

**Diplomarbeit**

**Gallensäuren im Serum bei Kindern und Jugendlichen  
mit Diabetes Mellitus Typ 1**

eingereicht von

**Melanie Heckmann**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde**

unter der Anleitung von

**OA Dr. Jörg Jahnelt**

**Priv.-Doz. Dr. Elke Fröhlich-Reiterer**

Graz, 15.06.2015

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, 15.06.2015*

*Melanie Heckmann eh*

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn OA. Dr. Jörg Jahnel und Frau Priv.-Doz. Dr. Elke Fröhlich-Reiterer für die Unterstützung und der ausgezeichneten Betreuung meiner Diplomarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt OA. Dr. Jahnel dafür, dass er mir bei Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand, mich durch die wöchentlichen Besprechungen motivierte und mir im Rahmen meiner Diplomarbeit viele interessante Erfahrungen ermöglichte, die ich sehr zu schätzen weiß. Vielen Dank dafür.

Mein Dank geht insbesondere an meine Familie. Vielen Dank an meine Eltern, denen ich diese Diplomarbeit widme. Sie haben mir dieses Studium erst ermöglicht, waren mir stets eine wertvolle seelische und moralische Stütze und sind immer für mich da. Danke, dass ich mich auf euch verlassen kann.

Meinen Freunden und StudienkollegInnen möchte ich für die schöne Studienzeit danken. Ohne euch wäre es nicht das gewesen, was es war.

Schließlich möchte ich mich noch bei allen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Diplomarbeit beigetragen haben, bei dieser Danksagung jedoch nicht namentlich genannt wurden.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Laut Literatur beeinflusst der Gallensäure- (GS-) Metabolismus den Glukose-Metabolismus und *vice versa*. Einerseits sollen hohe Glukosespiegel stimulierend auf die GS-*de-novo*-Synthese wirken und somit die GS-Konzentration im Blut erhöhen. Andererseits stimulieren hohe GS-Serum-Konzentrationen die Insulin-Sekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und sollen dadurch den Blutzuckerspiegel senken. Hohe Insulin-Serum-Spiegel müssten folglich GS im Serum senken und niedrige Insulin-Werte müssten den GS-Spiegel erhöhen. Bisher nicht untersucht wurde der GS-Metabolismus bei PatientInnen mit Diabetes mellitus Typ 1 (T1D), welche unbehandelt eine Hyperglykämie bei Insulinmangel aufzeigen und immer eine Insulin-Therapie benötigen. Ziel dieser Arbeit ist es, Veränderungen der GS-Konzentrationen bei T1D-PatientInnen in Abhängigkeit des Alters und der Stoffwechselkontrolle, welche durch den Langzeitmarker HbA1c-Wert beurteilt werden kann, darzustellen.

**Methodik:** 116 Kinder und Jugendliche mit T1D, im Alter von 3-20 Jahren, wurden in drei Hauptgruppen eingeteilt: 3-5 Jahre, 6-11 Jahre und >11 Jahre. Je nach HbA1c-Werten entstanden drei Untergruppen (I-III) pro Hauptgruppe, welche gegen eine Kontrollgruppe (IV) verglichen wurden. Aus 10  $\mu$ l Blutserum wurde bei allen PatientInnen mittels High performance liquid chromatography die Gesamt-GS-Serumkonzentrationen und das GS-Profil (15 GS, bestehend aus unkonjugierten und Glycin- bzw. Taurin-konjugierten GS) bestimmt. Schließlich wurden Unterschiede der GS-Werte zwischen den Gruppen statistisch ausgewertet.

**Ergebnisse:** In der Altersgruppe 3-5 Jahren (n=27) zeigten vor allem die sehr gut (HbA1c <59mmol/mol; Gruppe I) und mäßig gut (HbA1c <75mmol/mol; Gruppe II) eingestellten PatientInnengruppen höhere Mittelwerte der Gesamt-GS (beide 6,4  $\mu$ mol/l; Normwert 4,3–6,4  $\mu$ mol/l) als die schlecht eingestellten PatientInnen (HbA1c >75mmol/mol; Gesamt-GS 3,7 $\mu$ mol/l). In der Altersgruppe 6-11 Jahren (n=70) hatten die sehr gut eingestellten PatientInnen geringere Werte als die mäßig gut Eingestellten (3,8 vs. 5,0  $\mu$ mol/l; Normwert 3,6–5,1  $\mu$ mol/l), schlecht eingestellte PatientInnen fehlten. Signifikante Ergebnisse (p<0,05) konnten in der Altersgruppe >11 Jahren (n=19) festgehalten werden. Es zeigte sich, dass die Gesamt-GS in den Gruppen I (1,7 $\mu$ mol/l) und II (1,4 $\mu$ mol/l) niedriger als die Gesamt-GS der Kontrollgruppe (3,1–4,1 $\mu$ mol/l) waren; währenddessen die Gruppe III einen höheren Gesamt-GS-Wert (2,5 $\mu$ mol/l) präsentierte.

**Schlussfolgerung:** PatientInnen mit T1D zeigen Änderungen im GS-Metabolismus. Signifikant erniedrigte GS-Werte fanden sich bei Jugendlichen mit sehr guten und mäßig guten HbA1c-Werten. Daraus lässt sich erschließen, dass hohe Serum-Insulin-Spiegel zu einer Hemmung der GS-*de-novo*-Synthese führen. Aufgrund von abweichenden, nicht signifikanten, Werten bei anderen Altersgruppen muss diese Hypothese jedoch hinterfragt werden. Diese Arbeit soll die Basis für zukünftige prospektive Studien bilden, um andere beeinflussende Faktoren für den GS-Stoffwechsel bei T1D zu finden.

## Abstract

**Objective:** High levels of bile acids (BA) stimulate insulin release and therefore decrease serum glucose levels; in contrast, high glucose levels can upregulate BA synthesis. Type 1 diabetes (T1D) leads to hyperglycemia due to lack of endogenous insulin. We hypothesized that in children and adolescents with T1D BA levels vary coordinately with HbA1c, a longtime marker of glycemic control.

**Design:** HbA1c and BA (serum total BA, tBA, and BA profile) were measured in 116 fasted children and adolescents with T1D (age 3-20 years) under insulin therapy. Patients were divided into three groups according to their age: 3-5 years, 6-11 years and >11 years. These groups were further subdivided according to the HbA1c-values (I-III). The tBA values of the groups I-III were compared to a control-group (IV) with reference ranges. Using 10 µl of serum we determined by high-performance liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry a BA profile including 15 unconjugated and taurine- or glycine-conjugated BA; summed, the values for these analytes yield the tBA value.

**Results:** Patients 3-5 years (n=27) with very good (HbA1c <59mmol/mol; groupe I) and good (HbA1c <75mmol/mol; groupe II) HbA1c values showed elevated median tBA (both 6.4 µmol/l; normal values 4.3–6.4) in contrast to patients with HbA1c >75mmol/mol (3.7µmol/l). Patients 6-11 years (n=70) with optimal HbA1c levels had lower levels than patients with good HbA1c levels (3.8 vs. 5.0 µmol/l; normal values 3.6–5.1). In the group >11 years (n=19) significant (p<0.05) low tBa values (group 1: 1.7µmol/l; group 2: 1.4µmol/l) were reached compared to the control-group (3.1–4.1µmol/l)

**Conclusion:** This study shows that insulin therapy in T1D may influence the concentration of serum tBA. Adequate insulin therapy, as judged by HbA1c values, is associated with significant low tBA levels in adolescents. Due to inconsistent results in other age groups the hypothesis has to be re-evaluated. The pathways leading to changes in BA metabolism in T1D remain to be defined.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstatliche Erklärung	2
Danksagung	3
Zusammenfassung.....	4
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Hintergrund.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Gallensäuren (GS).....</b>	<b>14</b>
1.2.1 GS-Synthese .....	14
1.2.2 Enterohepatischer Kreislauf.....	14
1.2.3 Primäre und sekundäre GS .....	16
1.2.4 Konjugierte und unkonjugierte GS.....	17
1.2.5 Physikalische Eigenschaften.....	19
1.2.6 Physiologische Eigenschaften .....	20
1.2.7 GS- Transportsysteme .....	20
1.2.8 Kernrezeptoren .....	21
<b>1.3 Diabetes mellitus Typ 1.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Definition.....	22
1.3.2 Klassifikation nach Ätiologie .....	23
1.3.3 Diagnostik.....	24
1.3.4 Ätiopathogenese des T1D.....	27
1.3.5 Therapie .....	28
<b>1.4 Zusammenhang Glukose und GS .....</b>	<b>31</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 PatientInnen-Rekrutierung.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 GS- Messungen.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Methodik zur GS-Bestimmung im Serum .....</b>	<b>34</b>
2.3.1 Massenspektrometrie (MS).....	35
2.3.2 Chromatographie .....	36
2.3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	36
2.3.4 HPLC-MS/MS .....	37
<b>2.4 Normwerte .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5 Datenerhebung .....</b>	<b>39</b>
<b>2.6 Statistik.....</b>	<b>39</b>
<b>3 Ergebnisse – Resultate .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 PatientInnencharakterisierung.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Verteilung der Gesamt-GS.....</b>	<b>42</b>

3.2.1	Gesamt-GS-Verteilung: Altersgruppe 3-5 Jahren.....	42
3.2.2	Gesamt-GS-Verteilung: Altersgruppe 6-11 Jahren.....	43
3.2.3	Gesamt-GS-Verteilung: Altersgruppe >11 Jahren.....	44
<b>3.3</b>	<b>Verteilungsmuster der Gesamt-GS-Profile.....</b>	<b>46</b>
3.3.1	Glycin-konjugierte GS: Altersgruppe 3-5 Jahren .....	46
3.3.2	Glycin-konjugierte GS: Altersgruppe 6-11 Jahren .....	47
3.3.3	Glycin-konjugierte GS: Altersgruppe >11 Jahren .....	48
3.3.4	Taurin-konjugierte GS: Altersgruppe 3-5 Jahren .....	49
3.3.5	Taurin-konjugierte GS: Altersgruppe 6-11 Jahren .....	50
3.3.6	Taurin-konjugierte GS: Altersgruppe >11 Jahren .....	51
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Anhang - Projektplan .....</b>	<b>62</b>

## Glossar und Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
CDC	Chenodeoxycholsäure
CL	Cholsäure
CYP7A1	Cytochrom P450 Cholesterol 7-alpha- Hydroxylase
CYP7B1	Cytochrom P450 25-Hydroxycholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase
CYP8B1	Cytochrom P450 Sterol 12-alpha-Hydroxylase
CYP27A1	Cytochrom P450 Sterol 27-Hydroxylase
DC	Deoxycholsäure
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GC	Glykocholsäure
GCDC	Glykochenodeoxycholsäure
GDC	Glykodeoxycholsäure
GLC	Glykolithocholsäure
GS	Gallensäuren
Gesamt-GS	Gesamtgallensäuren
GUDC	Glykoursodeoxycholsäure

HPLC	High Performance liquid chromatography
LC	Lithocholsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
n	Anzahl
Pat.	PatientIn
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
T1D	Typ 1 Diabetes mellitus
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TDC	Taurodeoxycholsäure
TLC	Taurolithocholsäure
TUDC	Tauroursodeoxycholsäure
UDC	Ursodeoxycholsäure
z.B.	Zum Beispiel
↑	Erhöhter Wert
↓	Erniedrigter Wert

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf .....	15
Abbildung 2: GS-Entstehung .....	17
Abbildung 3: Chemische Verbindung der GS im menschlichen Organismus .....	18
Abbildung 4: Stereostruktur der CL .....	19
Abbildung 5: Interaktion verschiedener Faktoren in der Pathogenese des T1D .....	27
Abbildung 6: Zeitleiste: Insulin und seine Analoga .....	29
Abbildung 7: Wirkmechanismus von Insulin auf die GS-Synthese .....	31
Abbildung 8: Regulatorischen Reaktionsweges des FXR auf den ganzen Organismus .....	32
Abbildung 9: Massenspektrometer .....	35
Abbildung 10: Gesamt-GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren .....	43
Abbildung 11: Gesamt-GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren .....	44
Abbildung 12: Gesamt-GS in der Altersgruppe >11 Jahren .....	45
Abbildung 13: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren .....	47
Abbildung 14: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren.....	48
Abbildung 15: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe >11 Jahren.....	49
Abbildung 16: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren.....	50
Abbildung 17: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren.....	51
Abbildung 18: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe >11 Jahren.....	52

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: primäre GS.....	16
Tabelle 2: sekundäre GS.....	16
Tabelle 3: Taurin-konjugierte GS.....	17
Tabelle 4: Glycin-konjugierte GS.....	18
Tabelle 5: Diagnostische Grenzwerte für HbA1c.....	26
Tabelle 5: ADA-Kriterien zur Feststellung eines DM .....	25
Tabelle 7: Auflistung der 15 gemessenen GS .....	34
Tabelle 8: Normwerte der Gesamt-GS in unterschiedlichen Altersgruppen.....	38
Tabelle 9: Referenzbereich: Taurin-konjugierte GS in unterschiedlichen Altersgruppen ..	38
Tabelle 10: Referenzbereich: Glycin-konjugierte GS in unterschiedlichen Altersgruppen	38
Tabelle 11: PatientInnenverteilung der zugehörigen HbA1c-Gruppen.....	40
Tabelle 12: PatientInnenverteilung der entsprechenden Alters- und HbA1c-Gruppen.....	41
Tabelle 13: Gesamt-GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren.....	42
Tabelle 14: Gesamt-GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren.....	43
Tabelle 15: Gesamt-GS in der Altersgruppe >11 Jahren.....	45
Tabelle 16: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren.....	46
Tabelle 17: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren.....	47
Tabelle 18: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe >11 Jahren.....	48
Tabelle 19: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren.....	50
Tabelle 20: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren.....	51
Tabelle 21: Taurin-konjugierte GS Altersgruppe >11 Jahren .....	52

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Das medizinische Interesse im Forschungsbereich der Gallensäuren (GS) hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen. Da GS wie Hormone im Serum agieren, beeinflussen sie verschiedene physiologische Prozesse. Bei intestinalen und hepatologischen Erkrankungen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, primär sklerosierende Cholangitis) kann es zu einer Änderung in der Zusammensetzung kommen. Außerdem interagieren GS mit Glukose und Insulin.

Die Analyse und Profilerstellungen von GS sind schwierig, denn nur ein kleiner, in mikromolar messbarer, Anteil der GS befindet sich im Blutserum. Diese geringen Konzentrationen können nun sehr genau im klinischen Alltag mittels Massenspektrometrie gemessen werden. Somit nimmt die Bedeutung von GS als Biomarker zu. Das Ziel dieser Arbeit ist, die Änderungen des GS-Stoffwechsels im Rahmen des Insulin-abhängigen Diabetes Typ 1 näher zu untersuchen.

## 1.2 Gallensäuren (GS)

GS stellen das Endprodukt des Cholesterinstoffwechsels dar und werden mit einer durchschnittlichen Produktionsrate von 500-1000ml pro Tag in der größten menschlichen Drüse, der Leber, produziert [1]. Ein durch vier Ringen zusammengesetzter steroidhaltiger Kern stellt das Grundgerüst der GS dar. An den jeweiligen C-Atomen fügen sich OH- (Hydroxyl-) Gruppen an, die aus dem ursprünglichen unlöslichen und ungeladenen Molekül eine amphiphile, wasser- und membranlösliche, Struktur erzeugen. Die Anzahl der Hydroxylgruppen entscheidet darüber, ob es sich um eine hydrophile oder hydrophobe GS handelt. Zusammen mit Phospholipiden, dem Gallenfarbstoff Bilirubin, Cholesterin, Elektrolyte und Wasser bilden sie die Gallenflüssigkeit [2].

### 1.2.1 GS-Synthese

Im Zytosol der Hepatozyten werden die GS zum einen direkt vor Ort synthetisiert und zum anderen via Endozytose aus dem Blutkreislauf in die Gallenkanalikuli abgesondert. Es werden zwei Biosynthese-Wege beschrieben, die die Umwandlung des Cholesterins in die primären GS, Cholsäure (CL) und Chenodeoxycholsäure (CDC), vermitteln. Es wird zwischen einem klassischen und einem alternativen Weg unterschieden. Der neutrale (klassische) Weg beinhaltet die Hydroxylation des Cholesterins, welches von der **CYP7A1** (Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase) katalysiert wird. Die Entstehung der CL erfolgt u.a. auch über die **CYP8B1** (Sterol-12 $\alpha$ -Hydroxylase). Der alternative Syntheseweg beschreibt die Entstehung der primären GS aus Cholesterin über die Oxidation mittels **CYP27A1** (Sterol-27-Hydroxylase) und **CYP7B1** (25-Hydroxycholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase) [2-4].

