

Diplomarbeit

Bestimmung von Normwerten der atypischen Gallensäuren bei Kindern und Jugendlichen

eingereicht von

Katharina Meinel

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde

unter der Anleitung von

Evelyn Zöhrer, MSc

Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Günter Fauler

OA Dr. Jörg Jahnel

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, am 09.06.2016

Katharina Meinel eh.

Vorwort

Da ich mir gut vorstellen kann zukünftig einmal im Fachbereich Pädiatrie zu arbeiten, trat ich im Jahr 2014 mit der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde in Kontakt. Nach kurzer Zeit wurde ich an OA Dr. Jahnel weitergeleitet. Dieser vereinbarte ein Treffen mit mir, in dem er das Thema „Gallensäuren in der Pädiatrie“ vorstellte und erklärte. Zur Einführung in den Themenbereich verfolgte ich zunächst die nötigen Arbeitsschritte mit, die für die Verfassung der Diplomarbeit von Heidrun Hargassner über das Thema „Gallensäuren bei Neugeborenen“ getätigt wurden. In diesem Zusammenhang lernte ich Frau Mag. Zöhrer kennen. Neben dem Thema überzeugte mich auch die sehr gute Betreuung innerhalb der Gruppe von OA Dr. Jahnel und ich konnte im Juli 2015 mit meiner eigenen Diplomarbeit beginnen.

Ich hatte großes Glück, da bei Beginn meiner Arbeit bereits eine große Menge gesammelter Daten vorlag. Diese Daten musste ich sortieren und statistisch auswerten, um die Fragestellung beantworten zu können. Parallel dazu begann ich damit den theoretischen Teil meiner Arbeit zu verfassen.

Danksagungen

Zuallererst danke ich Mag. Evelyn Zöhrer, die mich in jeder Hinsicht mit Ihrem Wissen und Ihrer Motivation unterstützt hat und ohne die es mir bei Weitem nicht so leicht gefallen wäre meine Diplomarbeit zu schreiben.

Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Günter Fauler möchte ich für die Bereiterklärung danken diese Arbeit mit zu betreuen.

OA Dr. Jörg Jahnel möchte ich dafür danken, dass ich von seiner Arbeit und seinem Wissen profitieren durfte und meine Diplomarbeit im Fachbereich Pädiatrie schreiben konnte.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung, den Rückhalt und das Zuhause.

Außerdem möchte ich meinen FreundInnen in Graz ganz besonders für die schöne und lustige Zeit danken.

Zusammenfassung

Hintergrund: C6-hydroxylierte Gallensäuren (GS) wie Alpha-, Beta-, Gamma-, und Omega-Muricholsäure gelten bei Erwachsenen als "atypisch", wurden aber in höheren Konzentrationen bei Neugeborenen nachgewiesen. Atypische GS bei Jugendlichen wurden bisher nicht untersucht. Da die humanen GS als Biomarker für hepatische und intestinale Erkrankungen verwendet werden können, ist es denkbar, dass auch in der Bestimmung atypischer GS im Serum zukünftig eine diagnostische Relevanz besteht. Ziel dieser Arbeit war es, aufgrund der fehlenden Datenlage Normwerte von atypischen GS im Serum von lebergesunden Kindern und Jugendlichen festzulegen.

Methodik: Es wurden bei insgesamt 45 Kindern, deren enterohepatischer Kreislauf nicht beeinträchtigt war, die atypischen GS im Serum gemessen. Die Messung erfolgte mittels „Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie“ (HPLC-MS/MS) aus Restblut. Das Probenkollektiv umfasste Kinder und Jugendliche im Alter von 0-19 Jahren und wurde in 5 verschiedene Altersgruppen eingeteilt: 1. 0-5 Monate (n=6); 2. 6-24 Monate (n=9); 3. 3-5 Jahre (n=11); 4. 6-11 Jahre (n=10); 5. >11 Jahre (n=9). Für die Darstellung der Normwerte wurde mittels SPSS ein 95%-Konfidenzintervall herangezogen.

