.
119. Offner GD, Gallbladder Mucin. In: *Gallbladder and Biliary Tract Diseases*. Ed. Afdhal NH, Dekker M, New York 2000, 211 – 233.
120. Ohya T, Schwarzendrube J, Busch N, Gresky S, Chandler K, Takabayashi A, Igimi H, Egami K, Holzbach RT, Isolation of a human biliary glycoprotein inhibitor of cholesterol crystallization. *Gastroenterology* 104: 1993, 527 – 538.
121. Ostrow JD, Unconjugated bilirubin and cholesterol gallstone formation. *Hepatology* 12: 1990, 219S – 224S.
122. Paracelsus, *Über Tartarische Kranckheiten*, 1563, Hrsg. C. Waldkirch 1589.
123. Pattinson NR, Willis KE, Phospholipase C and diacylglycerol lipase in human gallbladder and hepatic bile. *Gastroenterology* 99: 1990, 1798 – 1806.

124. Paumgartner G, Strategies in the treatment of gallstone disease. Working team report. *Gastroenterology* 6: 1993, 65 – 75.
125. Pearson JP, Kaura R, Taylor W, Allen A, The composition and polymeric structure of mucus glycoprotein from human gallbladder bile. *Biochim Biophys Acta* 706: 1982, 221 – 228.
126. Peled Y, Halpern Z, Baruch R, Goldman G, Gilat T, Cholesterol nucleation from its carriers in human bile. *Hepatology* 8: 1988, 914 – 918.
127. Petitti DB, Sidney S, Perlman JA, Increased risk of cholecystectomy in users of supplemental estrogen. *Gastroenterology* 94: 1988, 91 – 95.
128. Pomeranz IS, Shaffer EA, Abnormal gallbladder emptying in a subgroup of patients with gallstones. *Gastroenterology* 88: 1985, 787 – 791.
129. Purdum PP, Shamburek RD, Hylemon PB, Moore EW, Rapid phospholipid transfer across cultured human gallbladder epithelia. *Gastroenterology* 102: 1992, A871.
130. Quintao E, Grundy SM, Ahrens EH, Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res* 12: 1971, 233 – 247.
131. Reuben A, Biliary proteins. *Hepatology* 4: 1984, 46S – 50S.
132. Reuben A, Maton PN, Murphy GM, Dowling RH, Bile lipid secretion in obese and non-obese individuals with and without gallstones. *Clin Sci* 69: 1985, 71 – 79.
133. Roslyn JJ, Pitt HA, Mann LL, Ament ME, DenBesten L, Gallbladder disease in patients on long-term parenteral nutrition. *Gastroenterology* 84: 1983, 148 – 154.
134. Sackmann M, Pauletzki J, Sauerbruch T, Holl J, Schelling G, Paumgartner G, The Munich gallbladder study. Results of the first 5 years with 711 Patients. *Ann Intern Med* 114: 1991, 290 – 296.
135. Sahlin S, Ahlberg J, Reihner E, Stahlberg D, Einarsson K, Cholesterol metabolism in human gallbladder mucosa: relationship to cholesterol gallstone disease and effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid treatment. *Hepatology* 16: 1992, 320 – 326.
136. Sampliner RE, Bennet PH, Comess LJ, Rose FA, Burch TA, Gallbladder disease in Pima Indians. *N Engl J Med* 283: 1970, 1358 – 1364.
137. Sarles H, Hauton J, Planche NE, Lafont H, Gerolami A, Diet, cholesterol gallstones and composition of the bile. *Am J Dig Dis* 15: 1970, 251 – 260.
138. Sarosiek J, Slomiany A, Takagi A, Slomiany BL, Hydrogen ion diffusion in dog gastric mucus glycoprotein: effect of associated lipids and covalently bound fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 118: 1984, 523 – 531.