### 1.2.2 Enterohepatischer Kreislauf

Der enterohepatische Kreislauf erstreckt sich über Leber, Gallengang, Darm und Portalblut [1]. Angefangen bei den Hepatozyten, die für die Sezernierung der konjugierten GS zuständig sind, gelangen jene über die Gallenkanalikuli in die Gallenblase, ihrem Speicherort. Von dort aus werden die GS nach Erfordernis ins Duodenum und weiter zum terminalen Ileum abgegeben. Hier können ca. 95% der GS durch die Enterozyten über einen Na<sup>+</sup>-Co-Transporter sekundär-aktiv zur basolateralen Membran diffundieren und

resorbiert werden. Mit Hilfe spezifischer Transportproteine werden die absorbierten GS über die Pfortader zurück zur Leber geführt [5]. Es kristallisiert sich somit der enterohepatische Kreislauf heraus, der eine Verbindung zwischen Leber und Darm beschreibt (Abb. 1). Der Anteil an konjugierten GS, der nicht reabsorbiert wird, führt seinen Weg ins Kolon fort, wo die sekundären GS entstehen (s. u.). Diese werden entweder passiv aufgenommen oder über den Stuhl ausgeschieden [2, 6-11].

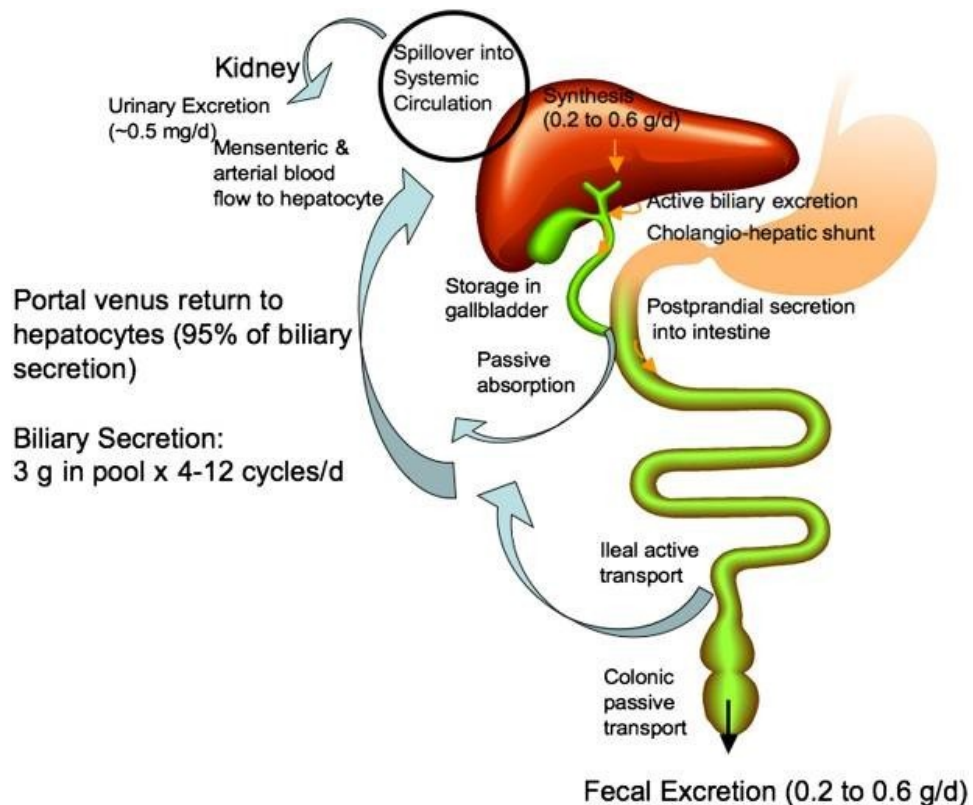


Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf [3]

Der GS-Bestand beträgt insgesamt 3g, wobei 0,2-0,6g an GS täglich über den Faeces ausgeschieden werden. Äquivalent dazu wird dieser GS-Anteil, die 0,2-0,6g, täglich neu synthetisiert. Der Recyclingsmechanismus wird 4-12x pro Tag durchlaufen.

### 1.2.3 Primäre und sekundäre GS

Prinzipiell werden die GS in zwei Gruppen unterteilt: primäre und sekundäre GS. Die Unterscheidung beruht allein auf ihren Entstehungsort. Ursprünglich haben sie alle gemeinsam, dass sie Syntheseendprodukte des Cholesterinstoffwechsels sind (Abb. 2). Die primären GS werden in den Hepatozyten synthetisiert. Hingegen entstehen die sekundären GS im distalen Dünndarmabschnitt durch Dehydroxylierung enteraler Bakterien.

Zu den primären GS zählen u.a. die Cholsäure (CA, cholic acid) und die Chenodeoxycholsäure (CDCA, chenodeoxycholic acid). Sekundäre GS sind bspw. die Deoxycholsäure (DCA, deoxycholic acid) und die Ursodeoxycholsäure (UDCA, ursodeoxycholic acid) beide entstanden aus CA. Die dritt genannte sekundäre GS ist die Lithocholsäure (LA, lithocholic acid), synthetisiert aus der CDCA [2].

<b>CA</b>	Cholsäure
<b>CDCA</b>	Chenodeoxycholsäure

**Tabelle 1: primäre GS**

<b>DCA</b>	Desoxycholsäure
<b>LA</b>	Lithocholsäure
<b>UDCA</b>	Ursodeoxycholsäure

**Tabelle 2: sekundäre GS**

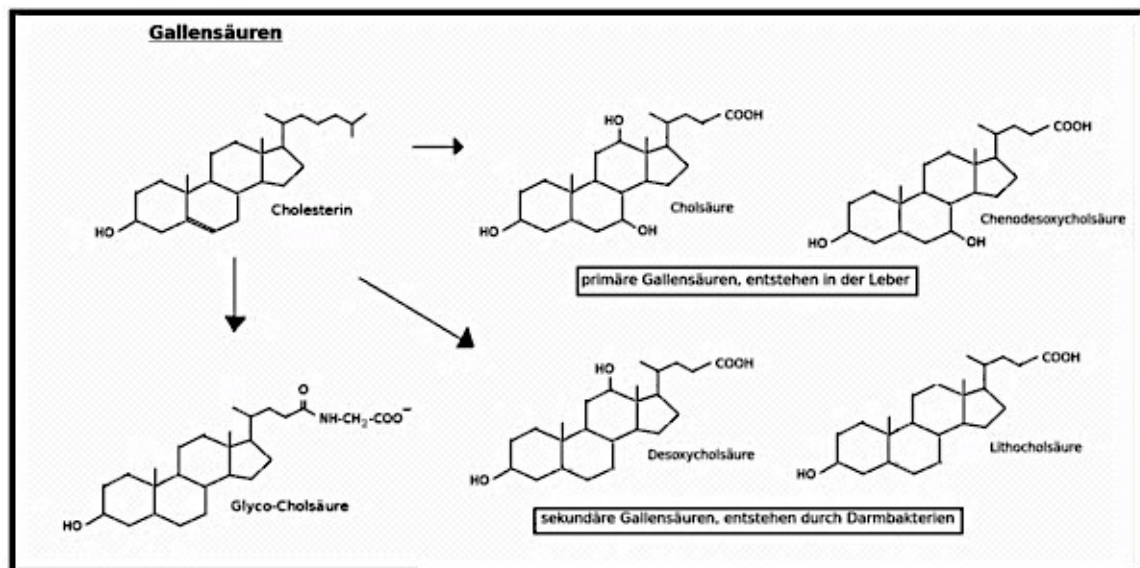


Abbildung 2: GS-Entstehung

### 1.2.4 Konjugierte und unkonjugierte GS

Nach abgeschlossener Biosynthese des Cholesterins zu den GS, ist es möglich, an verschiedenen C-Atomen Aminosäuren anzulagern. Dadurch lassen sich die GS in konjugierte und unkonjugierte GS klassifizieren.

Noch vor der Ausschleusung aus den Hepatozyten wird ein Großteil der GS an Taurin oder Glycin gebunden (Abb. 3). Im erwachsenen menschlichen Organismus überwiegen die Glycin-konjugierten GS (Tab. 4), wohingegen die Taurin-konjugierten GS (Tab. 3) nur einen kleinen Teil der GS-Gesamtmenge ausmachen. Die Konjugation ist essentiell für die Impermeabilität gegenüber Zellmembranen und ermöglicht eine Persistenz auch in hohen Konzentrationen im Galle- und Darminhalt. Sie ist dementsprechend als Schutz anzusehen und entstanden durch die Konversion einer schwachen Säure in eine starke Säure [2].

<b>TCA</b>	Taurocholsäure
<b>TCDC</b>	Taurochenodeoxycholsäure
<b>TDCA</b>	Taurodeoxycholsäure
<b>TLA</b>	Taurolithocholsäure
<b>TUDCA</b>	Tauroursodeoxycholsäure

Tabelle 3: Taurin-konjugierte GS

<b>GCA</b>	Glycocholsäure
<b>GCDCA</b>	Glycochenodeoxycholsäure
<b>GDCA</b>	Glycodeoxycholsäure
<b>GLA</b>	Glycolithocholsäure
<b>GUDCA</b>	Glykoursodeoxycholsäure

Tabelle 4: Glycin-konjugierte GS

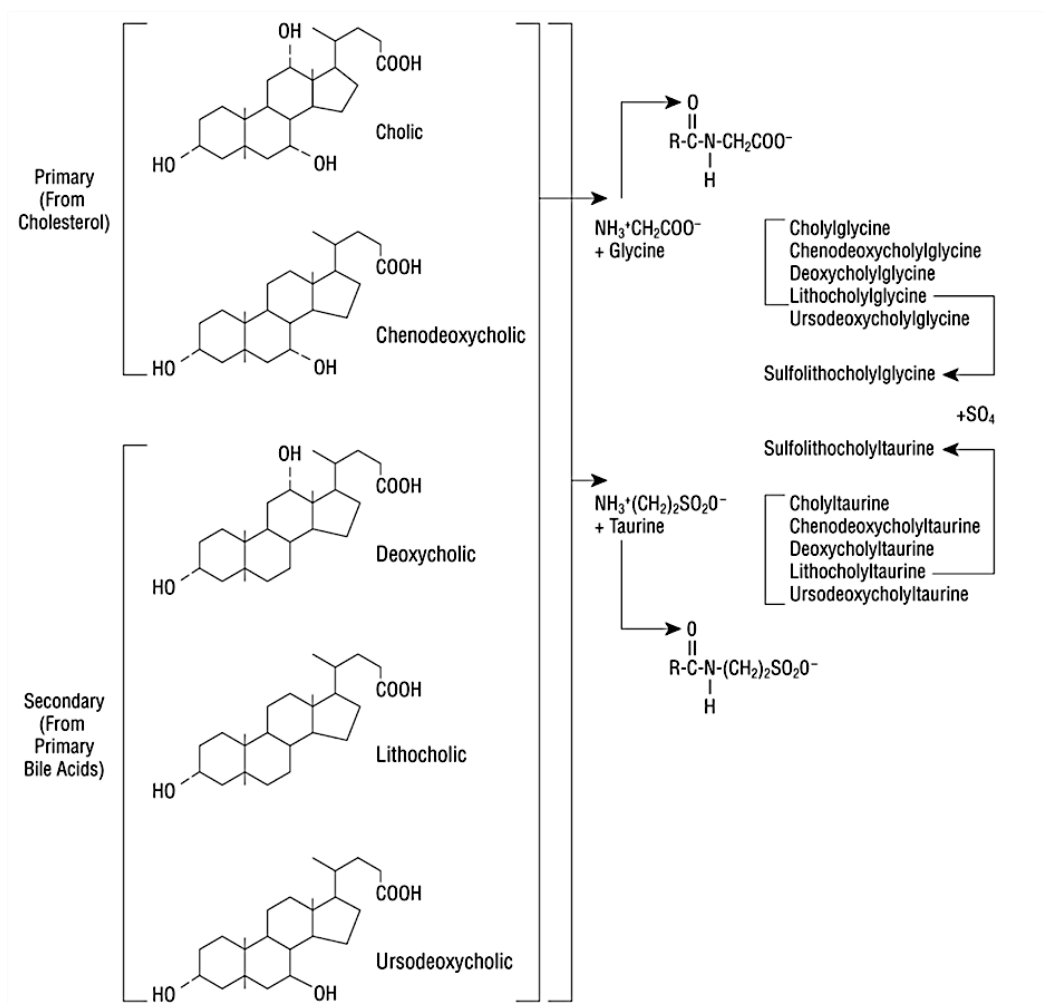


Abbildung 3: Chemische Verbindung der GS im menschlichen Organismus [2]

## 1.2.5 Physikalische Eigenschaften

Die amphiphatische Struktur zählt zu den wichtigsten physiologischen Eigenschaften der GS. Sie entsteht durch die Existenz einer hydrophilen Seite ( $\alpha$ -face, konkav niedrige Seite) und einer hydrophoben Seite ( $\beta$ -face, konvex hohe Seite) (Abb. 4). Entlang der  $\alpha$ -Seite orientieren sich die Hydroxylgruppen, wohingegen die Carboxyl- und Methylgruppen auf der  $\beta$ -Seite liegen. Diese Struktur ermöglicht eine große Oberflächenaktivität und befähigt die GS in wässriger Lösung zur Mizellenausbildung, wodurch bspw. der Lipidtransport und die Cholesterinausscheidung im Intestinaltrakt ermöglicht wird [1].

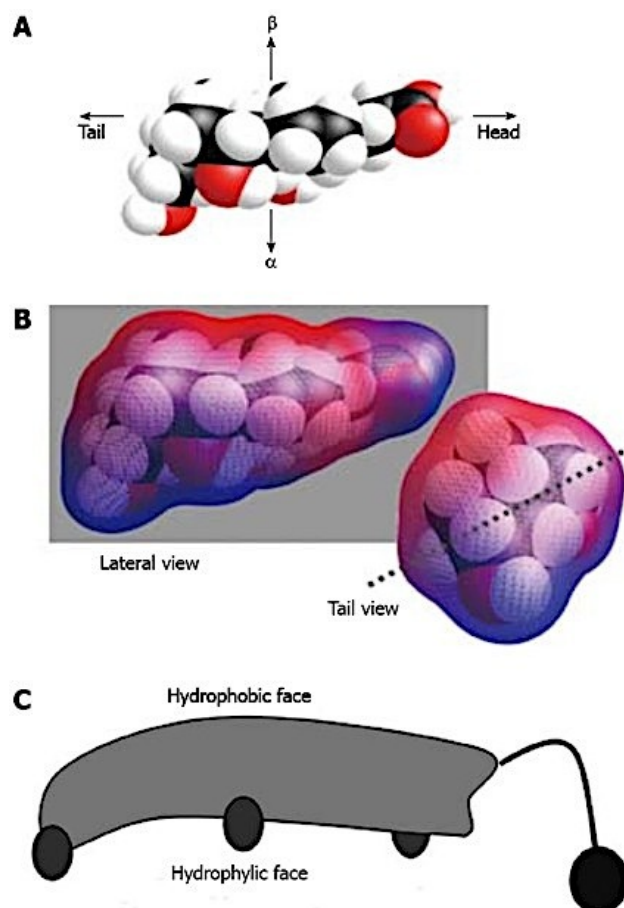


Abbildung 4: Stereostruktur der CL, A: 3D Modell; B: Darstellung des molekularen- lipophilen Potentials. Die blaue Farbe zeigt die polare, rot die unpolare Oberfläche; C: Schematische Darstellung von CL[1]

## 1.2.6 Physiologische Eigenschaften

GS spielen eine wesentliche Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselprozessen im menschlichen Körper. Im Lipidstoffwechsel sind sie essentiell für die Fettabsorption. Aufgrund ihres amphiphatischen Verhalten vermögen es die GS, Nahrungsfette zu emulgieren und fettlösliche Vitamine aus dem Gastrointestinaltrakt zu absorbieren [6]. Biliäre Phospholipide verbinden sich mit den GS und werden zu Mizellen, welche u.a. Cholesterin und weitere lipophile Verbindungen der Galle solubilisieren. Ferner wird die Kalziumabsorption aus dem Darm durch die GS begünstigt. Eine antimikrobielle Eigenschaft zeigt sich durch die Prävention eines übersteigenden bakteriellen Wachstums im Dünndarm [1, 2, 12].