Ergebnisse: Die höchsten Konzentrationen atypischer Gesamt-GS konnten in der 1. Altersgruppe gemessen werden (1,54 – 6,26 $\mu\text{mol/L}$). Die Serumkonzentrationen der GS sanken bei den Kindern zwischen 6-24 Monaten auf 0,29 – 0,97 $\mu\text{mol/L}$. In Altersgruppe 3 sanken die Werte weiterhin ab (0,18 – 0,46 $\mu\text{mol/L}$) und blieben anschließend niedrig (4. Altersgruppe 0,11 – 0,37 $\mu\text{mol/L}$; 5. Altersgruppe 0,05 – 0,40 $\mu\text{mol/L}$). Das Gallensäureprofil zeigte ein Überwiegen der freien, sekundären atypischen GS in allen Altersgruppen. Die Omegamuricholsäure sank kontinuierlich mit zunehmendem Lebensalter. Die Hyodeoxycholsäure hingegen nahm mit steigendem Alter der Kinder zu und erreichte ihre Höchstwerte in Altersgruppe 5 (>11 Jahre). Die Taurin-konjugierten GS waren bis zur Altersgruppe 4 die dominierende GS-Spezies; erst in der Altersgruppe 5 (>11 Jahre) lagen vermehrt Glycin-Konjugate vor.

Schlussfolgerung: Dies ist die erste Studie zu atypischen GS im Serum von Kindern und Jugendlichen und zeigt, dass „atypische“ GS bei Neugeborenen als typisch gelten. Mit zunehmendem Alter sinken die Werte der atypischen GS und werden durch die typischen GS ersetzt.

Abstract

Background: Beside the typical human BA there are also “atypical” BA (typical in rodants) measured in serum of children. No data of atypical BA are available in adolescents. Since human BA can be used as indicators of hepatobiliary, intestinal and metabolic diseases, it is imaginable that the measuring of atypical BA is of diagnostic relevance, too. The aim of this study was to determine normal value range of atypical BA in children and adolescents.

Methods: For the determination of normal value range atypical BA of 45 children were measured. The children showed no abnormalities in enterohepatic circulation. The measurement was performed using a “high-performance liquid chromatography-tandem-mass-spectrometry” (HPLC-MS/MS). Commonly not utilized 10 µl of serum was used for examination. The study cohort was divided into 5 different age-groups: 1. 0-5 months (n=6); 2. 6-24 months (n=9); 3. 3-5 years (n=11); 4. 6-11 years (n=10); 5. >11 years (n=9). Normal value ranges were calculated within 95% confidence intervals.

Results: Highest concentrations of atypical BA were measured in group 1 (1.54 – 6.26 µmol/L). Serum-BA concentrations decreased in children from 6-24 months (0.29 – 0.97 µmol/L). Furthermore, total BA concentrations decreased stepwise in higher age classes (3. age-group 0.18 – 0.46 µmol/L; 4. age-group 0.11 – 0.37 µmol/L; 5. age-group 0.05 – 0.40 µmol/L). In all groups unconjugated, secondary BA predominated. Omega-muricholic acid decreased continuously with the increasing age of the children. However, hyodeoxycholic acid increased after delivery and reached highest levels in group 5 (>11 ages). Until 11 years, conjugations with taurine outweighed; afterwards glycin-conjugated BA predominated.

Conclusion: This is the first study to determine standard value ranges of atypical BA in children and adolescents. We propose that “atypical” BA are common in early infancy and get replaced continuously by typical BA in higher age groups.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iv
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Gallensäuren	2
1.2.1 Bildung der GS	2
1.2.2 Konjugation der GS	4
1.2.3 Sekundäre GS	5
1.2.4 Der enterohepatische Kreislauf	6
1.2.5 Regulation der Gallensäurebiosynthese	8
1.2.6 Aufgaben der GS	10
1.2.7 Zytotoxizität der GS	11
1.3 GS in der Pädiatrie	12
1.3.1 Normwerte der GS im Serum bei Kindern und Jugendlichen	12
1.3.2 Atypische GS in der Pädiatrie	14
1.4 Bestimmung atypischer GS-Normwerte bei Kindern und Jugendlichen ..	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Methoden zur Bestimmung von atypischen GS im Serum	19
2.1.1 Chromatografie	19
2.1.2 High-performance liquid Chromatography	21
2.1.3 Massenspektrometrie	22
2.1.4 Tandem-MS	23
2.1.5 HPLC-MS/MS	23
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien	24
2.3 Patientenkollektiv	25
2.4 Auswertung der Proben	25
2.5 Statistische Auswertung der Proben	26