139. Saucan L, Palade GE, Differential colchicine effects on the transport of membrane and secretory proteins in rat hepatocytes in vivo: bipolar secretion of albumin. *Hepatology* 15: 1992, 714 – 721.
140. Schmidt RF, Thews G, *Physiologie des Menschen*. 23. Auflage. Springer Verlag, Berlin 1987, 761 – 763.
141. Seregni E, Botti C, Massaron S, Lombardo C, Capobianco A, Bogni A, Bombardieri E, Structure, function and gene expression of epithelial mucins. *Tumori* 83: 1997, 625 – 632.
142. Sewell R, Mao SJ, Kawamoto T, Larusso NF, Apolipoproteins of high, low and very low density lipoproteins in human bile. *J Lipid Res* 24: 1983, 391 – 401.
143. Shankar V, Gilmore MS, Elkins RC, Sachdev GP, A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem repeat organization. *Biochem J* 300: 1994, 295 – 298.
144. Shankar V, Pichan P, Eddy RL jr., Tonk V, Nowak N, Sait SN, Shows TB, Schultz RE, Gotway G, Elkins RC, Gilmore MS, Sachdev GP, Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 1997, 232 – 241.
145. Shoda J, Ueda T, Ikegami T, Matsuzaki Y, Satoh S, Kano M, Matsuura K, Tanaka N, Increased biliary group II phospholipase A2. *Gastroenterology* 112(6): 1997, 2036-47
146. Sitzmann JV, Pitt HA, Steinborn PA, Pasha ZR, Sander RC, Cholecystokinin prevents parenteral nutrition induced biliary sludge in humans. *Surg Gynecol Obstet* 170: 1990, 25 – 31.
147. Slomiany A, Jozwiak Z, Takagi A, Slomiany BL, The role of covalently bound fatty acids in the degradation of human gastric mucus glycoprotein. *Arch Biochem Biophys* 229: 1984, 560 – 567.
148. Slomiany A, Witas H, Aono M, Slomiany BL, Covalently linked fatty acids in gastric mucus glycoprotein of cystic fibrosis patients. *J Biol Chem* 258: 1983, 8535 – 8538.
149. Small DM, Bourges M, Dervichian DG, Ternary and quaternary aqueous systems containing bile salt, lecithin and cholesterol. *Nature* 211: 1966, 816 – 818.
150. Smallwood RA, Jablonski P, McWatts K, Intermittent secretion of abnormal bile in patients with cholesterol gallstones. *Brit Med J* 4: 1972, 263 – 266.
151. Smith BF, Gallbladder mucin as a pronucleating agent for cholesterol monohydrate crystals in bile. *Hepatology* 11: 1990, 183S – 188S.
152. Smith BF, Human gallbladder mucin binds biliary lipids and promotes cholesterol crystal nucleation in model bile. *J Lip Res* 28: 1987, 1088 – 1097.

153. Smith BF, LaMont JT, Bovine gallbladder mucin binds bilirubin in vitro. *Gastroenterology* 85: 1983, 707 – 712.
154. Smith BF, LaMont JT, Identification of gallbladder mucin bilirubin complex in human cholesterol gallstone matrix. *J Clin Invest* 76: 1985, 439 – 445.
155. Smith BF, LaMont T, Hydrophobic binding properties of bovine gallbladder mucin. *J Biol Chem* 259: 1984, 12170 – 12177.
156. Smith JL, Hardic IR, Pillay SP, De-Jersey J, Hepatic acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity is decreased in patients with cholesterol gallstones. *J Lipid Res* 31: 1990, 1993 – 2000.
157. Somjen GJ, Gilat T, Changing concepts of cholesterol solubility in bile. *Gastroenterology* 91: 1986, 772 – 775.
158. Somjen GJ, Gilat T, Contribution of vesicular and micellar carriers to cholesterol transport in human bile. *J Lipid Res* 26: 1985, 699 – 704.
159. Stolk MFJ, van Erpecum KJ, Renooij W, Portincasa P, van de Heijning BMM, van Berge-Henegouwen GP, Gallbladder emptying in vivo, bile composition, and nucleation of cholesterol crystals in patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 108: 1995, 1882 – 1888.
160. Stone BG, Gavalier JS, Belle SH, Shreiner DP, Impairment of gallbladder emptying in diabetes mellitus. *Gastroenterology* 95: 1988, 170 – 176.
161. Strasberg SM, Hertl M, Soper NJ, An analysis of the problem of biliary injury during laparoscopic cholecystectomy in Maryland. *N Engl J Med* 330: 1994, 403 – 408.
162. Strous GJ, Dekker J, Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 1992, 57 – 92.
163. Swidsinski A, Khilkin M, Pahlig H, Swidsinski S, Priem F, Time dependent changes in the concentration and type of bacterial sequences found in cholesterol gallstones. *Hepatology* 27: 1998, 662 – 665.
164. Swidsinski A, Ludwig W, Pahlig H, Priem F, Molecular genetic evidence of bacterial colonization of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 108: 1995, 860 – 864.
165. Swobodnik W, Wenk H, Janowitz P, Hagert N, Kratzer W, Berhold J, Total biliary protein, mucus glycoproteins, cyclic AMP and apolipoproteins in the gallbladder bile of patients with cholesterol stones and stone free controls. *Scand J Gastroenterol* 26: 1991, 771 – 778.
166. Tabata M, Nakayama F, Bacteria and gallstones. Etiological Significance. *Dig Dis Sci* 26: 1981, 218 – 224.
167. Talalay P, Enzymatic analysis of steroid hormones. *Biochem Anal* 8: 1960, 119 – 143.