## 1.2.7 GS- Transportsysteme

Um die Neusynthese der GS so gering wie möglich zu halten, wird ein Großteil der GS aus dem terminalen Ileum reabsorbiert. Dafür stehen dem menschlichen Organismus verschiedene Transportmechanismen zur Verfügung. Im Folgenden sollen nur die wichtigsten Transportsysteme genannt werden.

Über den apikalen  $\text{Na}^+$ -abhängigen GS- Transporter **ASBT** (apical sodium dependent bile salt transporter) werden die konjugierten GS in die Darmzellen eingeschleust. Der intrazelluläre Transport durch die Enterozyten erfolgt über **I-BABP** (ileal bile acid binding protein) zu der basolateralen Membran. Dort werden sie über das **MRP3** (multidrug resistance protein) in den Pfortaderkreislauf übergeführt. Die  $\text{Na}^+$ -abhängigen GS-Transporter sind ausschließlich im Ileum vorhanden, wohingegen MRP3 auch in geringem Maße im Colon zu finden ist. Im Duodenum ist das MRP3 jedoch kaum nachweisbar. Die hohe Expressionrate der Transportproteine im terminalen Ileum ermöglicht das Zustandekommen des enterohepatischen Kreislaufes und somit die Aufnahme der GS in den Pfortaderkreislauf [4, 13].

### 1.2.8 Kernrezeptoren

GS agieren als Liganden für bestimmte Kernrezeptoren, die in der Leber und im Darm synthetisiert werden. Kernrezeptoren dienen als Transkriptionsfaktoren und vermögen es, bestimmte Genexpressionen zu aktivieren wie auch zu inhibieren. Eine wesentliche Aufgabe ist es, die Expression von Membranproteinen durch Aktivierung der Kernrezeptoren zu beeinflussen [4, 13]. Eine entscheidende regulierende Rolle für der GS-Synthese und des GS-Transports nimmt der **FXR** (Farnesoid X Rezeptor) ein, welcher als intrazellulärer Transkriptionsfaktor fungiert [14, 15]. Dieser wird vor allem durch die hydrophoben GS aktiviert, wie beispielsweise die CDC. Hydrophile GS, wie die UDCA und Taurin-konjugierte GS, haben kaum einen Einfluss auf den FXR Liganden [10]. Vor allem in der Leber, in Muskeln, im Fettgewebe und im Pankreas ist er nachweislich vorhanden [15]. Expressionsorte sind hingegen Leber, Darm, Niere und Nebenniere; weniger Fettgewebe, Herz und Pankreas [16].

Durch Aktivierung des Liganden wird die Expression des intrazellulären Transporters **I-BABP** begünstigt und dementsprechend auch die GS-Aufnahme. Gleichzeitig vermindert FXR die GS-Biosynthese, da dieser inhibierend auf das geschwindigkeitsbestimmende GS-Synthese-Enzym **CYP7A1** wirkt. Diese regulatorischen Aufgaben des FXR sind sehr entscheidend für die GS-Homöostase. Letztendlich kontrollieren die GS selbst nach dem Prinzip eines negativen Feedbackmechanismus ihre eigene Synthese. Ohne jegliche Inhibitionsvorgänge der GS-Synthese würden sich die GS in der Zelle akkumulieren und folglich käme es zu Parenchymschäden, hepatischem Zelltod bis hin zu einer Cholestase [3, 4, 13, 16-19]. Derzeitige Überlegungen befassen sich damit, welchen Einfluss der FXR in therapeutischer Hinsicht auf Stoffwechselerkrankungen, wie bspw. Diabetes mellitus Typ I/II, nehmen kann. Der Zusammenhang zwischen GS und Diabetes wird im folgenden erläutert: Kapitel 1.4 [20].

## **1.3 Diabetes mellitus Typ 1**

### **1.3.1 Definition**

Diabetes mellitus (DM) ist eine Stoffwechselerkrankung unterschiedlicher Ätiologie, charakterisiert durch die beiden Leitsymptome chronische Hyperglykämie und Glukosurie. Man unterscheidet vier Typen von DM. Beim Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) liegt eine Störung der Insulinsekretion (absoluter Insulinmangel) vor, bei Diabetes mellitus Typ 2 eine Störung der Insulinwirkung (Insulinresistenz) und in weiterer Folge auch eine Störung der Insulinsekretion (zuerst relativer, dann absoluter Insulinmangel; siehe unten). 5% aller Diabetiker leiden unter T1D, im Kinder- und Jugendalter liegt bei 95% ein T1D vor [22, 23].

Charakteristische Symptome, die für eine Erstmanifestation des T1D sprechen, sind: Polyurie, Polydipsie, Enuresis und Gewichtsverlust, trotz ausreichender Nahrungsaufnahme und langanhaltendes Hungergefühl. Müdigkeit, verminderte Konzentrations- und Leistungsbereitschaft werden auch oft seitens der PatientInnen angegeben. Symptome wie Nausea, Übelkeit und Azetongeruch aus dem Mund sprechen für eine einsetzende Ketoazidose. Diese können sich als Bewusstseinstörungen bis hin zum Koma äußern. Unter Umständen kann eine Ketoazidose als primäres Symptom auftreten [23, 24].

### 1.3.2 Klassifikation nach Ätiologie

Im Jahr 1999 verfasste die WHO eine Klassifikation, die nach den Leitlinien der ADA (American Diabetes Association) folgende Kriterien mit einbezieht [21, 23]:

#### I. Typ 1 Diabetes (T1D)

Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, die zu einem absoluten Insulinmangel führt. Häufigste Diabetesform bei Kindern und Jugendlichen [21, 23].

#### II. Typ-2-Diabetes mellitus (T2D)

Ist die häufigste Diabetesform im Erwachsenenalter und auch zunehmend bei adipösen Kindern und Jugendlichen der westlichen Welt zu beobachten. Mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad ist dieser durch drei wesentliche Faktoren gekennzeichnet: (1) Genetisch bedingte Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem absoluten Insulinmangel im späteren Krankheitsverlauf, (2) sekretorischer Defekt der  $\beta$ -Zellen und (3) fortschreitende Apoptose der  $\beta$ -Zellen. Assoziationen mit anderen Problemen des metabolischen Syndroms sind häufig [21, 23].

#### III. Andere spezifische Diabetes-Typen

- Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z.B. zystische Fibrose, Pankreatitis, Hämochromatose)
- Endokrinopathien (z.B. Cushing-Syndrom, Akromegalie, Phäochromozytom)
- Medikamentös-chemisch induziert (z.B. Glukokortikoide, Neuroleptika, Alpha-Interferon, Pentamidin)
- Genetische Defekte der  $\beta$ -Zell-Funktion (z.B. MODY-Formen 1-11)
- Genetische Defekte der Insulinwirkung
- Andere genetische Syndrome, die mit einem Diabetes assoziiert sein können
- Seltene immunologisch bedingte Form

#### **IV. Gestationsdiabetes**

Erstmals während der Schwangerschaft auftretende oder diagnostizierte Glukosetoleranzstörung. Dies schließt ein:

- Erstmanifestation eines T1D
- Erstmanifestation eines T2D
- Erstmanifestation anderer spezifischer Diabetes-Typen (Präkonzeptionell manifester, aber nicht diagnostizierter T2D), vor allem anzunehmen bei Glukosetoleranzstörung bereits im 1. Trimenon.

### **1.3.3 Diagnostik**

Die klinischen Symptome veranlassen diagnostische Maßnahmen, um einen Diabetes mellitus festzustellen. Folgende Werte und Symptome sprechen für eine Erkrankung [21, 23, 25]:

#### **I. Anamnese**

Symptome, die seitens der PatientInnen angegeben werden: [21, 23, 25, 26]

- Polyurie
- Polydipsie
- Enuresis
- Gewichtsverlust
- Müdigkeit, Abgeschlagenheit
- Verminderte Leistungs- und Konzentrationsbereitschaft

#### **II. Labordiagnostik**

- Bestimmung der Blutglukose

Das Kapillarblut gibt uns Auskunft über die Blutglukosewerte. Bei Nüchternblutglukosewerten von  $>110\text{mg/dl}$  bzw.  $>6,1\text{mmol/l}$  spricht man bereits

von Diabetes, da die Blutglukosewerte aus dem Kapillarblut ca. 10% niedriger sind als im Plasma [21].

Auch über die venöse Blutabnahme lassen sich die Blutglukosewerte bestimmen. Nüchternblutglukosewerte ab einem Wert von  $\geq 126$ mg/dl bzw.  $\geq 7$ mmol/l weisen auf einen Diabetes hin (siehe Tab. 5) [27].

- **Oraler-Glukose-Toleranz-Test (OGTT)**

Die Diagnosefeststellung des Diabetes richtet sich nach folgenden erhobenen Richtwerten [21, 25]:

Stadium	Nüchtern-Plasma-Glukose (venös)	Gelegenheitsblutzucker	OGTT
<b>Diabetes</b>	$\geq 126$ mg/dl ( $\geq 7$ mmol/l)	$\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/mol) + Symptome	2h-Wert = $\geq 200$ mg/dl ( $> 11,1$ mmol/mol)
<b>Gestörte Glukosetoleranz</b>	100-125mg/dl (5,6-6,9mmol/l)		Gestörte Glukosetoleranz 2h-Wert= 140-199mg/dl (7,8-11,1mmol/mol)
<b>Normalbefund</b>	$< 100$ mg/dl ( $< 5,6$ mmol/mol)		2h-Wert $< 140$ mg/dl ( $< 7,8$ mmol/l)

**Tabelle 5: ADA-Kriterien zur Feststellung eines DM modifiziert nach [27]**

- Bestimmung der Elektrolyte und des Säure-Basen-Haushaltes
- Bestimmung der Glukose im Harn (Wir sprechen von einer Glukosurie ab einer Glukosemenge von 200-3000g/d im Harn [25])
- Bestimmung der Ketonkörper im Blut und im Harn (Bei einer diabetischen Ketoazidose können Werte über  $> 3,0$ mmol/mol  $\beta$ - Hydroxybutyrat gemessen werden [24] )
- Bestimmung der Autoantikörper

Autoantikörper interagieren mit spezifischen Inselzellkörpern. Mit Hilfe von sensitiven Radioimmunoessays können diese ermittelt werden. Folgende Autoantikörper können nachgewiesen werden [23, 28, 29].

- Inselzellantikörper (ICA)
- Insulinautoantikörper (IAA)
- Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD)
- Antikörper gegen Tyrosinphosphatase (IA-2 und IA-2 β)
- Zink Transporter 8 (ZNT8)

### III. HbA1c

Das glykolisierte Hämoglobin der Erythrozyten dient als wichtigstes Kriterium zur Beurteilung der Blutzuckereinstellung der letzten zwei Monate. Die durchschnittliche Überlebensdauer der Erythrozyten beläuft sich auf 110-120 Tage und kann aus diesem Grund als Qualitätsbewertung zu Rate gezogen werden. Das HbA1c beschreibt die nichtenzymatische Bindung von Glukose an das N-terminale Valin der β-Kette des Hämoglobins. Diese Form der Glykolisierung ist irreversibel und kann somit bis zum Zelluntergang des Erythrozyten bestimmt werden. Die HbA1c Analyse beruht auf unterschiedliche Methoden, wobei vor allem immunologische Testverfahren eingesetzt werden. Die DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) für T1D PatientInnen und die UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) für T2D PatientInnen kamen in großen klinischen Studium zu dem Ergebnis, dass das Erreichen normaler HbA1c-Werte bei Diabetikern eine entscheidende Reduktion der diabetischer Folgeerkrankungen mit sich führt [27]. Tabelle 6 zeigt die diagnostischen Grenzwerte des zu bestimmenden HbA1c-Wertes. Seit 2010 wurde die Einheit in % nach „National Glycohemoglobin Standardization Program“ (NGSP) durch die Einheit mmol/mol nach „International Federation of Clinical Chemistry“ (IFCC) abgelöst. Aus übersichtlichen Gründen sind die Grenzwerte beider Organisationen aufgeführt [30].

	HbA1c (%) nach NGSP	HbA1c (mmol/mol) nach IFCC
<b>Diabetes mellitus</b>	≥6,5	≥48
<b>Kein Diabetes mellitus</b>	<5,7	<39
<b>Grenzbereich; OGTT empfohlen</b>	5,7-6,4	39-47

Tabelle 6: Diagnostische Grenzwerte für HbA1c modifiziert nach[30]

### 1.3.4 Ätiopathogenese des T1D

Die häufigste Diabetesform bei Kindern und Jugendliche ist der T1D. Aufgrund autoimmunologischer Zerstörung der Insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas geht der relative Insulinmangel dem absoluten Insulinmangel voraus. In 85- 90% konnten bei den jungen PatientInnen Autoimmunmarker nachgewiesen werden (siehe oben: ICA, IAA, GAD, IA2, ZNT8).

Wie es genau zu der autoimmunen  $\beta$ -Zellzerstörung kommt, konnte bislang ätiologisch nicht vollständig geklärt werden. Genetische Prädispositionen und exogene Faktoren, wie beispielsweise: Virusinfektionen, Umwelteinflüsse, Ernährungsfaktoren aber auch psychosoziale Begebenheiten scheinen die Krankheitsentstehung zu begünstigen [22, 28, 31-35] (Abb. 5)

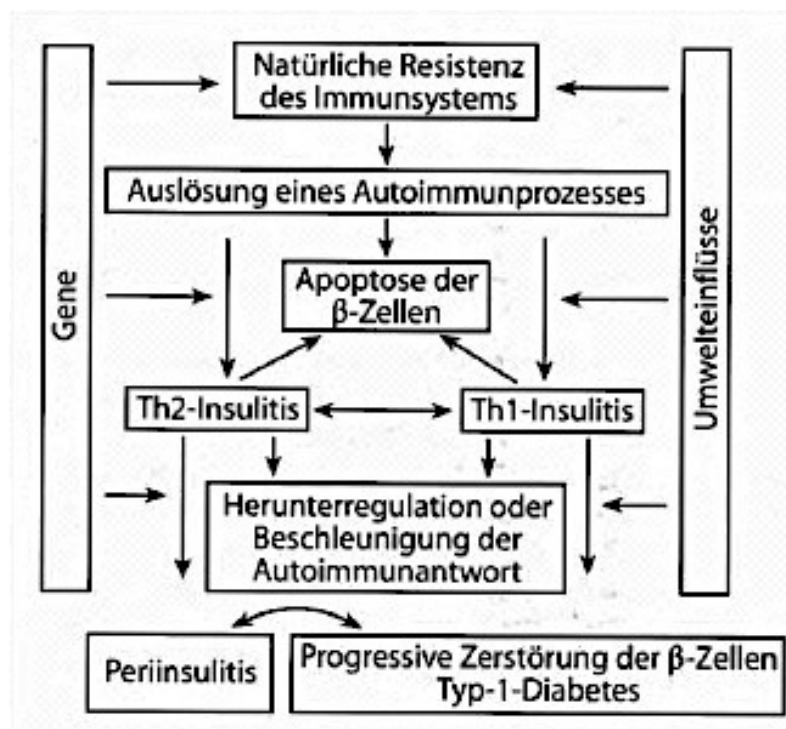


Abbildung 5: Interaktion verschiedener Faktoren in der Pathogenese des T1D ( modifiziert nach:[36] )

### **Aktuelle Hypothesen zur T1D-Entstehung:**

Eine große Bedeutung in der Entstehung der  $\beta$ -Zellzerstörung wird derzeit dem Zusammenspiel genetischer Prädisposition (HLA-Genloci) und Umwelteinflüsse zu gesprochen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sowohl die HLA-Risikoallele als auch die Umwelteinflüsse von örtlichen Regionen und Populationen variieren können [31].