3	Ergebnisse	27
3.1	Patientencharakterisierung.....	27
3.2	Gesamt-GS	27
3.3	Profil der atypischen GS.....	30
3.3.1	Alphamuricholsäure (AMCA)	30
3.3.1.1	Glykoalphamuricholsäure (GAMCA)	31
3.3.1.2	Taugammamuricholsäure (TAMCA)	32
3.3.2	Betamuricholsäure (BMCA)	33
3.3.2.1	Glykobetamuricholsäure (GBMCA).....	34
3.3.2.2	Taurobetamuricholsäure (TBMCA)	35
3.3.3	Gammamuricholsäure (GMCA)	36
3.3.3.1	Glykogammamuricholsäure (GGMCA).....	37
3.3.3.2	Taugammamuricholsäure (TGMCA).....	38
3.3.4	Omegamuricholsäure (OMCA)	39
3.3.4.1	Glykoomegamuricholsäure (GOMCA).....	40
3.3.4.2	Tauroomegamuricholsäure (TOMCA).....	41
3.3.5	Hyodeoxycholsäure (HDCA).....	42
3.3.5.1	Glykohyodeoxycholsäure (GHDCA).....	43
3.3.5.2	Taurohyodeoxycholsäure (THDCA).....	44
3.4	Altersabhängige Darstellung der atypischen GS.....	45
3.4.1	Altersgruppe 1: 0-5 Monate	45
3.4.2	Altersgruppe 2: 6-24 Monate	46
3.4.3	Altersgruppe 3: 3-5 Jahre	47
3.4.4	Altersgruppe 4: 6-11 Jahre	48
3.4.5	Altersgruppe 5: >11 Jahre	49
3.4.6	Zusammenfassung der GS-Profile der Gruppen 1-5	50
4	Diskussion.....	51
	Projektplan	54
	Literaturverzeichnis	55

Glossar und Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALAT	Alaninaminotransferase
AMCA	Alphamuricholsäure
AP	alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartataminotransferase
ASBT	Apical-Sodium-Dependent-Bile-Acid-Transporter
BACS	Bile-Acid-CoA-Synthase
BAT	Bile-Acid-Aminoacid-N-Acyltransferase
BMCA	Betamuricholsäure
BSEP	Bile-Salt-Export-Pump
bzw.	Beziehungsweise
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodeoxycholsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CK	Kreatininkinase
CoA	Coenzym A
CRP	C-reaktives Protein
CYP27A1	Sterol-27-Hydroxylase
CYP7A1	Cholesterin-7 α -Hydroxylase
CYP7B1	Oxysterol-7 α -Hydroxylase
CYP8B1	12 α -Hydroxylase
d.h.	Das heißt
DCA	Deoxycholsäure
FGF-19	Fibroblast growth factor 19
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
G	Glycin
GAMCA	Glykoalphamuricholsäure
GBMCA	Glycobetamuricholsäure
GC	Gas Chromatography

GCA	Glycocholsäure
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GDCA	Glycodeoxycholsäure
GGMCA	Glycogammamuricholsäure
GHDCA	Glycohyodeoxycholsäure
GLA	Glycolithocholsäure
GMCA	Gammamuricholsäure
GOMCA	Glycoomegamuricholsäure
GS	Gallensäuren
GUDCA	Glycoursodeoxycholsäure
HDCA	Hyodeoxycholsäure
HPLC	High-Performance-liquid-Chromatografie
HPLC-MS/MS	high performance liquid chromatography- Tandem- Massenspektrometrie
HSD3B7	3 β -Hydroxy- Δ 5-C27-Steroid-Reduktase
I-BABD	Ileal-Bile-Acid-Binding-Protein
LC	Liquid Chromatography
LCA	Lithocholsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MRP2	Multidrug-Resistance-Associated-Protein 2
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Massenspektrometrie/Massensprektrometrie
N	Anzahl der TeilnehmerInnen
NTCP	Na ⁺ -Dependent-Taurocholate- Cotransporting-Peptide
OATP3	Organic-Anion-Transporting-Peptides
OH	Hydroxyl-
OMCA	Omegamuricholsäure
OST α /OST β	Organic-Solute-Transporter
PXR	Pregnane-X-Rezeptor
T	Taurin
TAMCA	Tauroalphamuricholsäure