168. Taylor DR, Crowther RS, Cozart JC, Sharrock J, Soloway RD, Calcium carbonate in cholesterol gallstones: polymorphism, distribution, and hypotheses about pathogenesis. *Hepatology* 22: 1995, 488 – 496.
169. Tera H, Stratification of human gallbladder bile in vivo. *Acta Chir Scand* 256 (suppl): 1960, 4 – 85.
170. Trauner M, Boyer JL, Bile salt transporters: molecular characterization, function and regulation. *Physiol Rev* 83: 2003, 633 – 671.
171. Trotman BW, Bernstein SE, Bove KE, Wirt GD, Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia. *J Clin Invest* 65: 1980, 1301 – 1308.
172. Upadhyaya GA, Robert P, Harvey C, Strasberg S, Effect of human biliary immunoglobulins on the nucleation of cholesterol. *J Biol Chem* 268: 1993, 5193 – 5200.
173. Van den Berg A, Groen AK, Role of proteins in cholesterol crystallization in bile. In: *Gallbladder and biliary tract diseases*. Eds. Afdhal NH, Dekker M, New York 2000, 235 – 249.
174. Van Erpecum K, van Berge-Henegouwen GP, Eckhardt M, Portincasa P, van de Heijning BJM, Dallinga-Thie GM, Groen AK, Cholesterol crystallization in human gallbladder bile: Relation to gallstone number, bile composition and apolipoprotein E4 Isoform. *Hepatology* 27: 1998, 1508 – 1516.
175. Von Ritter C, Niemeyer A, Lange V, Möhrle W, Richter WO, von Meyer L, Brandl H, Del Pozo R, Jüngst D, Indomethacin decreases viscosity of gallbladder bile in patients with cholesterol gallstone disease. *Clin Inv* 71: 1993, 928 – 932.
176. Wahlin T, Bloom GD, Carlsoo B, Histochemical observations with the light and the electron microscope on the mucosubstances of the normal mouse gallbladder epithelial cells. *Histochemistry* 42(2): 1974, 119 – 131.
177. Wang DQ, Carey MC, Characterization of crystallization pathways during cholesterol precipitation from human gallbladder biles: identical pathways to corresponding model biles with three predominating sequences. *J Lipid Res* 37: 1996, 2539 – 2549.
178. Wasiewitz U, Schenk J, Sabinski F et al., Investigation on common bile duct stones. *Digestion* 26: 1983, 43 – 52.
179. Watson D, A simple method for the determination of serum cholesterol. *Clin Chim Acta* 5: 1960, 637 – 643.
180. Whorwell PJ, Hawkins R, Dewbury K, Ultrasound survey of gallstones and other hepatobiliary disorders in patients with Crohns disease. *Dig Dis Sci* 29: 1984, 930 – 933.

181. Wittenburg H, Lammert F, Wang DQ, Churchill GA, Li R, Bouchard G, Carey MC, Paigen B, Interacting QTLs for cholesterol gallstones and gallbladder mucin in AKR and SWR strains of mice. *Physiol Genomics* 8: 2002, 67 – 77.
182. Wolpers C, Hofmann AF, Solitary vs. multiple cholesterol gallbladder stones. Mechanisms of formation and growth. *Clin Invest* 71: 1993, 423 – 434.
183. Womack NA, Zeppa R, Irvin GL, The anatomy of gallstones. *Ann Surg* 157: 1963, 670 – 686.
184. Yamashita G, Secknus R, Chernosky A, Krivacic KA and Holzbach RT, Comparison of haptoglobin and apolipoprotein A1 on biliary lipid particles involved in cholesterol crystallization. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 1996, 738 – 745.
185. Yamashita Y, Tazuma S, Kajiyama G, Method for quantitative assesment of transformation of non-micellar cholesterol carriers in model bile systems. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 1996, 864 – 869.
186. Zijlstra AI, Offner GD, Afdhal NA, van Overveld M, Tytgat N, Groen AK, The pronase resistance of cholesterol-nucleating glycoproteins in human bile. *Gastroenterology* 110: 1996, 1926 – 1935.