Th1-Hypothese: Th1-Zellen sezernieren inflammatorische Zytokine, die eine Signalkaskade zur Apoptose der  $\beta$ -Zellen des Pankreas auslösen. Dazu gehören Interleukin-1 $\beta$  (IL-1), Interferon (IFN)-  $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)-  $\alpha$ . Diese können allein oder in Kombination eine Apoptose in primären  $\beta$ -Zell-Kulturen bewirken. Die derzeitigen Vorstellungen der Autoimmunpathogenese des T1D lauten wie folgt [33]:

- IL-1 und Zytokine führen mit B-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, K-Zellen und Endothelzellen als Effektormoleküle zu einem Zelluntergang der  $\beta$ -Zellen
- Zytotoxische T-Zellen und/oder autoantikörperinduzierte Prozesse bewirken Gewebsschäden in den Inseln des Pankreas

Untersuchungen ergaben, dass nicht jeder Entzündungsvorgang mit einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen einhergeht. Es wird zwischen einer benignen und destruktiven Insulitis unterschieden, die auf unterschiedlicher Histologie und lokal-synthetisierte Zytokine beruhen. Zu den benignen Zytokinen zählen Th1-Zytokine, zu den destruktiven Zytokinen hingegen die Th2-Zytokine. Eine benigne Th1-Insulitis führt nicht zu einer vollständigen  $\beta$ -Zellzerstörung, weswegen keine therapeutische Insulinsubstitution erforderlich ist. Die destruktive Th2-Insulitis jedoch manifestiert den T1D [22, 23, 28, 32].

### **1.3.5 Therapie**

Das Ziel der Behandlung bei T1D PatientInnen besteht in der Substitution von Insulin unter Vermeidung von Hyperglykämien und Hypoglykämien. Aufgrund des Insulinmangels muss eine Insulinsubstitution als Therapieform erfolgen. Im Jahre 1922 wurde das Insulin entdeckt. Seither ist die Forschung bestrebt, Therapieformen zu verbessern und weiter zu entwickeln. (s. Abb. 6) [28].

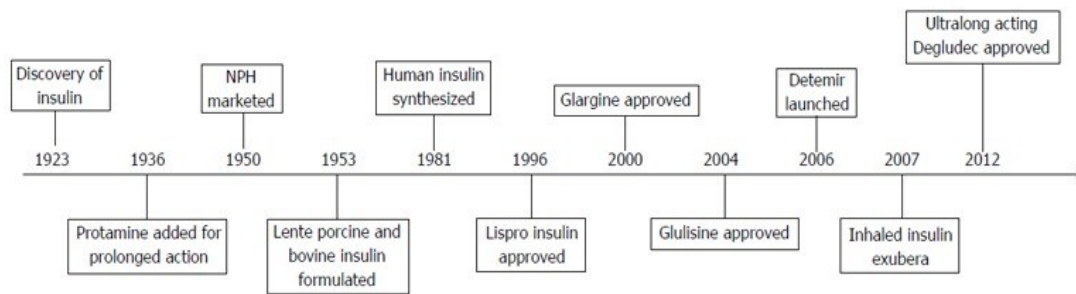


Abbildung 6: Zeitleiste: Insulin und seine Analoga modifiziert nach[37]

Insuline und Insulinanaloga gehören zu den Standardpräparaten der T1D Therapie. Wir unterscheiden grundsätzlich zwischen drei Behandlungsformen:

- Konventionelle Insulintherapie
- Intensivierte Basis-Bolus-Insulintherapie
- Therapie mit Insulinpumpen

Die **konventionelle Insulintherapie** wurde in der Diabetologie vor allem in den 1980er Jahren angewendet. Der/die PatientIn injiziert zweimal täglich, vor dem Frühstück und vor dem Abendessen ein Verzögerungsinsulin in Kombination mit oder ohne eines Normalinsulins. Das Verhältnis zwischen morgendlicher und abendlicher Insulinsubstitution liegt bei  $\frac{2}{3}$  zu  $\frac{1}{3}$ . Es ist wichtig, dass der/die PatientIn sich an einem Insulinplan sowie an einem fest vorgegebenen Diätplan hält, da diese Art der Therapie nicht die physiologische Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen imitiert. Der Normalinsulinanteil sollte an das aktuelle Ergebnis der Blutzuckermessung adaptiert sein, während das Verzögerungsinsulin konstant gehalten werden kann [38].

Die häufigste angewandte Therapieform ist die **intensivierte Basis-Bolus-Therapie (ICT= intensified conventional insulin therapy)**. In Form von Insulin-Pens oder Einmalspritzen fügt der/die PatientIn sich ein- oder mehrmals täglich ein langwirksames Insulinanalogon oder ein Verzögerungsinsulin zu. Verzögerungsinsuline sind Insuline, denen verschiedene Stoffe beigemischt werden, die die Aufnahme aus dem subkutanen Fettgewebe oder den Insulinabbau im Blut verzögern. Sie erreichen dadurch eine langanhaltende Wirkung von mehreren Stunden. Bei langwirkenden Insulinanaloga ist zudem die molekulare Grundstruktur verändert, die zu einem verzögerten Abbau führt.

Insulinanaloga ähneln nur noch in gewissen Punkten dem richtigen Insulin und heißen deswegen Analoga [27].

Das Prinzip der Basis-Bolus-Therapie ist, dass im Serum eine konstante Basalrate vorliegt (=langwirksames Insulin) und zu den Mahlzeiten ein Bolus appliziert wird (=kurzwirksames Insulin). Kurzwirkende Insuline bzw. Insulinanaloga werden vor allem zu jeder Nahrungsaufnahme und Blutzuckerkorrektur eingesetzt. Sie wirken schneller, dafür aber auch nur eine kurze Zeitdauer. Aufgrund der molekularen Strukturänderung verzeichnen die kurzwirkenden Insulinanaloga einen schnelleren Wirkeintritt und eine kürzere Wirkdauer besonders im Vergleich zu den kurzwirkenden Humaninsulinen [27, 38].

Die **Insulinpumpentherapie** (CSII continous subcutaneous insulin infusion) ist die physiologischste Form der Insulinsubstitution und wird vor allem in der Schwangerschaft und bei Kindern, insbesondere Säuglinge und Kleinkindern, eingesetzt. Der Unterschied besteht nur in der Verabreichungsart. Es werden ausschließlich kurzwirkende Insuline bzw. kurzwirkende Insulinanaloga verwendet. Das Pumpensystem erleichtert dem/der PatientIn die Insulindosis dem Insulinbedarf anzupassen. Halb- bzw. stündlich werden die vom Arzt zuvor programmierten Dosierungen an Basalinsuline (Basalrate) mittels eines Katheters über eine Nadel ins Unterhautfettgewebe abgegeben. Zu jeder Mahlzeit und zur Korrektur kann der/die PatientIn durch variable Bolusoptionen zusätzliche Insulingaben induzieren. Alle 48-72 Stunden sollte ein Wechsel der Katheter erfolgen, solange kann die Nadel jedoch in der Haut verbleiben. Es ist zu beachten, dass ein regelmäßiger Wechsel der Einstichsstelle erfolgt, um Lipohypertrophien zu vermeiden, [27, 38].

## 1.4 Zusammenhang Glukose und GS

Die Leber, gleichzeitig auch der Produktionsort der GS, spielt eine entscheidende Rolle im Glukosestoffwechsel, da dies das Hauptorgan für die Glukoneogenese und der Glykogensynthese darstellt [20]. Der Zusammenhang zwischen Glukose und GS sieht wie folgt aus:

Gemeinsam mit der Nahrungsaufnahme steigt der Glukosewert im Blut an. Über Rezeptoren, die die Blutglukosekonzentration messen, werden die  $\beta$ -Zellen des Pankreas angeregt, Insulin zu sezernieren. Glukose stimuliert gleichzeitig die FXR-Expression und wirkt somit als indirekter Aktivator der GS-Synthese. Insulin hingegen inhibiert die FXR-Expression und folglich die GS-Synthese aus Cholesterin. Das **CYP7A1**-Enzym nimmt einen wichtigen Platz in der GS-Synthese ein. Sowohl die **PI3K** (phosphoinositide-3-kinase)/ **AKT** (protein kinase B) als auch der **SHP**-Transporter (Small heterodimer partner- transporter) wirken inhibierend auf den **FOXO1**-Rezeptor (Forkhead box protein O1), welcher hingegen aktivierend auf das **CYP7A1**-Enzym wirkt. Dies führt dazu, dass die GS-de-novo-Synthese verhindert wird [15, 18, 19, 39, 40], (Abb. 7).

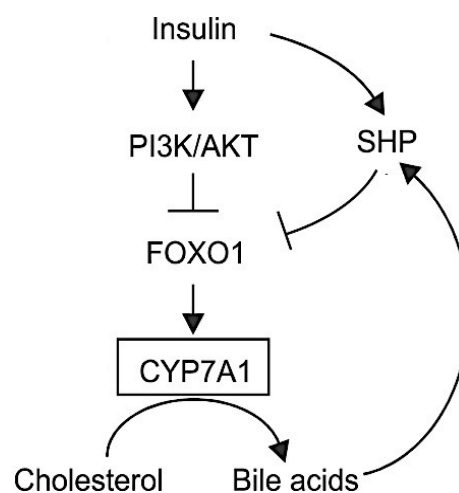


Abbildung 7: Wirkmechanismus von Insulin auf die GS-Synthese [41]

Außerdem nimmt FXR eine aktivierende Wirkung auf das SHP-Enzym ein. Die inhibierende Wirkung des SHP auf das GR (Glucocorticoid receptor) und die HNF $\alpha$  (Hepatocyte nuclear factor 1 alpha) zieht eine aktivierende Wirkung auf die PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) und eine damit verbundene Hemmung der Glukoneogenese nach sich [20].

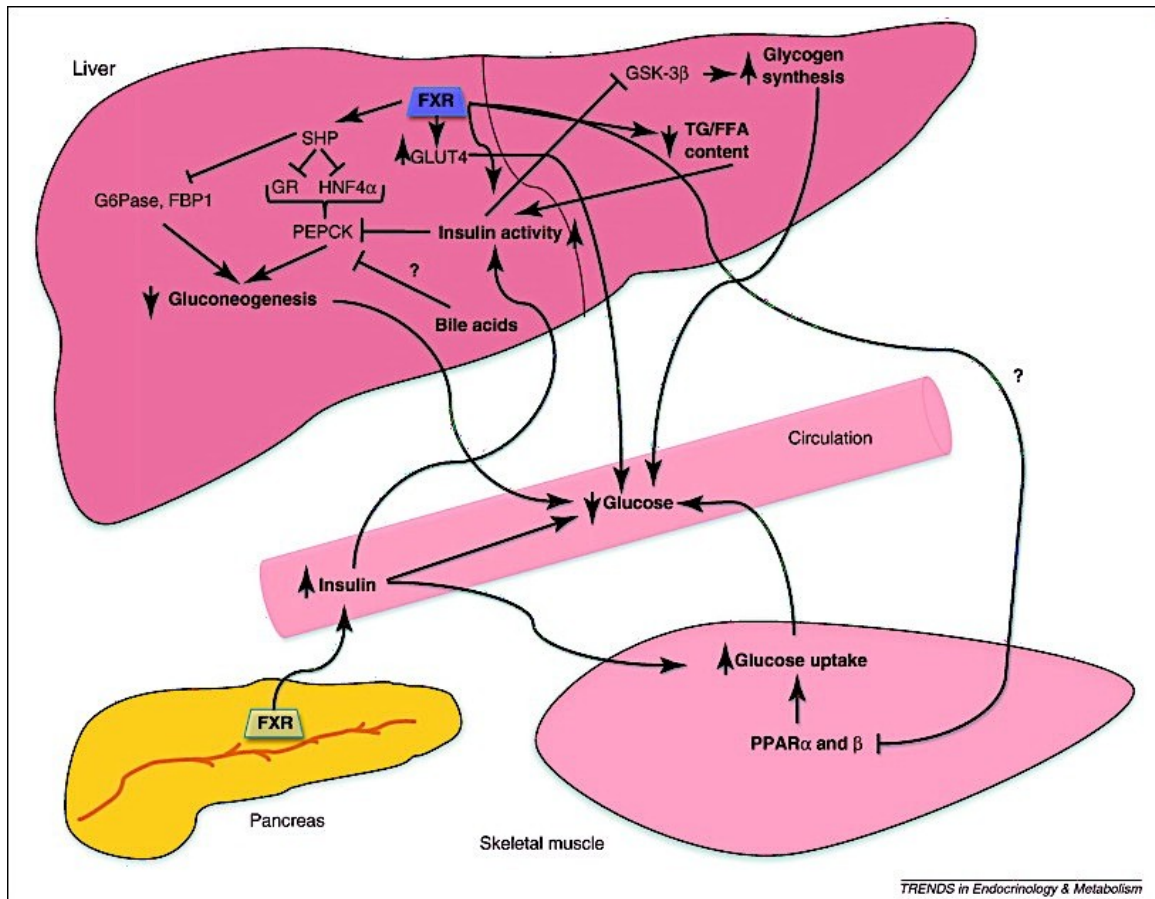


Abbildung 8: Vereinfachte schematische Darstellung des regulatorischen Reaktionsweges des FXR auf den ganzen Organismus [20]

Schlussfolgernd bedeutet dies, dass bei einer hohen Hyperglykämie die GS-*de-novo*-Synthese über die Insulinsekretion gehemmt wird und sich somit der GS-Spiegel im Blut erniedrigt. Gleichzeitig bewirkt die Insulinsekretion auch eine Hemmung der Glukoneogenese. Aufgrund des hohen Insulinmangels bei nicht therapierten PatientInnen mit T1D, kann die GS-Synthese über die genannten Pathways nicht gehemmt werden. Es wäre somit eine Erhöhung des GS-Serumspiegels bei unzureichend behandeltem T1D zu erwarten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 PatientInnen-Rekrutierung

Bei Kindern und Jugendlichen mit T1D wurden in der Ambulanz für Diabetes und Endokrinologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde der Medizinischen Universität Graz regelmäßige Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Dabei wurden serologische Parameter gemessen und dokumentiert. Die für diese Studie relevanten Einschluss- und Ausschlusskriterien (s.u.) wurden überprüft, um weitere Untersuchungen nach erfolgter Blutbildmessung durchzuführen. Hierzu wurde das vorhandene EDTA-Blut von MitarbeiterInnen des Klinischen Institutes für Medizinische und Chemische Labordiagnostik (KIMCL) der Medizinischen Universität Graz zentrifugiert, das EDTA-Plasma gewonnen und im Anschluss tiefgefroren. Mittels des EDTA-Plasmas kann der Gesamt-GS-Wert und das der einzelnen GS-Profile durch Massenspektrometrie (s.u. Kapitel 2.3.1) gewonnen werden. Ein Ethikkommissionsbescheid lag vor (24-549 ex 11/12) . Die Datensammlung der Blutproben erfolgte im Zeitraum von November 2013 bis Oktober 2014.

#### **Einschlusskriterien:**

- T1D
  - Erstmanifestation (EM)
  - Insulinpflichtig
- Lebensalter: 3 - 20 Jahre
- Infektfrei
- Erfassung von PatientInnendaten (Alter, Geschlecht, EM etc.)

### Ausschlusskriterien

- T2D
- Insulinpflichtiger Diabetes im Rahmen einer anderen Grunderkrankung (z.B. Zystische Fibrose)

### Laborwerte

- HbA1c
- Gesamt-GS im Serum
- GS-Profil (Unkonjugierte und konjugierte GS mit Glycin und Taurin)

## **2.2 GS- Messungen**

Das KIMCL ermöglichte die Analyse unserer PatientInnenproben. Gesamt-GS-Konzentrationen und das GS-Profil konnten aus dem EDTA Plasma der Proben ermittelt werden. Unsere Messungen beschränkten sich auf fünf wesentliche GS, davon zählen zwei zu den primären und drei zu den sekundären GS. Die GS wurden jeweils in der Gruppierung Taurin-Konjugate und Glycin-Konjugate untersucht; somit wurden 10 GS bestimmt (Tab. 5).

TUDC Taoursodeoxycholsäure	GUDC Glycoursodeoxycholsäure
TC Taurocholsäure	GC Glycholsäure
TCDC Taurochenodeoxycholsäure	GCDC Glycochenodeoxycholsäure
TDC Taurodeoxycholsäure	GDC Glycodeoxycholsäure
TLC Tauroolithocholsäure	GLC Glycolithocholsäure

**Tabelle 7: Auflistung der 15 gemessenen GS (Summe entspricht der Gesamt-GS)**

## **2.3 Methodik zur GS-Bestimmung im Serum**

Die Komplexität der Molekülstruktur der GS und niedrigen GS-Konzentrationen im Serum verlangen eine aufwändige Analysetechnik. Das GS-Profil, welches sich aus den Einzelkomponenten des GS-Spektrums zusammensetzt, wird ermittelt, in dem man jene GS mit gleichem Molekulargewicht vor der Detektion chromatographisch mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography,

HPLC) auftrennt. Früher hat u.a. auch die Gaschromatographie mit und ohne Massenspektrometrie Anwendung erfahren. Eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht man zusätzlich durch Kombination der Chromatographie mit der Massenspektrometrie [42-46].