TBMCA	Taurobetamuricholsäure
TCA	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure
TDCA	Taurodeoxycholsäure
TGMCA	Taurogammamuricholsäure
TGR5	G Protein gekoppelter Rezeptor
THDCA	Taurohyodeoxycholsäure
TLA	Taurolithocholsäure
TOMCA	Tauroomegamuricholsäure
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure
v.a.	Vor allem
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
z.B.	Zum Beispiel
γ- GT	Glutamyltranspeptidase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Cholesterin (7).....	2
Abbildung 2: Biosynthese GS (klassisch und alternativ) (10)	3
Abbildung 3: Primäre GS (Cholat) (7).....	4
Abbildung 4: Enterohepatische Zirkulation (13).....	7
Abbildung 5: Gallensäuretransportsysteme des Enterozyten (14).....	8
Abbildung 6: Regulation der Gallensäuresynthese (16)	9
Abbildung 7: Mizellenbildung (17)	10
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Gesamt-GS bei Kindern und Jugendlichen (1).....	13
Abbildung 9: Bildung der atypischen GS (25).....	15
Abbildung 10: Chromatografie (27)	20
Abbildung 11: HPLC-System.....	21
Abbildung 12: Generelles Schema eines Massenspektrometers (30).....	22
Abbildung 13: Gesamt-GS atypisch bei Kindern und Jugendlichen	28
Abbildung 14: Gesamt-GS atypisch (Boxplot)	29
Abbildung 15: Boxplot GAMCA in den verschiedenen Altersgruppen	31
Abbildung 16: Boxplot TAMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	32
Abbildung 17: Boxplot BMCA in den verschiedenen Altersgruppen	33
Abbildung 18: Boxplot GMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	36
Abbildung 19: Boxplot GGMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	37
Abbildung 20: Boxplot TGMCA in den verschiedenen Altersgruppen	38
Abbildung 21: Boxplot OMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	39
Abbildung 22: Boxplot GOMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	40
Abbildung 23: Boxplot TOMCA in den verschiedenen Altersgruppen	41
Abbildung 24: Boxplot HDCA in den verschiedenen Altersgruppen	42
Abbildung 25: Boxplot THDCA in den verschiedenen Altersgruppen	44
Abbildung 26: GS-Profil in der Altersgruppe 1	45
Abbildung 27: GS-Profil in der Altersgruppe 2	46
Abbildung 28: GS-Profil in der Altersgruppe 3	47
Abbildung 29: GS-Profil in der Altersgruppe 4	48
Abbildung 30: GS-Profil in der Altersgruppe 5	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Freie GS	5
Tabelle 2: T-Konjugate	5
Tabelle 3: G-Konjugate	6
Tabelle 4: Normale GS-Werte in verschiedenen Altersgruppen (1).....	13
Tabelle 5: Atypische GS.....	16
Tabelle 6: Bezeichnung der chromatografischen Grundtypen (27)	20
Tabelle 7: atypische GS die mittels HPLC-MS bestimmt wurden	25
Tabelle 8: Gruppeneinteilung für Normwerte.....	27
Tabelle 9: Normwerte der atypischen Gesamt-GS	28
Tabelle 10: AMCA in den verschiedenen Altersgruppen	30
Tabelle 11: GAMCA in den verschiedenen Altersgruppen	31
Tabelle 12: TAMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	32
Tabelle 13: BMCA in den verschiedenen Altersgruppen	33
Tabelle 14: GBMCA in den verschiedenen Altersgruppen	34
Tabelle 15: TBMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	35
Tabelle 16: GMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	36
Tabelle 17: GGMCA in den verschiedenen Altersgruppen	37
Tabelle 18: TGMCA in den verschiedenen Altersgruppen	38
Tabelle 19: OMCA in den verschiedenen Altersgruppen.....	39
Tabelle 20: GOMCA in den verschiedenen Altersgruppen	40
Tabelle 21: TOMCA in den verschiedenen Altersgruppen	41
Tabelle 22: HDCA in den verschiedenen Altersgruppen	42
Tabelle 23: GHDCA in den verschiedenen Altersgruppen	43
Tabelle 24: THDCA in den verschiedenen Altersgruppen	44

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Bedeutung von Gallensäuren (GS) in der medizinischen Forschung hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. GS können als Biomarker für angeborene oder erworbene hepatobiliäre Erkrankungen dienen. Janel *et al.* gelang es 2015 im Rahmen einer Studie GS-Werte gesunder Kinder und Jugendlicher zu bestimmen und Normwerte für typische GS zu definieren (1).