G Abkürzungsverzeichnis

BSG – Blutsenkungsgeschwindigkeit
 CRP – C-reaktives Protein
 AP – Alkalische Phosphatase
 GGT – Gamma-GT
 ERCP – Endoskopisch retrograde Cholangiopancreaticographie
 MRC – Magnetresonanzcholangiographie
 UDCA – Ursodeoxycholsäure
 LDL – Low density lipoprotein
 VLDL – Very low density lipoprotein
 ACAT – Acyl-CoA-Cholesterolacyltransferase
 HMG – CoA-Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
 CSI – Cholesterol saturation index
 APF – Anionic protein fraction
 IGA – Immunoglobulin A

NT – Nucleation time

COT – Cholesterol observation time

AFP – Alpha foetoprotein

DNA – Desoxyribonucleic acid

IGM – Immunglobulin M

IGG – Immunglobulin G

CEACAM – Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule

NSAR – Nicht-steroidale Antirheumatika

TNF – Tumornekrose-Faktor

NO – Stickstoffmonoxid

PMSF – Phenylmethyl Sulfonyl Fluorid

EDTA – Ethylendinitrioltetraessigsäure Dinatriumsalz

SEM – Standard error of mean

PLA 2 – Phospholipase A2

H Anhang/Danksagungen

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern in großer Dankbarkeit.

Großen Dank möchte ich auch aussprechen an folgende Personen, ohne welche diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Herrn Prof. D. Jüngst für die unermüdliche Motivation, die vielen Anregungen und den nicht nachlassenden Optimismus, von welchem ich profitiert und gelernt habe.

Herrn Prof. Dr. med. B. Göke für die Möglichkeit, in den Laboratorien der Med. Klinik im Klinikum Großhadern zu arbeiten.

Frau Benedikta Zündt für ihre geduldige Einweisung, viele Stunden harte Arbeit und unerschütterlichen Optimismus.

Herrn Reginaldo del Pozo für wichtige/hilfreiche Verbesserungsvorschläge und Anmerkungen.

Dem Pflegepersonal der Chirurgischen Klinik Großhadern für die Hilfe bei der Beschaffung der vielen Proben.

I Lebenslauf/Publikationen

Lebenslauf

- Name:** Martin Wilhelmi
- Wohnort:** Ackermannstr. 18, 8044 Zürich
Tel.: +41 43 2449784
- E-Mail: martin.wilhelmi@KSA.ch
Mrtwilhelmi@web.de
- Geburtstag:** 20.03.1971 (Neunkirchen/Saar)
- Familienstand:** verheiratet, keine Kinder
- Nationalität:** Deutsch
- Schulausbildung:** 1977 – 1978 Grundschule Neunkirchen
1978 – 1981 Grundschule Ottweiler
1981 – 1991 Gymnasium Ottweiler
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
- Zivildienst:** 1991 – 1993 Altenpflege im Seniorenzentrum Ottweiler
- Studium:** 1993 – 1995 Studium der Germanistik/Psychologie in Saarbrücken und Berlin
Abschluss mit Zwischenprüfung
1995 – 2000 Studium der Humanmedizin in München
2. Staatsexamen im August 2000
2000 – 2001 Praktisches Jahr (Unterassistenz)
1. PJ-Tertial in Innerer Medizin im Klinikum Großhadern, LMU Universitätsklinikum München
2. PJ-Tertial in Gynäkologie an der Frauenklinik der Universität München
3. PJ-Tertial in Chirurgie am Stadtkrankenhaus München-Schwabing
3. Staatsexamen 10/2001
- Studienbegleitende Tätigkeiten:** 1991 – 1995 Mitarbeit in Allgemeinärztlicher und Pädiatrischer Praxis der Eltern
1995 – 1999 Zahlreiche Nachtwachen auf verschiedenen Stationen im Klinikum Rechts der Isar in München
1995 – 1999 Freiwillige Zusatzkurse in Tropenmedizin (3 Semester), Sportmedizin (2 Semester) Akupunktur (2 Semester), Chirurgische Sonographie (1 Semester)