### 2.3.1 Massenspektrometrie (MS)

Ziel der MS ist es, organische und anorganische Substanzen basierend auf ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Das Massenspektrometer ist von vier essentiellen Bauteilen geprägt: [47, 48] (s. Abb.: 9).

1. Probeneinlasssystem
2. Ionenquelle (Ionenentstehung)
3. Massenanalysator (Ionentrennung)
4. Ionendetektor

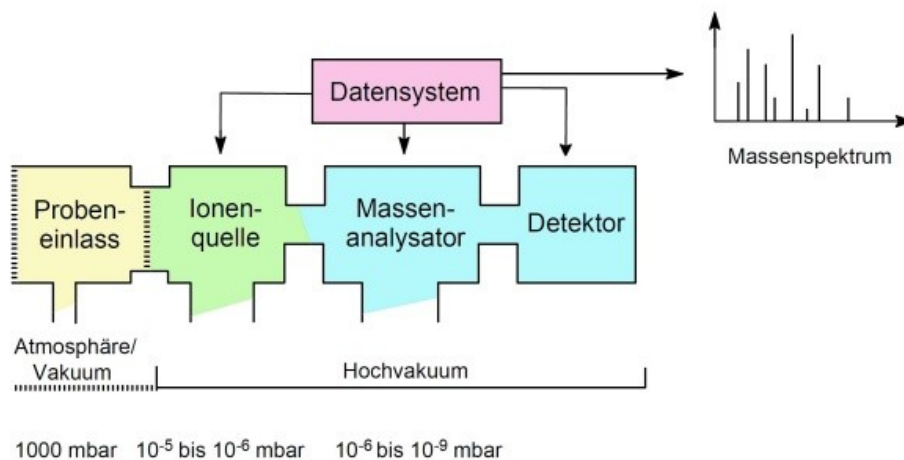


Abbildung 9: Massenspektrometer [49]

Eine Substanz wird in eine Ionisierungskammer eingeführt und unter Vakuum versetzt. Durch Erwärmung bzw. Erhitzen verdampft diese und wird ionisiert. Die Ionisation kann u.a. thermisch durch elektrische Felder als auch durch energiereichen Elektronenbeschuss der Probe erfolgen. Statische oder dynamisch elektrische Felder sowie magnetische Felder ermöglichen die Trennung der Ionen. Die gewonnenen Ionen werden anschließend mittels eines elektrischen Feldes beschleunigt und gelangen letztendlich in den Massenanalysator. In diesem befindet sich ein magnetisches Feld, welches die Ionen nach ihrer Masse ablenkt

und detektiert. Das Datensystem erhält Informationen aus der Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor, um letztendlich das Massenspektrum auszuwerten.

### **2.3.2 Chromatographie**

Die Chromatographie zählt zu den Analysemethoden, die Stoffgemische in ihre einzelnen Bestandteile auftrennen. Die angewandte Technik beruht auf die unterschiedliche Verteilung des Untersuchungsmaterials in zwei Phasen. Hierzu wird zunächst die Substanz in eine mobile Phase, gasförmig oder flüssig, übergeführt. Anschließend wird die mobile Phase über eine stationäre Phase, einer Flüssigkeit oder einem Feststoff, geleitet welche in einer Säule fixiert ist. Die einzelnen Bestandteile des Untersuchungsmaterials verlassen je nach Intensität der Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase und dem Analyt zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Trennsäule und damit die ursprüngliche Probe. Es ergibt sich dadurch eine charakteristisch zeitliche Sequenz für jeden einzelnen Stoff. Das Chromatogramm erfasst alle daraus resultierenden Detektionssignale. Ein sauber getrennter Einzelstoff erscheint in Form eines Peaks, wodurch eine Identifikation erstellt werden kann [50, 51].

### **2.3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Flüssige Substanzen können mittels HPLC analysiert werden. Ein Laufmittel, die sogenannte mobile Phase, wird mit der zu bestimmenden Substanz verbunden. Dieses Konglomerat wird anschließend in einer Trennsäule gepresst, in der sich die stationäre Phase befindet. Wechselwirkungen der mobilen und der stationären Phase bewirken eine unterschiedliche Verweildauer in der Trennsäule. Der Detektor kann nun zwischen den einzelnen Komponenten differenzieren. Der Schreiber nimmt hält diese Veränderung als Peak auf einem Chromatogramm fest [52, 53].

### **2.3.4 HPLC-MS/MS**

Die komplexe Struktur der GS verlangt die Anwendung eines zusätzlichen Trennverfahrens bevor die Analyse mit dem Massenspektrometer beginnen kann. Bei unseren Analysen verwendeten wir die Verknüpfung zweier Verfahren - der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) und der (Flüssigkeitschromatographie) HPLC. Die HPLC unterstützt die Auftrennung der GS, während die MS die mathematische Berechnung vollzieht. Das Zusammenspiel beider Analyseverfahren ermöglicht eine Verbesserung der Spezifität und der Sensitivität. Eine Optimierung der Selektivität kann mittels der Aneinanderreihung zweier Massenspektrometer erzielt werden [54-56].

## **2.4 Normwerte**

In der Literatur sind bisher nur wenige Normwerte bzw. Referenzbereiche von GS im Serum, die mit den oben genannten Verfahren ermittelt werden können, beschrieben worden. Meine Studienkollegin B. Stering hat im Rahmen ihrer Diplomarbeit „Bestimmung von Normwerten der Gallensäuren im Serum bei Kindern und Jugendlichen“ an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz Referenzbereiche definiert [57]. 194 infektfreie Kinder und Jugendliche ohne jegliche Grunderkrankungen konnten in ihrer Arbeit mit einbezogen werden. Sie setzte GS-Werte in Bezug zu unterschiedlichen Altersgruppen und stellte Differenzen heraus. Im Verlauf ihrer Analyse wurde ersichtlich, dass die GS-Werte im Serum post partum kontinuierlich steigen und ihr Punktum Maximum zwischen dem 6. und 24. Lebensmonat erreichen. Mit dem zweiten Lebensjahr sind die Gesamt-GS-Werte rückläufig. Mit dem 11. Lebensjahr unterliegen sie keinen Schwankungen mehr. Aufgrund dieser Ergebnisse konnten die GS-Werte der Kinder und Jugendlichen in fünf Altersgruppen unterschieden werden. Diese Ergebnisse verglichen wir mit den Unsrigen, um Übereinstimmungen, erniedrigte oder erhöhte Werte in Bezug zum altersentsprechenden Vergleichskollektiv definieren zu können. Da für uns nur die Altersgruppen 3-5 Jahren, 6-11 Jahren und >11 Jahren relevant sind, sind die dazu gehörigen Normwerte in der folgenden Tabelle (Tab. 6) aufgelistet [57,58]:

Alter	Normwerte ( $\mu\text{mol/l}$ )
3-5 Jahre	4,3–6,4
6–11 Jahre	3,6–5,1
> 11 Jahre	3,1–4,1

**Tabelle 8: Normwerte der Gesamt-GS in unterschiedlichen Altersgruppen [57]**

Um die einzelnen GS im Profil in der folgenden Datenauswertung näher zu betrachten, sind die Normwerte und Referenzbereiche im Folgenden zu jeder einzelnen GS dargestellt (Tab. 7 - 9) [57,58].

Altersgruppe	TUDC	TC	TCDC	TDC	TLC
3-5J.	0,03-0,09	0,09-0,29	0,29-0,98	0,03-0,13	0,02-0,09
6-11J.	0,03-0,07	0,00-0,13	0,00-0,47	0,06-0,13	0,04-0,09
>11J.	0,02-0,05	0,01-0,10	0,01-0,34	0,03-0,08	0,02-0,06

**Tabelle 9: Referenzbereich: Taurin-konjugierte GS in unterschiedlichen Altersgruppen; Einheit  $\mu\text{mol/l}$  [57]**

Altersgruppe	GCDC	GC	GDC	GUDC	GLC
3-5J.	1,54-2,54	0,73-1,26	0,10-0,36	0,11-0,36	0,04-0,13
6-11J.	1,35-2,07	0,65-1,02	0,32-0,50	0,20-0,37	0,03-0,10
>11J.	0,99-1,46	0,42-0,67	0,26-0,38	0,19-0,31	0,07-0,11

**Tabelle 10: Referenzbereich: Glycin-konjugierte GS in unterschiedlichen Altersgruppen; Einheit  $\mu\text{mol/l}$  [57]**

## **2.5 Datenerhebung**

Nachdem die PatientInnen den Ein- und Ausschlusskriterien zugeordnet wurden, konnten Laborergebnisse (Gesamt-GS und GS im Profil) gesammelt werden. Zu jedem/r PatientIn wurden die HbA1c Werte hinzugefügt, die zuvor aus dem Krankenhausinformationssystem „Medocs“ entnommen wurden. Anhand dieser Daten ließen sich nun die PatientInnen grundsätzlich in folgende Gruppen zuordnen:

- |                         |                                |
|-------------------------|--------------------------------|
| 1. HbA1c <59 mmol/mol   | sehr gute Therapieeinstellung  |
| 2. HbA1c 59-75 mmol/mol | mäßig gute Therapieeinstellung |
| 3. HbA1c >75 mmol/mol   | schlechte Therapieeinstellung  |

Aus einem Gesamtkollektiv von 116 PatientInnen konnten alle in die weitere Auswertung mit einbezogen werden. Es war entscheidend, die PatientInnen nach erfolgter Kategorisierung in die HbA1c-Gruppen in die entsprechenden Altersgruppen aufzuteilen, da jede Altersgruppe unterschiedliche Normwerte, in Bezug auf die Gesamt-GS-Zahl und GS-Profile, aufweist.

Der nächste Schritt bestand darin, die gesammelten PatientInnendaten in eine Excel-Datei einzufügen. So konnten wir in den darauffolgenden Schritten Bezüge und Vergleiche zwischen den HbA1c- und den Altersgruppen darstellen. Unberücksichtigt und für unsere Arbeit nicht relevant bleiben die unterschiedlichen Therapieformen jedes/jeder einzelnen/r PatientIn.

## **2.6 Statistik**

Mittelwerte wurden mittels Microsoft Office Excel 2007 errechnet. Mit Hilfe des Statistikprogrammes "IBM SPSS Statistics 22" wurden Standardabweichungen ermittelt und mittels Mann-Whitney U-Tests wurde die Signifikanz berechnet. Werte unter 0,05 wurden als signifikant definiert.

## 3 Ergebnisse – Resultate

### 3.1 PatientInnencharakterisierung

In unsere Studie konnten insgesamt 116 PatientInnen eingeschlossen werden. Die Gliederung unserer PatientInnen richtete sich nach den gemessenen HbA1c-Werten. Somit konnten wir drei wesentliche Gruppen (I-III) mit unterscheiden: Die Gruppe IV ist die Kontrollgruppe, die dadurch charakterisiert ist, dass diese die Normwerte der Gesamt-GS und GS im Profil enthält. Eine jede Gruppe (I-IV) wurde anschließend eine der drei Altersgruppen zugeteilt: 3-5 Jahre, 6-11 Jahre und >11 Jahre, da jede Altersgruppe unterschiedliche Normwerte vorgibt.

- I. HbA1c: <59 mmol/mol
- II. HbA1c: 59-75 mmol/mol
- III. HbA1c: >75 mmol/mol
- IV. Kontrollgruppe

Die Tabelle 11 zeigt die Verteilung der PatientInnen in den zugehörigen Gruppen. Insgesamt konnten 27 PatientInnen in einer Altersverteilung von 4-20 Jahren der ersten Gruppe (I) zugeordnet werden. Die zweite Gruppe (II) umfasst die größte PatientInnenzahl mit 70. Auch in dieser Gruppe beträgt die Altersverteilung 3-20 Jahren. Mit 19 PatientInnen wird die dritte zu untersuchende Gruppe (III) beschrieben, mit einer Altersverteilung von 3-20 Jahren. Die Kontrollgruppe (IV) wird aus 151 PatientInnen gebildet; auch hier findet sich die Altersverteilung von 3-20 Jahren.

	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>n</b>	27	70	19	151
<b>Alter (Jahre)</b>	4-20	4-20	3-20	3-20

Tabelle 11: PatientInnenverteilung der zugehörigen HbA1c-Gruppen

In einem weiteren Analyseschritt wurde jede(r) PatientIn der zu untersuchenden Altersgruppe (3-5 Jahren, 6-11 Jahren und >11 Jahren) zugeordnet, um die Ergebnisse mit den dazu gehörigen Referenzbereichen der GS im Serum vergleichen zu können. Die Tab. 12 zeigt die Altersverteilung der PatientInnen in den Gruppen:

	<b>3-5J.</b>	<b>6-11J.</b>	<b>&gt;11J.</b>	<b>Gesamt</b>
<b>I</b>	1	5	21	27
<b>II</b>	3	18	49	70
<b>III</b>	3	-	16	19
<b>IV</b>	21	42	88	151

**Tabelle 12: PatientInnenverteilung der entsprechenden Alters- und HbA1c-Gruppen**

## 3.2 Verteilung der Gesamt-GS

Um die einzelnen Gesamt-GS eines/r jeden/r PatientIn vergleichen zu können, werden die Mittelwerte einer jeden Gruppe (I-IV) und der dazu gehörigen Altersgruppe aufgelistet. Hierzu werden die Standardabweichungen und die Signifikanz berechnet. Der Vollständigkeit ergänzend wurde zudem auch die Anzahl der PatientInnen und das 95%ige-Konfidenzintervall angegeben.

### 3.2.1 Gesamt-GS-Verteilung: Altersgruppe 3-5 Jahren

Im Folgenden betrachten wir die Mittelwerte der Gesamt-GS in den dazu gehörigen Altersgruppen. In der Altersgruppe 3-5 Jahren finden wir in der Gruppe I einen Mittelwert von  $6,36\mu\text{mol/l}$  mit einer Signifikanz von  $p=0,58$ . Eine Standardabweichung konnte aufgrund der zu geringen PatientInnenzahl nicht angegeben werden. In der Gruppe II haben wir den höchsten Mittelwert mit  $6,37\mu\text{mol/l}$ . Die Standardabweichung beträgt  $3,59\text{mg/l}$  und die Signifikanz  $p=0,36$ . Die Gruppe III hält einen Wert von  $3,68\text{mg/l}$  mit einer Standardabweichung von  $1,26$  inne. Die Signifikanz in dieser Gruppe beträgt  $0,36$ . Zusammen konnten in dieser Altersgruppe nur 7 PatientInnen charakterisiert werden. Die zu vergleichende Kontrollgruppe beinhaltet 21 PatientInnen. Der berechnete Mittelwert in der Kontrollgruppe lautet  $5,03\mu\text{mol/l}$  mit einer Standardabweichung von  $2,27$ .

	Mittelwert $\mu\text{mol/l}$	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
<b>I</b>	6,36	-	1	-3,62 - 6,29	0,58
<b>II</b>	6,37	3,59	3	-1,65 - 4,33	0,36
<b>III</b>	3,68	1,26	3	-4,33 - 1,65	0,36
<b>IV</b>	5,03	2,27	21	4,27 - 6,43	

Tabelle 13: Gesamt-GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren

Betrachten wir nun die Mittelwerte in Form einer Grafik, ist zu erkennen, dass die Gruppen mit einem sehr guten und einem mäßig gut eingestellten HbA1c-Wert (= Gruppe I und II)

höhere Mittelwerte und damit höhere Gesamt-GS-Konzentrationen aufweisen, als die schlecht eingestellten PatientInnen mit T1D. Der Mittelwert der Gruppe III ist niedriger als der zu vergleichende Mittelwert an Gesamt-GS der Kontrollgruppe.