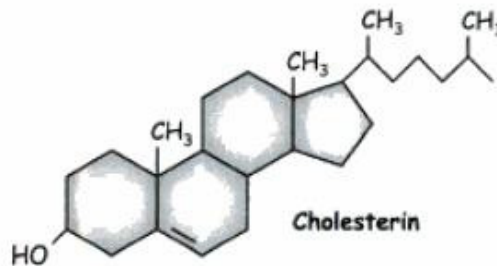
In mehreren Studien konnten - neben den typischen - auch für den Menschen „atypische“ GS im Serum nachgewiesen werden. Das Auftreten dieser atypischen GS wurde das erste Mal 1955 von Haslewood *et al.* in Schweinegalle dokumentiert (2). Später konnten atypische GS beim Menschen in Mekonium, Nabelschnurblut und Fruchtwasser nachgewiesen werden (3, 4). Außerdem wurden atypische GS im Urin von schwangeren Frauen gefunden, da der Fetus große Mengen atypischer GS über die Plazenta an die Mutter abzugeben scheint (5). Erstaunlicherweise wurden atypische GS aber nicht nur bei Neugeborenen und Schwangeren gefunden, sondern auch bei PatientInnen mit einer primären biliären Cholestase (6).

In dieser Arbeit wurden die Gesamtwerte atypischer GS im Serum von Kindern und Jugendlichen bis 19 Jahre untersucht. Des Weiteren wurden die Profile atypischer GS genau betrachtet und analysiert. Ziel war es zu beurteilen, inwieweit sich die GS-Werte in unterschiedlichen Altersgruppen verändern. Untersucht wurden die Serumproben mittels High-performance liquid Chromatografie (HPLC) gekoppelt an Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), da diese Messtechnik nur geringe Probenmengen benötigt, was vor allem für die Kinder- und Jugendheilkunde einen wichtigen Aspekt darstellt. Aus den gewonnenen Werten wurden Normwerte für atypische GS im Serum von Kindern und Jugendlichen innerhalb eines 95%-Konfidenzintervalls definiert.

1.2 Gallensäuren

GS sind der wichtigste Bestandteil der Gallenflüssigkeit, die des Weiteren Phospholipide (v.a. Lecithin), Cholesterin, Gallenfarbstoffe (v.a. Bilirubin), Elektrolyte und Wasser beinhaltet (7). Sie werden in den Hepatozyten der Leber in einem komplexen, multienzymatischen Prozess aus Cholesterin (siehe Abbildung 1) gebildet. Mittels dieses Vorgangs kann Cholesterin, ein unlösliches und ungeladenes Molekül, in ein wasserlösliches, membranlösliches und amphiphiles GS-Molekül umgewandelt werden (8). Erst durch den amphiphilen Charakter der GS wird die für die Fettresorption wichtige Mizellenbildung möglich. Des Weiteren stellen GS die einzige Möglichkeit dar, Cholesterin aus dem Körper zu eliminieren (7).

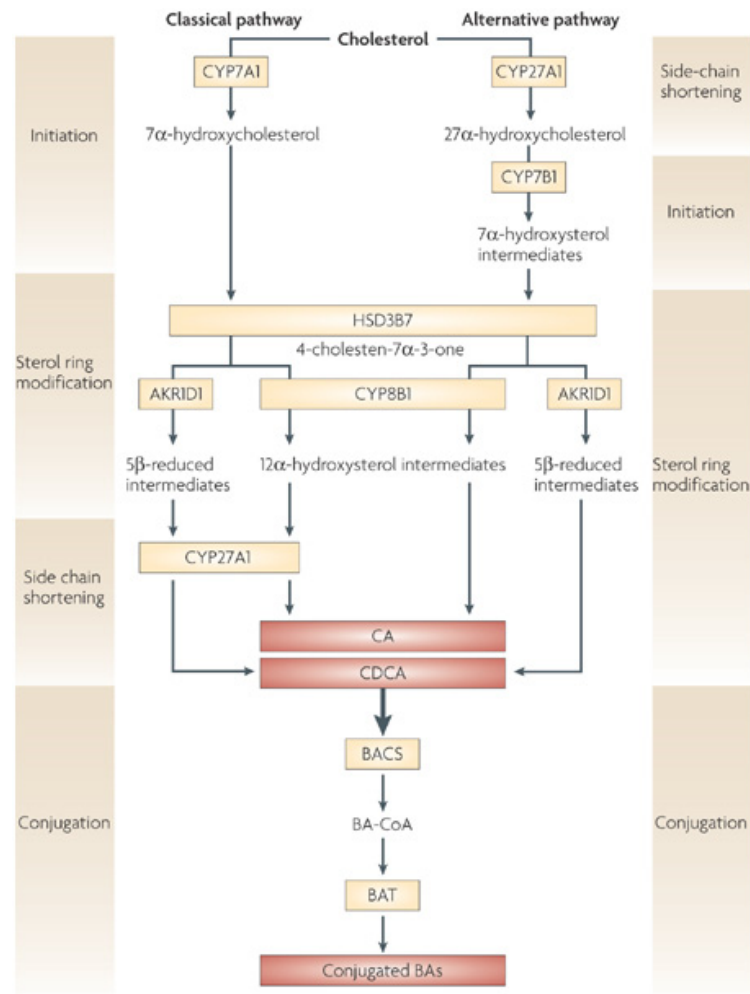
Abbildung 1: Strukturformel Cholesterin (7)