Assistenz- und Oberärztliche Tätigkeiten:

01/2002 – 06/2003	Assistenzarztstätigkeit in Gastroenterologie/Hepatology am Universitätsspital Zürich/Schweiz mit: Diagnostik und Therapie von Lebererkrankungen und verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen
2003 – 2006	Assistenzarztstätigkeit in allgemeiner Innerer Medizin am Kantonsspital Aarau/Schweiz
2006 – aktuell	Oberarztstätigkeit in allgemeiner Innerer Medizin am Spital Zofingen/Schweiz

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

01/1999	Experimentelle Promotionsarbeit: „Die Bedeutung von Mucin-Glykoprotein in der Pathogenese der Cholezystolithiasis“ Methodik: Biochem. Bestimmung von Cholesterin, Proteinen, Gallensäuren, Phospholipiden, Mucinen, Viskositätsmessungen, Lichtmikroskopie, Säulenchromatographie, Dünnschichtchromatographie, Bindungsversuche mit Radioaktivität, Elektrophorese
08/1999	Forschungsaufenthalt in der 1. Interni Klinika in Prag (Arbeit mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden)
05/2000	Posterpräsentation bei Falk-Symposium 117 in München
05/2000	Posterpräsentation bei AGA San Diego/USA
07/2000	Beginn einer Arbeit über die inhibitorische Wirkung von Scymnol und Scymnolsulfat auf die Nukleation von Cholesterin in menschlicher Blasengalle
09/2000	Forschungsaufenthalt am RMIT in Melbourne/Australien (Arbeit mit HPLC)
2003	Mitarbeit an verschiedenen klinischen Studien zur Hepatitis C, Ascitestherapie, Behandlung der hepatischen Encephalopathie am Universitätsklinikum Zürich

Publikationen:**Originalarbeiten**

Wilhelmi M, Jüngst C, Mock M, Meyer G, Zündt B, de Pozo R, Jüngst D, Effect of gallbladder mucin on the crystallization of cholesterol in bile. European journal of gastroenterology and hepatology 16(12): 2004, 1301 – 1307.

Jüngst D, Niemeyer A, Müller I, Zündt B, Meyer G, Wilhelmi M, del Pozo R,

Mucin and phospholipids determine viscosity of gallbladder bile in patients with gallstones.
World J Gastroenterol 7(2): 2001, 203 – 207.

Abstracts

Helbling B, Jochum W, Stamenic I, Knoepfli M, Cerny A, Borovicka J, Wilhelmi M, Dinges S, Müllhaupt B, Meyer-Wyss B, Renner E, HCV-Related advanced fibrosis/cirrhosis: randomized controlled trial of pegylated (40kD, branched) Interferon Alfa-2A (Peg-IFN) and Ribavirin (Riba).
Eingereicht bei Journal of Hepatology 11/05

Wilhelmi M¹, Mock MR⁴, Zündt B¹, Meyer G², Macrides TA³, Wright PFA⁴, Jüngst D¹,

The hepatoprotective shark bile sterol, scymnol: a potent nucleation inhibitor of cholesterol crystals in bile.
(Eingereicht bei liver 12/05)

Rapid communication

Wilhelmi M, Gubler C, Renner E, Müllhaupt B, Lymph node enlargement during combination therapy for chronic Hepatitis C with pegylated interferon alpha and ribavirin: harmless reaction or harmful disease?
(Swiss medical weekly 03/06)

Referenzen:

Prof. Dr. med. D. Jüngst
Oberarzt der Med. Klinik II,
Klinikum Großhadern
D- 81377 München
Tel. 089 70952376
E-Mail: Dieter.Juengst@med2.med.uni-muenchen.de

Prof. Dr. med. D. Conen
Chefarzt Innere Medizin
Kantonsspital Aarau
CH-5000 Aarau
Schweiz

PD Dr. med. E. Renner
Division of Gastroenterology and Hepatology
University Hospital
Ramistrasse 100
CH-8091 Zürich
Tel. 0041-(0)1-255 23 85
Fax 0041-(0)1-255 45 98
E-Mail: eberhard.renner@dim.usz.ch

Dr. Paul F. A. Wright
Associate Professor in Immunotoxicology
Key Centre for Applied & Nutritional Toxicology
RMIT-University, Melbourne/Australia
E-Mail: paul.wright@rmit.edu.au