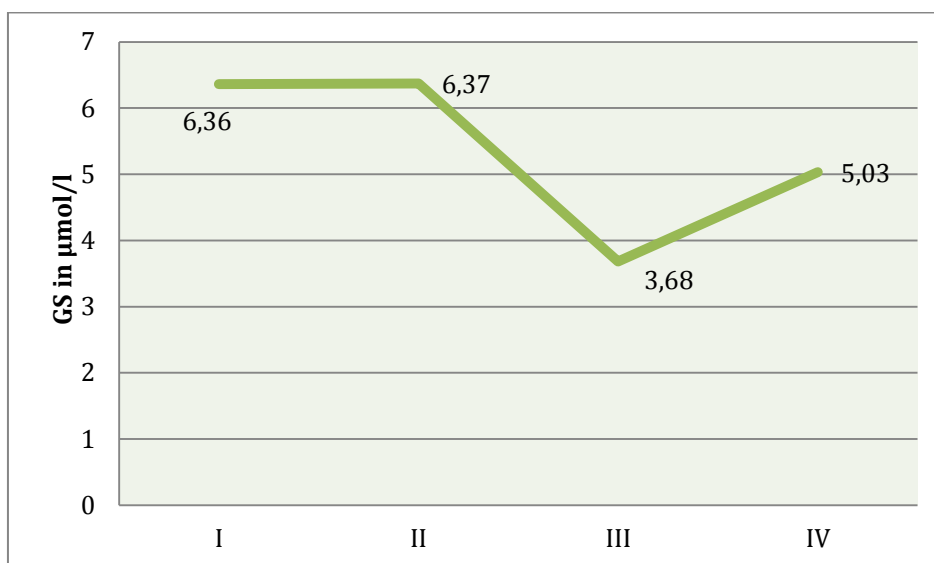


Abbildung 10: Gesamt-GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren

### 3.2.2 Gesamt-GS-Verteilung: Altersgruppe 6-11 Jahren

In der Altersgruppe 6-11 Jahren sind nur zwei Gruppen mit der Kontrollgruppe zu vergleichen. In der ersten Gruppe, mit 5 PatientInnen finden wir einen Mittelwert der Gesamt-GS von 3,8µmol/l. Die Standardabweichung beträgt 2,84 und die Signifikanz 0,58. In der zweiten Gruppe konnten insgesamt 18 PatientInnen eingeschlossen werden. Hier lautet der Gesamt-GS-Mittelwert 5,08µmol/l mit einer Standardabweichung von 4,4 und einer Signifikanz von 0,36. Die Kontrollgruppe umfasst die größte PatientInnendichte mit einer Anzahl von 42, einem Mittelwert der Gesamt-GS von 4,42µmol/l und einer Standardabweichung von 2,72.

Gruppe	Mittelwert µmol/l	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	3,8	2,84	5	-3,62 - 6,29	0,58
II	5,02	4,40	18	-1,65 - 4,33	0,36
IV	4,42	2,72	42	3,61- 5,14	

Tabelle 14: Gesamt-GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren

In der Altersgruppe 6-11 Jahren ist zu berücksichtigen, dass keine PatientInnen einer schlechten Therapieeinstellung zuzuordnen sind. Die Mittelwerte der Gesamt-GS-Konzentration der Gruppe I und II ordnen sich nahezu gleich um den Mittelwert der dazugehörigen Vergleichsgruppe an.

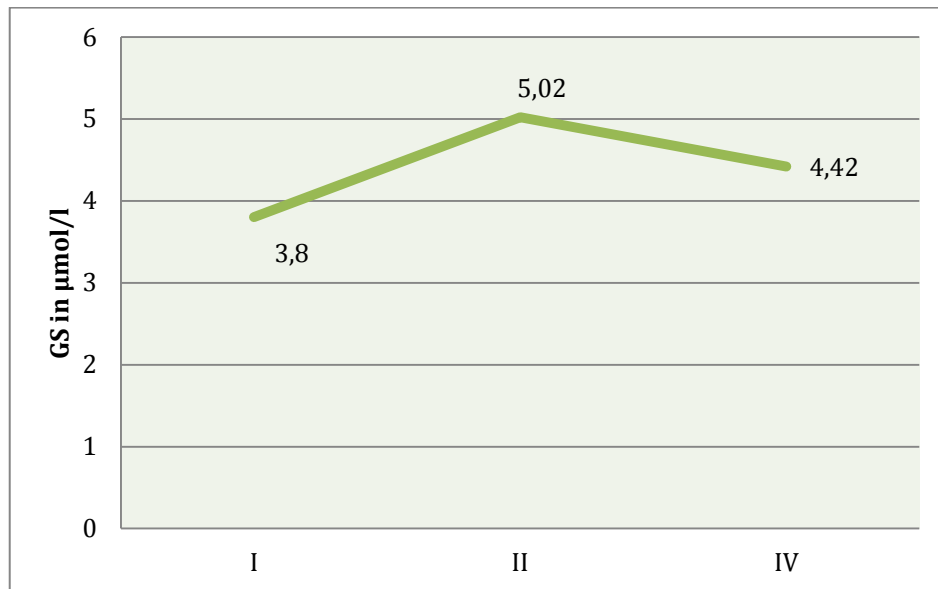


Abbildung 11: Gesamt-GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren

### 3.2.3 Gesamt-GS-Verteilung: Altersgruppe >11 Jahren

Die Altersgruppe >11 Jahren ist durch die höchste PatientInnenanzahl charakterisiert. In der ersten Gruppe konnten 21 PatientInnen eingeschlossen werden. Der Gesamt-GS-Mittelwert beträgt  $1,68\mu\text{mol/l}$  mit einer Standardabweichung von 1,78 und einer Signifikanz von 0,04. Die Gruppe II umfasst insgesamt 49 PatientInnen und ist damit die größte zu untersuchende Gruppe in dieser Altersgruppe.  $1,36\mu\text{mol/l}$  zählt der Gesamt-GS-Wert, die Standardabweichung 1,19 und die Signifikanz ist mit 0,00 zu beschreiben. Die Gruppe III umfasst 16 PatientInnen. Der Gesamt-GS-Mittelwert umfasst  $2,53\mu\text{mol/l}$ . Die Standardabweichung wurde mit 3,45 und die Signifikanz mit 0,97 berechnet. 88 PatientInnen konnten in der Kontrollgruppe mit einbezogen werden. Der Durchschnittswert der Gesamt-GS beträgt  $3,66\mu\text{mol/l}$  und die Signifikanz 1,87.

Gruppe	Mittelwert $\mu\text{mol/l}$	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	1,68	1,78	21	-1,64 - (-)0,31	0,04
II	1,36	1,19	49	-1,74 - (-) 0,56	0,00
III	2,53	3,45	16	-0,88 - 0,91	0,97
IV	3,66	1,87	88	3,09 - 4,12	

Tabelle 15: Gesamt-GS in der Altersgruppe >11 Jahren

In der Altersgruppe >11 Jahren ist in der graphischen Darstellung ersichtlich, dass die Kontrollgruppe mit Abstand den höchsten Mittelwert an Gesamt-GS-Konzentrationen aufweist. Die sehr und mäßig eingestellten PatientInnen zeigen niedrige Gesamt-GS-Konzentrationen im Gegensatz zu der Gruppe, der schlecht eingestellten Diabetes-PatientInnen. Wobei dieser Mittelwert der schlecht eingestellten PatientInnen am nächsten an der Kontrollgruppe liegt.

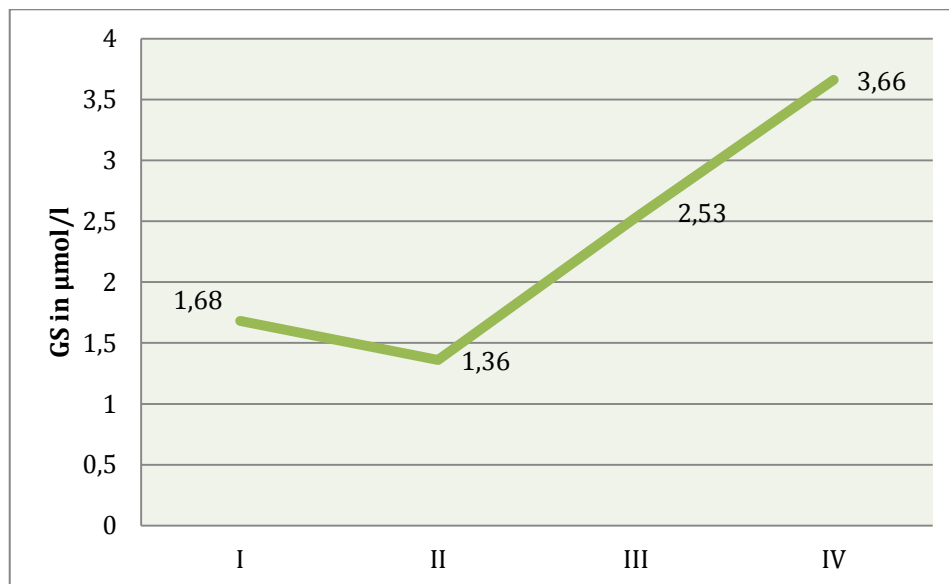


Abbildung 12: Gesamt-GS in der Altersgruppe >11 Jahren

### 3.3 Verteilungsmuster der Gesamt-GS-Profile

Um die Zusammensetzung der Gesamt-GS darstellen zu können, betrachten wir nun im nächsten Schritt die einzelnen Mittelwerte der Gesamt-GS-Komponenten: Glycin-konjugierte GS und Taurin-konjugierte GS. Zunächst erfolgt die Beschreibung der Glycin-konjugierten GS.

#### 3.3.1 Glycin-konjugierte GS: Altersgruppe 3-5 Jahren

In der Altersgruppe 3-5 Jahren finden wir einen Mittelwert in der Gruppe I von 4,56µmol/l. Die Signifikanz wurde mit 0,55 berechnet. Eine Standardabweichung konnte aufgrund der niedrigen PatientInnenanzahl nicht angegeben werden. In der Gruppe II liegt der Mittelwert der Glycin-konjugierten GS bei 4,02µmol/l mit einer Standardabweichung von 2,21 und einer Signifikanz von 0,6. Die Gruppe III weist den niedrigsten Durchschnittswert mit 1,98µmol/l auf. Die Standardabweichung ist sehr gering 0,24, wie auch die Signifikanz 0,23. Die Kontrollgruppe trägt als mittleren Wert 3,4µmol/l mit einer Standardabweichung von 1,92.

Gruppe	Mittelwert µmol/l	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	4,56	-	1	-2,78 - 5,1	0,55
II	4,01	2,21	3	-1,77 - 2,98	0,60
III	1,98	0,24	3	-3,74 - 0,96	0,23
IV	3,4	1,92	21		

Tabelle 16: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren

Die Mittelwerte der Glycin-konjugierten GS der gut eingestellten PatientInnen liegen über dem Mittelwert der Kontrollgruppe. Die schlecht eingestellten PatientInnen zeigen den niedrigsten Wert im Vergleich zu allen zu beschreibenden Gruppen.

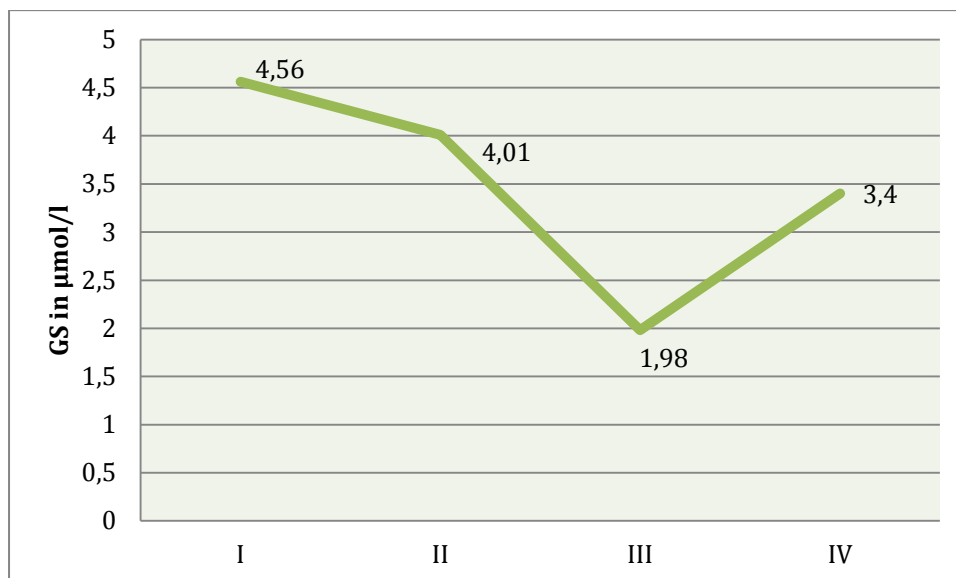


Abbildung 13: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren

### 3.3.2 Glycin-konjugierte GS: Altersgruppe 6-11 Jahren

In der Altersgruppe 6-11 Jahren liegen die Mittelwerte der Gruppe I und II nahe der zu vergleichenden Kontrollgruppe. Bei der Gruppe I beläuft sich der Mittelwert auf 2,7µmol/l mit einer Standardabweichung von 1,97 und einer Signifikanz von 0,61. Mit 3,36µmol/l wird der Mittelwert der Glycin-konjugierten GS der Gruppe II beziffert; Standardabweichung 3,19 und Signifikanz 0,97. Die Kontrollgruppe hält einen Durchschnittswert der Glycin-konjugierten GS von 3,33µmol/l und eine Standardabweichung von 2,09 inne.

Gruppe	Mittelwert µmol/l	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	2,7	1,97	5	-2,9 - 1,71	0,61
II	3,36	3,19	18	-1,35 - 1,4	0,97
IV	3,33	2,09	42		

Tabelle 17: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren

Die Mittelwerte der Gruppe I und II liegen nahe an der Kontrollgruppe; wobei die Gruppe I den niedrigsten Mittelwert und die Gruppe II den höchsten Mittelwert aufweist.

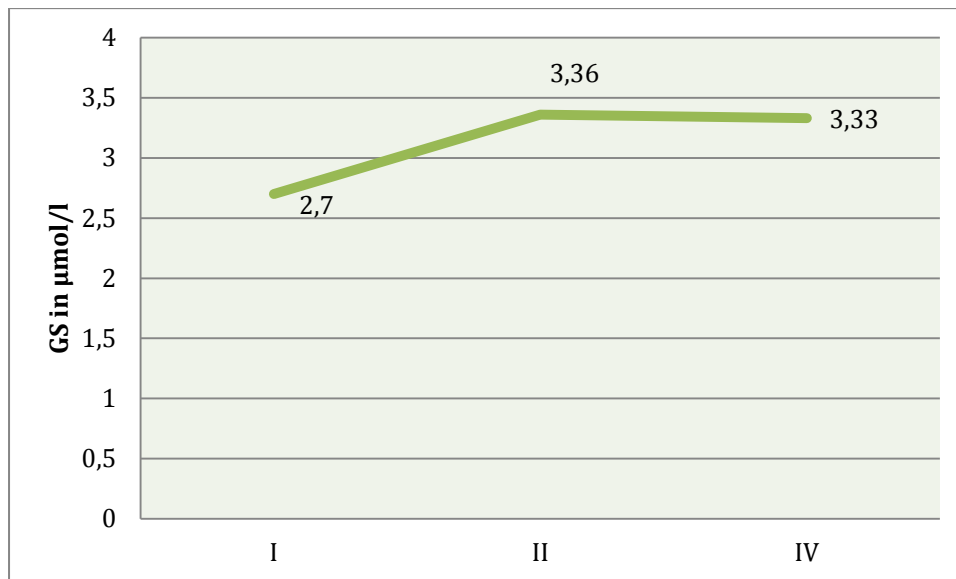


Abbildung 14: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren

### 3.3.3 Glycin-konjugierte GS: Altersgruppe >11 Jahren

In der Altersgruppe >11 Jahren sind niedrigere Werte zu beschreiben. Der Mittelwert in der Gruppe I wurde mit 1,68 µmol/l, einer Standardabweichung von 1,78 und einer Signifikanz von 0,42 beschrieben. Die Gruppe II trägt den niedrigsten Wert mit 1,36µmol/l, einer Standardabweichung von 1,19 und einer Signifikanz von 0,0. Die Gruppe III hingegen beschreibt nahezu einen doppelt so großen Mittelwert mit 2,52µmol/l, einer Standardabweichung von 3,45 und einer Signifikanz von 0,97. Die Kontrollgruppe weist einen sehr ähnlichen Mittelwert der Glycin-konjugierten GS auf. Dieser lautet 2,51µmol/l mit einer Standardabweichung von 1,37.

Gruppe	Mittelwert µmol/l	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	1,68	1,78	21	-1,64 - (-)0,03	0,42
II	1,36	1,19	49	-1,74 - (-)0,56	0,00
III	2,52	3,45	16	-0,88 - 0,91	0,97
IV	2,51	1,37	88		

Tabelle 18: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe >11 Jahren

In der Altersgruppe >11 Jahren weisen die Glycin-konjugierten GS bei den gut eingestellten PatientInnen niedrige Werte auf, als die zu vergleichende Kontrollgruppe. Die schlecht eingestellten PatientInnen hingegen erreichen um eine hundertste Stelle den gleichen Durchschnittswert wie die Kontrollgruppe.