1.2.1 Bildung der GS

Die GS werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert. Chemisch bestehen sie aus einem Cyclopentanoperhydrophenanthrenring (Steran) und einer 5C-Seitenkette mit einer terminalen Carboxylgruppe (9). Im Rahmen der GS-Biosynthese kommt es in den Hepatozyten zur Bildung der primären GS Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA). Im Wesentlichen werden die GS durch das spezifische Einführen von Hydroxyl- (OH) Gruppen in Cholesterinmoleküle gebildet. Erfolgt die Hydroxylierung lediglich an C3 und C7, erhält man CDCA. Wird zusätzlich auch C12 hydroxyliert entsteht CA (7). Die Umwandlung von Cholesterin in GS kann über zwei verschiedene Synthesewege erfolgen: Entweder über den klassischen (neutralen) oder den alternativen (sauren) Weg (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Biosynthese GS (klassisch und alternativ) (10)



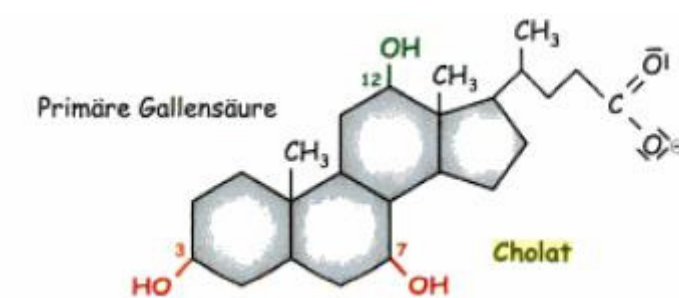
Nature Reviews | Drug Discovery

75% der GS werden über den klassischen Weg gebildet (10). Dieser beginnt mit dem Einführen einer OH- Gruppe an Position C7 des Cholesterinkerns. Die Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1), ein leberspezifisches Cytochrom P450-Enzym, katalysiert diesen Schritt. CYP7A1 befindet sich ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten und stellt außerdem das Schrittmacherenzym des klassischen Weges dar. Im alternativen Syntheseweg werden die Cholesterinmoleküle zunächst an Position 27 hydroxyliert. Dies erfolgt über die Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1), ebenfalls ein Cytochrom P450-Enzym, welches allerdings in den Mitochondrien vieler Gewebe vorkommt. Die anschließende 7 α -Hydroxylierung erfolgt mittels der Oxysterol-7 α -Hydroxylase (CYP7B1).

Modifikationen am Sterolring über die mikrosomale 3 β -Hydroxy- Δ 5-C27-Steroid-Oxidoreduktase (HSD3B7) erfolgen in beiden Synthesewegen gleichermaßen (10). Nach diesem gemeinsamen Schritt bestimmt die Aktivität der 12 α -Hydroxylase (CYP8B1) das Ausmaß der Synthese von CA und CDCA. Jene Moleküle die von CYP8B1 an C12 hydroxyliert werden, werden zu CA. Aus allen übrigen entsteht CDCA (9).

Die Gallenflüssigkeit weist einen alkalischen pH-Wert auf. In der Galle liegen die GS als Anionen vor, den sogenannten Gallensalzen. CA wird dann als Cholat und CDCA als Chenodeoxycholat bezeichnet (siehe Abbildung 3) (7).