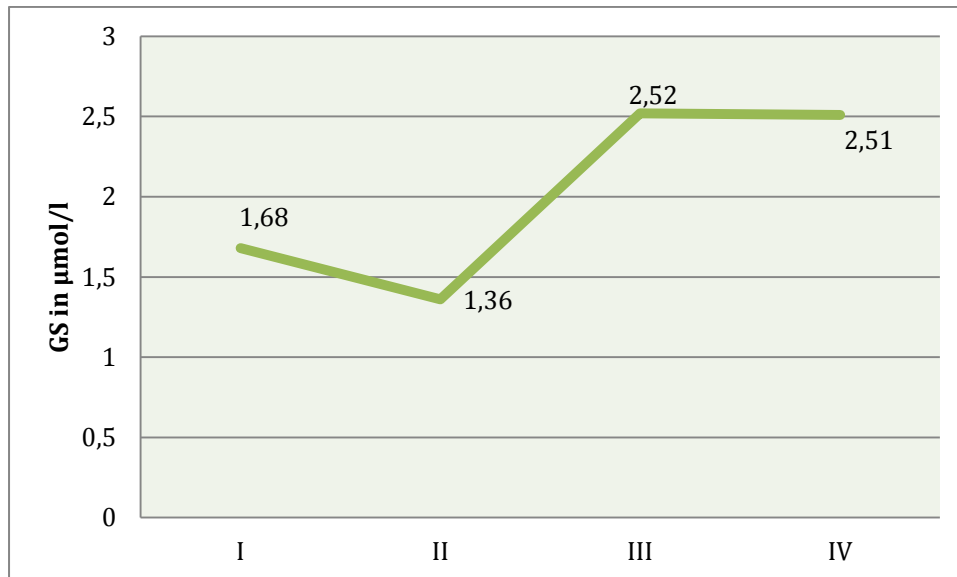


Abbildung 15: Glycin-konjugierte GS in der Altersgruppe >11 Jahren

### 3.3.4 Taurin-konjugierte GS: Altersgruppe 3-5 Jahren

Die Taurin-konjugierten GS zeigen im Allgemeinen niedrigere Konzentrationsverhältnisse und somit Mittelwerte im Vergleich zu den Glycin-konjugierten GS. In der Altersgruppe 3-5 Jahren beträgt der Mittelwert in der Gruppe I  $0,61\mu\text{mol/l}$  und eine Signifikanz von  $0,77$ . Die Gruppe II beziffert einen nahe zu doppelt so großem Mittelwert, gemessen mit  $1,12\mu\text{mol/l}$ , einer Standardabweichung von  $1,4$  und einer Signifikanz von  $0,58$ . Die Gruppe III zeigt den niedrigsten Mittelwert an Taurin-konjugierten GS.  $0,3\mu\text{mol/l}$  werden berechnet, eine Standardabweichung von  $0,23$  und eine Signifikanz von  $0,3$ . Der Mittelwert der Taurin-konjugierten GS bei der Kontrollgruppe befindet sich zwischen den bereits angegebenen Werten mit  $0,88\mu\text{mol/l}$  und einer Standardabweichung von  $0,85$ .

Gruppe	Mittelwert $\mu\text{mol/l}$	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	0,61	-	1	-2,13 - 1,58	0,77
II	1,12	1,40	3	-0,81 - 1,43	0,58
III	0,30	0,23	3	-1,69 - 0,54	0,3
IV	0,88	0,85	21		

Tabelle 19: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren

Die graphische Darstellung der Altersgruppe 3-5 Jahren spiegelt für die Taurin-konjugierten GS das bisher bunteste Bild wieder. Während die Gruppe I und Gruppe III (sehr gut und schlecht eingestellte PatientInnen) niedrigere Durchschnittswerte in Bezug zur Kontrollgruppe aufweisen, zeigt die Gruppe II (mäßig gut eingestellt) einen höheren Wert.

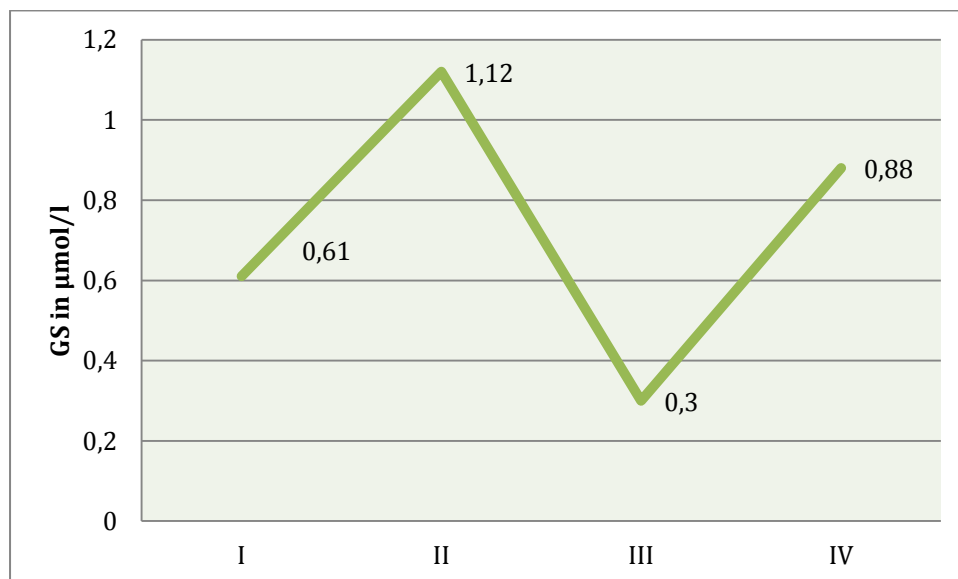


Abbildung 16: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 3-5 Jahren

### 3.3.5 Taurin-konjugierte GS: Altersgruppe 6-11 Jahren

Die Mittelwerte der Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren liegen sehr nahe beieinander. In der Gruppe I wird ein Mittelwert von  $0,54\mu\text{mol/l}$  berechnet. Die

Standardabweichung lautet 0,62 und die Signifikanz 0,89. In der Gruppe II findet sich ein Wert von 0,49 $\mu\text{mol/l}$  als Mittelwert mit einer Standardabweichung von 0,67 und einer Signifikanz von 0,16 $\mu\text{mol/l}$ . Die Kontrollgruppe halt einen Mittelwert von 0,5 $\mu\text{mol/l}$  und einer Standardabweichung von 0,53 inne.

Gruppe	Mittelwert $\mu\text{mol/l}$	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall $\text{mg/dl}$	Signifikanz
I	0,54	0,62	5	-0,51-0,58	0,89
II	0,49	0,67	18	-0,34 - 0,31	0,16
IV	0,50	0,53	42		

Tabelle 20: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren

In der Altersgruppe 6-11 Jahren sind die Taurin-konjugierten GS-Durchschnittswerte nahe zu gleich verteilt. Allein die sehr gut eingestellten PatientInnen zeigen höhere Werte.

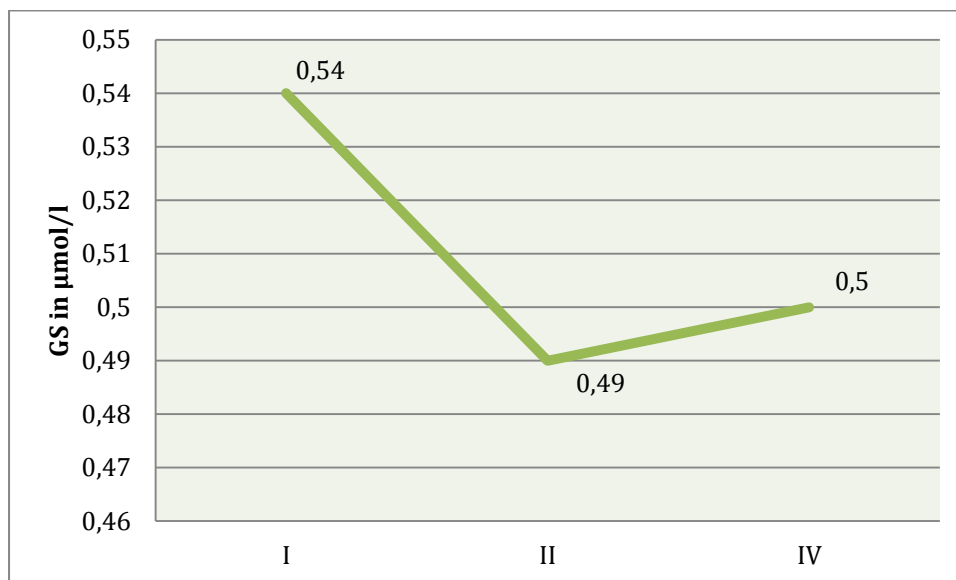


Abbildung 17: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe 6-11 Jahren

### 3.3.6 Taurin-konjugierte GS: Altersgruppe >11 Jahren

Die Altersgruppe >11 Jahren weist in der Gruppe I einen Mittelwert von 0,31 $\mu\text{mol/l}$ , mit einer Standardabweichung von 0,45 und einer Signifikanz von 0,81 auf. Dieser berechnete

Mittelwert liegt nahe bei der Kontrollgruppe (0,35 $\mu$ mol/l mit einer Standardabweichung von 0,4). Die Gruppe II hält einen Mittelwert von 0,22 $\mu$ mol/l inne, einer Standardabweichung von 0,29 und einer Signifikanz von 0,34. Der Mittelwert der Gruppe III ist der höchste dieser Altersgruppe und beträgt 0,79 $\mu$ mol/l, wie auch die Standardabweichung von 2,38. Die Signifikanz dieses Mittelwertes liegt bei 0,44.

Gruppe	Mittelwert $\mu$ mol/l	Standardabweichung	N	95%iges Konfidenzintervall	Signifikanz
I	0,31	0,45	21	-0,43 - 0,33	0,81
II	0,22	0,29	49	-0,41 - 0,14	0,34
III	0,79	2,38	16	0,01 - 0,86	0,44
IV	0,35	0,4	88		

Tabelle 21: Taurin-konjugierte GS Altersgruppe >11 Jahren

Die mäßig gut eingestellten PatientInnen zeigen ähnliche bzw. gleich hohe Durchschnittswerte an Taurin-konjugierten GS. Währenddessen sticht die Gruppe III mit einem sehr viel höheren Wert als die Kontrollgruppe hervor.

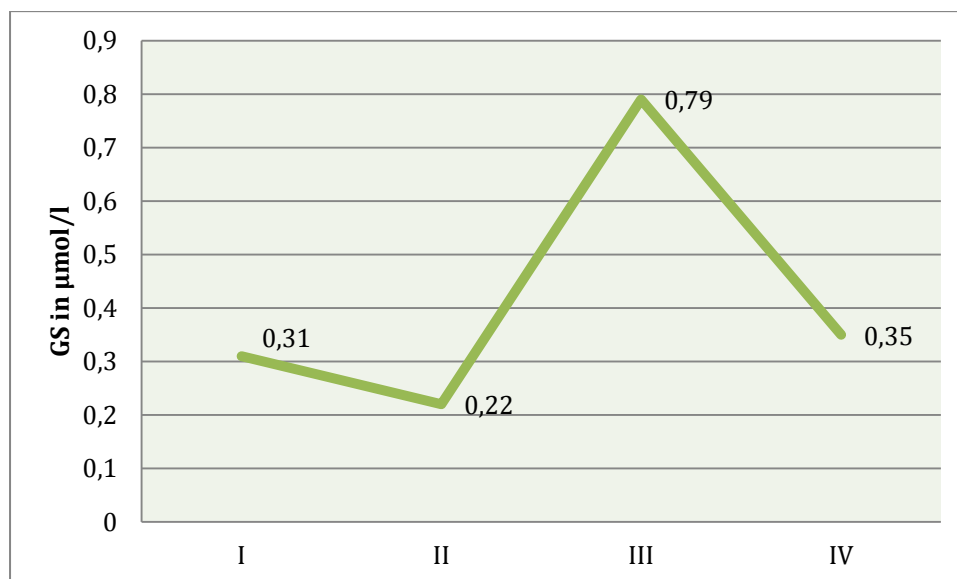


Abbildung 18: Taurin-konjugierte GS in der Altersgruppe >11 Jahren

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen der GS im Serum bei Kindern und Jugendlichen mit T1D festzustellen. Insgesamt konnten wir GS-Werte von 116 PatientInnen analysieren. Da die GS im Wachstum unterschiedliche Normwerte haben und erst ab dem 11. Lebensjahr die Werte konstant bleiben, gliederten wir die PatientInnen in drei Altersgruppen. Außerdem bildeten wir drei Untergruppe pro Altersgruppe, in welche wir die PatientInnen den zugehörigen HbA1c-Wert zuwiesen. Alle ausgewählten Gruppen haben Unterschiede in der Gesamt-GS-Werteberechnung aufgewiesen. Diese berechneten Durchschnittswerte befinden sich jedoch in einem moderaten Maße, sodass, wider Erwarten, keine extrem hohe bzw. extrem niedrige Mittelwerte zu beschreiben sind. Nur in der Altersgruppe >11 Jahren wurden in zwei Gruppen signifikante Ergebnissen nachgewiesen. Jugendliche mit sehr guten und mäßig guten HbA1c-Werten zeigten signifikant  $p < 0,05$  erniedrigte GS-Werte. Somit könnten hohe Serum-Insulin-Spiegel zu einer Hemmung der GS-*de-novo*-Synthese führen.

Grundsätzlich ist in der Literatur wenig über den GS-Stoffwechsel in der Pädiatrie zu finden. Publikationen, die die Zusammenhänge zwischen des GS-Stoffwechsels und DM beschreiben, sind derzeit nur für T2D verfügbar. Wewalka et al zeigte bei T2D PatientInnen, dass Taurin-konjugierte GS-Werte höher bei T2D PatientInnen als in der Vergleichskohorte sind [10]. Steiner et al beschrieb GS-Tagesschwankungen bei T2D PatientInnen [11]. Die genaue Interaktion zwischen dem Glukose- und GS-Stoffwechsel ist nicht bekannt. Die in der Einleitung dargestellten Regelkreisläufe, wonach hohe GS-Werte den Glukose-Spiegel senken und hohe Insulinwerte die GS im Serum senken sollten, sind kombinierte Hypothesen aus verschiedenen Studien, welche in erster Linien bei Tieren erfolgte. Demnach besteht hier der dringende Bedarf, Zusammenhänge bei PatientInnen mit DM zu erforschen. Bisher konzentrierten sich Wissenschaftler im Wesentlichen auf die Zusammenhänge zwischen T2D und dem GS-Stoffwechsel. T2D-PatientInnen weisen oft Komorbiditäten wie die Präsenz eines metabolischen Syndroms auf. Dyslipidämie, als eines der häufigen Symptome, lässt auf einen erhöhten Cholesterin-Spiegel und somit auf erhöhte GS-Spiegel schließen, da GS das Abbauprodukt des Cholesterins ist. Den GS-Stoffwechsel bei T1D zu untersuchen ist insbesondere deswegen interessant, da man hier den Einfluss von Insulin untersuchen kann. Interessant wäre vor allem der GS-Spiegel im Serum bei PatientInnen mit Erstmanifestation von T1D, welche (fast) kein Insulin im

Serum haben und hohe Glukosespiegel aufweisen. Leider hatten wir für diese Arbeit zu wenige PatientInnen mit T1D-Erstmanifestation ohne Insulintherapie, um die Werte auszuwerten.

Insulin per se im Serum zu messen war bei unseren PatientInnen nicht möglich, weswegen wir uns auf den HbA1c-Wert konzentrierten, der ein indirekter Marker für die Stoffwechselkontrolle bei T1D ist. Wir teilten die Kinder- und Jugendlichen in drei Gruppen ein (HbA1c-Werte <59; 59-75 und >75mmol/mol). Wenn man von der Hypothese ausgeht, dass Insulin den GS-Spiegel bei T1D beeinflusst, dann ist der HbA1c-Wert sicherlich nicht der optimale Parameter, um die PatientInnen einzuteilen. Ein Patient mit einem guten HbA1c-Wert kann einen unterschiedlichen Insulinbedarf haben. Daher sollte bei weiteren Studien entweder Insulin im Serum oder das C-Peptid als Marker der eigenen Insulinproduktion bestimmt werden.

Die Idee unserer Studie war es, Veränderungen im GS-Haushalt bei PatientInnen mit T1D finden zu können. Wie in Kapitel 1.3. beschrieben wurde, wirkt Insulin hemmend auf die GS-Synthese. Bei der Gruppe I erwarten wir uns unabhängig von der Altersgruppe niedrige Gesamt-GS-Werte, da aufgrund der niedrigen HbA1c-Werte auf eine hohe tägliche Insulinzufuhr zu schließen ist. Niedrige HbA1c-Werte sind jedoch auch bei PatientInnen zu finden, welche sich in der Remissionsphase befinden und eine, wenn auch geringe Eigenproduktion von Insulin aufweisen. In jeder zu untersuchenden Altersgruppe erwarten wir uns in der Gruppe III eine Erhöhung der Gesamt-GS-Werte. Die hohen HbA1c-Werte dieser Gruppe lassen auf niedrige Insulingaben schließen; und somit niedrige Insulinkonzentration generell im Blut. Die GS-Synthese wird bei vorherrschendem Insulinmangel nicht inhibiert.

Die Ergebnisse unserer Studie waren nicht einheitlich. Auffällig waren vor allem die verschiedenen GS-Ergebnisse in den unterschiedlichen Altersgruppen. Die sehr und mäßig gut eingestellten PatientInnen hatten bei den 3-5jährigen hochnormale GS-Werte (6,4mg/dl; Normwerte 4,3-6,4  $\mu\text{mol/l}$ ) und bei den über 11-jährigen signifikant erniedrigte Werte (1,7  $\mu\text{mol/l}$  und 1,4  $\mu\text{mol/l}$ ; Normwerte 3,1-4,  $\mu\text{mol/l}$ ). Diese Diskrepanz können wir uns derzeit nicht erklären. Eventuell spielen andere Faktoren wie Hormone eine beeinflussende Rolle. Für uns auch nicht völlig verständlich ist, warum die schlecht eingestellten T1D PatientInnen nicht hohe GS-Werte aufweisen, sondern auch tendenziell

erniedrigte Werte, wie bspw. in der Altersgruppe 3-5Jahren (3,7  $\mu\text{mol/l}$ ; Normwerte 4,3-6,4  $\mu\text{mol/l}$ ). Dies lässt ebenfalls auf weitere Faktoren schließen, die den GS-Stoffwechsel bei Kindern- und Jugendlichen beeinflussen. Unsere Hypothese lautete, je besser der HbA1c-Wert eines/r PatientIn sei, umso niedriger sei die Gesamt-GS-Konzentration. Dies ist bei den über 11-jährigen mit einem signifikanten Ergebnis bestätigt worden. Aufgrund der Ergebnisse der anderen Gruppen muss die Hypothese dennoch hinterfragt werden.

Die durchgeführte Studie ist als eine Pilotstudie zu charakterisieren, im Sinne einer ersten Datenanalyse und soll einen ersten Eindruck und Überblick in die Thematik GS und T1D schaffen. Um ein breites Spektrum an ProbandInnen zu beschreiben, haben wir die individuelle Therapie eines jeden PatientIn in unserer Studie nicht miteinbezogen. Es wäre sicherlich interessant, verschiedene Insulin-Therapie-Formen (Insulinpumpe vs. Basis-Bolus Therapie) zu vergleichen. Wir konnten auch nicht auf die einzelnen Produkte eingehen, wobei wir denken, dass der GS-Stoffwechsel durch Insulin und Insulin-Analoga gleichermaßen beeinflussen werden.

Für eine weitere Verbesserung der Datenanalyse sollten die GS-Messungen von GS immer zur gleichen Tageszeit erfolgen. GS unterliegen tageszeitlichen Schwankungen, welche auch im direkten Bezug zu der Nahrungsaufnahme stehen. Zudem wirken vor allem hydrophobe GS, aufgrund des Vermögens FXR zu aktivieren, auf die GS-Synthese ein. Konjugierte GS erreichen 1-2h postprandial ein Konzentrationsmaximum. Vor dem Frühstück wurden höhere Werte der konjugierten GS als in der Nacht gemessen. Unkonjugierte GS steigen in der Nacht hingegen auf ihre Maximalwerte an. In unserer Studie waren die Blutabnahmen zwischen 8 und 12 Uhr, ein einheitlicher Zeitpunkt war aus organisatorischen Gründen nicht möglich. Wichtig ist es, dass die Patienten nüchtern waren.

Unsere Ergebnisse ergaben kein einheitliches Bild zur Beurteilung der GS-Veränderungen im Serum bei T1D erkrankten Kindern und Jugendlichen. In einigen Gruppen fanden wir Korrelationen zu unseren Überlegungen; vor allem in der Altersgruppe >11 Jahren, welche durch ihre signifikanten Ergebnisse unsere Hypothese zusätzlich unterstützen. Genauere Betrachtungen ergaben jedoch, dass Veränderungen des Gesamt-GS-Wertes keiner bestimmten GS im Profil zugesprochen werden konnte.

Inwieweit die Insulintherapie bei T1D PatientInnen Einfluss auf den GS-Haushalt nimmt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht ausreichend interpretiert werden. Um weitere Untersuchungen bezüglich GS-Veränderungen bei T1D PatientInnen zu tätigen, ist eine Erhöhung der Fallzahl essentiell. Nur so kann eine Vielzahl von Werten analysiert werden, die letztendlich zu eindeutigeren Ergebnissen führen könnten. Erschwerend kommt hierbei hinzu, ob bei den sehr jungen PatientInnen immer eine Blutabnahme indiziert ist. Zusätzlich sollten weitere Kriterien in Studien miteinbezogen werden, um Ergebnisse zu analysieren. Zu welcher Tageszeit die Blutabnahme erfolgt, kann einen entscheidenden Hinweis darüber geben, weshalb welche GS im Profil einen erhöhten oder erniedrigten Wert aufweist. Gleichzeitig ist es von Bedeutung zu wissen, ob der/ die PatientIn während der Untersuchung nüchtern war oder ob die Untersuchung postprandial und nach Insulingabe erfolgte. Insgesamt ist die Durchführung von Studien bei T1D PatientInnen eine komplexe Angelegenheit, die in Zukunft prospektiv durchgeführt werden sollte.

Bisher befassten sich nur wenige Studien mit dem GS-Stoffwechsel und dem Glukosemetabolismus. Es ist jedoch essentiell sich in Zukunft mit dieser Thematik näher zu befassen, um Veränderungen des GS-Haushaltes richtig analysieren zu können. Es muss die Vielzahl von Faktoren berücksichtigt werden, die in den GS-Metabolismus einwirken. Dazu zählen: Dauer der Krankheitsanamnese, regelmäßige Medikamenteneinnahme, Compliance der PatientInnen und der Eltern, Alter. Es muss sich auch die Frage gestellt werden, welche weiteren Punkte den GS-Stoffwechsel nachhaltig beeinflussen. In weiteren Untersuchungsverfahren sei auch eine Erhebung der GS-Werte bei Kindern mit Erstmanifestation von T1D sehr interessant. Hierbei könnte die Frage nach den Auswirkungen auf den GS-Metabolismus bei absolutem Insulinmangel untersucht werden.

Zusammenfassend können wir festhalten, dass wir uns im Rahmen dieser Arbeit einen Überblick verschaffen konnten, wie die Verteilung der GS-Werte bei T1D PatientInnen ist. Dass der GS-Stoffwechsel durch den Glukosemetabolismus beeinflusst wird, ging bereits aus anderen Studien hervor. Inwieweit und auf welchen Ursachen beruhend sollten in zukünftigen Studien erfolgen. Derzeit lässt sich nicht abschätzen, welche Bedeutung der GS im Rahmen diabetologischer Erkrankungen zugesprochen werden kann und ob GS als Biomarker bei diesen Erkrankungen eingesetzt werden können.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Monte, M.J., et al., Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, 2009. 15(7): p. 804-16.
2. Hofmann, A.F., The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med*, 1999. 159(22): p. 2647-58.
3. Chiang, J.Y., Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*, 2009. 50(10): p. 1955-66.
4. Kullak-Ublick, G.A., B. Stieger, and P.J. Meier, Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*, 2004. 126(1): p. 322-42.
5. Chiang, J.Y., Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol*, 2013. 3(3): p. 1191-212.
6. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 2008. 65(16): p. 2461-83.
7. Kir, S., et al., Nuclear receptors HNF4alpha and LRH-1 cooperate in regulating Cyp7a1 in vivo. *J Biol Chem*, 2012. 287(49): p. 41334-41.
8. Kok, T., et al., Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J Biol Chem*, 2003. 278(43): p. 41930-7.
9. Russell, D.W., Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res*, 2009. 50 Suppl: p. S120-5.
10. Wewalka, M., et al., Fasting serum taurine-conjugated bile acids are elevated in type 2 diabetes and do not change with intensification of insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. 99(4): p. 1442-51.
11. Steiner, C., et al., Bile acid metabolites in serum: intraindividual variation and associations with coronary heart disease, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *PLoS One*, 2011. 6(11): p. e25006.
12. Chiang, J.Y., Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci*, 1998. 3: p. d176-93.
13. Trauner, M. and J.L. Boyer, Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, 2003. 83(2): p. 633-71.
14. Nolan, J.D., I.M. Johnston, and J.R. Walters, Altered enterohepatic circulation of bile acids in Crohn's disease and their clinical significance: a new perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. 7(1): p. 49-56.

15. Popescu, I.R., et al., The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta-cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett*, 2010. 584(13): p. 2845-51.
16. Scotti, E., et al., Bile acids and their signaling pathways: eclectic regulators of diverse cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(19-20): p. 2477-91.
17. Trauner, M., et al., Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis*, 2010. 28(1): p. 220-4.
18. Zarrinpar, A. and R. Loomba, Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012. 36(10): p. 909-21.
19. Lee, F.Y., et al., FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(10): p. 572-80.
20. Teodoro, J.S., A.P. Rolo, and C.M. Palmeira, Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. 22(11): p. 458-66.
21. Herold, G., Diabetes mellitus. *Innere Medizin; eine vorlesungsorientierte Darstellung eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Eigenverlag, 2011: p. 695-709.
22. Daneman, D., Type 1 diabetes. *Type 1 diabetes. Lancet* 2006 Mar 11: p. 367(9513):847-858.
23. Hürter, P., D.T., Definition, Diagnose und Klassifikation des Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen*. 6th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005: p. 1- 11.
24. Hürter, P., D.T., Diabetische Ketoazidose. *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen*. 6th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005: p. 405-410.
25. Gortner, L., S.-M., F.C. Sitzmann, *Duale Reihe Pädiatrie*. 3. Auflage, 2007. Georg Thieme Verlag.
26. Koletzko B, e., *Kinder- und Jugendmedizin*. 13. Auflage. Springer Medizin Verlag, 2007.
27. Hien, P., B.B., *Diabetes Handbuch: Labordiagnostik*. Springer Verlag Heidelberg, 2010: p. 7-8.
28. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 2001. 358(9277): p. 221-9.
29. Sabbah, E., et al., Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2000. 23(9): p. 1326-32.

30. Schäffler, A., C.B., Roland Büttner , Christiane Girlich Funktionsdiagnostik in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel. Indikation, Testvorbereitung und -durchführung, Interpretation. Springer Verlag; 2. Auflage, 2013.
31. Akerblom, H.K., et al., Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet*, 2002. 115(1): p. 18-29.
32. Atkinson, M.A., The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(11).
33. Kiess W, K.T., Galler A, Schmidt A, Raile K. , Ätiopathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2001: p. 149(7):641-649.
34. Seissler, J., E. Hatziagelaki, and W.A. Scherbaum, Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001. 109 Suppl 2: p. S304-16.
35. Knip, M., S.M. Virtanen, H.K. Akerblom, Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. 2010. *Am J Clin Nutr*: p. 91(5): p. 1506S-1513S.
36. Hürter P, D.T., Ätiopathogenese des Typ-1-Diabtes. *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen*. 6th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005: : p. 60-66.
37. Aathira, R. and V. Jain, Advances in management of type 1 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 2014. 5(5): p. 689-96.
38. Olaf Hiort, T.D., Martin Wabitsch, *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*. 2010: p. 162-198.
39. Lefebvre, P., et al., Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*, 2009. 89(1): p. 147-91.
40. Dufer, M., et al., Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse beta-cells via farnesoid X receptor activation and K(ATP) channel inhibition. *Diabetes*, 2012. 61(6): p. 1479-89.
41. Park, W.H. and Y.K. Pak, Insulin-dependent suppression of cholesterol 7alpha-hydroxylase is a possible link between glucose and cholesterol metabolisms. *Exp Mol Med*, 2011. 43(10): p. 571-9.
42. Griffiths, W.J. and J. Sjovall, Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J Lipid Res*, 2010. 51(1): p. 23-41.
43. Neumann, S. and S. Bocker, Computational mass spectrometry for metabolomics: identification of metabolites and small molecules. *Anal Bioanal Chem*, 2010. 398(7-8): p. 2779-88.

44. Nikolin, B., et al., High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci*, 2004. 4(2): p. 5-9.
45. Roda, A., F. Piazza, and M. Baraldini, Separation techniques for bile salts analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998. 717(1-2): p. 263-78.
46. Scalia, S., Bile acid separation. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995. 671(1-2): p. 299-317.
47. Budzikiewicz, H. and R.D. Grigsby, Mass spectrometry and isotopes: a century of research and discussion. *Mass Spectrom Rev*, 2006. 25(1): p. 146-57.
48. Budzikiewicz, H., et al., Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XIX.. Akuammicine and related alkaloids. *Tetrahedron*, 1963. 19(8): p. 1265-76.
49. Massenspektrometrie, D.G.f., <http://www.dgms-online.de/dgms1/Wissen/Das-ist-MS/massenspektrometer.php?navid=46>.
50. Lothar, T., *Labor und Diagnose*. 6.Auflage ed. Frankfurt/Main, TH-Books-Verlags-Gesellschaft; 2005.
51. Sarbu, C., K. Kuhajda, and S. Kevresan, Evaluation of the lipophilicity of bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis. *J Chromatogr A*, 2001. 917(1-2): p. 361-6.
52. Learning, L.S.A.C.b.O., *High Performance Liquid Chromatography*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1992.
53. Prichard E., S.P.L.S.T.G., *High Performance Liquid Chromatography*. 1 st ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003.
54. Abdel-Khalik, J., E. Bjorklund, and M. Hansen, Simultaneous determination of endogenous steroid hormones in human and animal plasma and serum by liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013. 928: p. 58-77.
55. Motilva, M.J., A. Serra, and A. Macia, Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview. *J Chromatogr A*, 2013. 1292: p. 66-82.
56. O'Mahony, J., et al., The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food - challenges and applications. *J Chromatogr A*, 2013. 1292: p. 83-95.

57. Stering B, et al, Bestimmung von Normwerten der Gallensäuren im Serum bei Kindern und Jugendlichen. Graz: Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, 2013.
58. Polkowska, G., et al., Range of serum bile acid concentrations in neonates, infants, older children, and in adults. Med Sci Monit, 2001. 7 Suppl 1: p. 268-70.

## 6 Anhang - Projektplan

**September 2013:** Kontaktaufnahme mit Betreuer OA Dr. Jahnel (Medizinische Universität Graz für Kinder und Jugendheilkunde)

**Oktober 2013:** Erstgespräch und Themenauswahl: Wöchentliche Teamsitzung mit Betreuer und weiteren DiplomandInnen

**November 2013:** Beginn mit Literatursuche ; Erstellung eines Studienprotokolls; Planung und Organisation des zeitlichen Ablaufs ; Einschluss der ersten PatientInnen (Ambulanz, Station) Erstellung einer Excel-Tabelle

**Dezember 2013:** Zusendung der ersten GS-Werte; Überblick der ersten Daten gewinnen; Trends erkennen

**Januar 2014:** Beginn mit der „Einleitung“ der Diplomarbeit; Tabellenzeichnung

**Februar - Mai 2014:** Verfassung des Kapitels „Material und Methoden“; Erhalt weiterer PatientInnendaten und weitere Ausführung der Tabellen; Beginn der Ergebnisdarstellung

**Juni 2014:** Präsentation der Diplomarbeit im Rahmen der „Mariatroster Forschungsklausurtagung 2014“ (15min öffentlicher Vortrag)

**Juli - Oktober 2014:** Sammlung weiterer Daten und Vervollständigung der Tabellen, statistische Auswertung und graphische Darstellung

**Oktober - November 2014:** Fertigstellung der restlichen Abschnitte der Diplomarbeit

**Dezember 2014 - Juni 2015:** Korrektur