Abbildung 3: Primäre GS (Cholat) (7)



1.2.2 Konjugation der GS

Die neusynthetisierten GS werden zu 98% mit den Aminosäuren Glycin (G) oder Taurin (T) konjugiert wobei die G-Konjugate beim erwachsenen Menschen physiologisch überwiegen. Die Konjugation umfasst zwei Schritte. Zuerst werden die primären GS über die Bile-Acid-CoA-Synthase (BACS) mit Coenzym A (CoA) verknüpft. Das Enzym Bile-Acid-Aminoacid-N-Acyltransferase (6) bewirkt dann schlussendlich die Konjugation mit G oder T (siehe Abbildung 2) (10). Die Konjugation ist sinnvoll, da sie die GS wasserlöslicher macht. Des Weiteren macht sie die GS impermeabel gegenüber Zellmembranen. Dies ermöglicht, dass auch größere Konzentrationen an GS in Gallenflüssigkeit und Darminhalt persistieren können (8).

1.2.3 Sekundäre GS

Sobald die GS in den Darm gelangen, erfolgen verschiedene Reaktionen, die durch Darmbakterien getriggert werden. Einerseits kommt es zu einer Dekonjugation der Seitenkette, bei der G und T wieder abgespalten werden. Andererseits sorgen bakterielle Dehydratasen dafür, dass die OH-Gruppe von C7 entfernt wird. Dadurch kommt es zur Bildung der sekundären GS. Aus CA entsteht Deoxycholsäure (DCA) und aus CDCA Lithocholsäure (LCA). Eine weitere GS, die Ursodeoxycholsäure (UDCA), liegt in geringen Konzentrationen vor. UDCA weist dieselbe Struktur wie CDCA auf, ihre Hydroxylgruppe an C7 liegt allerdings in β -Konfiguration vor (7). In Tabelle 1 sind die freien GS dargestellt. In den Tabellen 2 und 3 sind die konjugierten GS aufgelistet.

Tabelle 1: Freie GS

CA	Cholsäure
CDCA	Chenodeoxycholsäure
DCA	Desoxycholsäure
LA	Lithocholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure

Tabelle 2: T-Konjugate

TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TDCA	Taurodeoxycholsäure
TLA	Taurolithocholsäure
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure

Tabelle 3: G-Konjugate

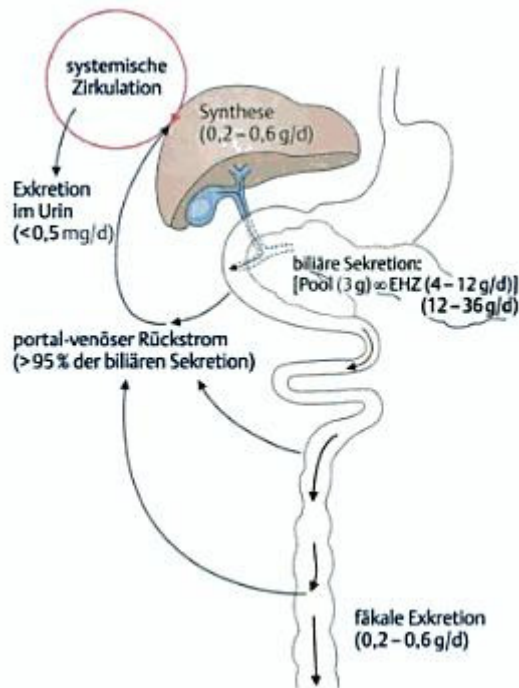
GCA	Glycocholsäure
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GDCA	Glycodeoxycholsäure
GLA	Glycolithocholsäure
GUDCA	Glykoursodeoxycholsäure

1.2.4 Der enterohepatische Kreislauf

Die GS durchlaufen einen enterohepatischen Kreislauf. Dabei werden sie nach der Synthese in den Hepatozyten und der Sekretion in die Gallenkanalikuli in das Duodenum transportiert. Größtenteils werden sie dann im terminalen Ileum rückresorbiert und gelangen über die portalvenöse Zirkulation in die Lebersinusoide zurück, wo sie von den Hepatozyten aufgenommen und erneut biliär sezerniert werden (11). Die Absorption aus dem terminalen Ileum führt zur Anhäufung großer GS-Mengen und wird als Gallensäurepool bezeichnet. Dieser umfasst bei Erwachsenen ca. 2 bis 3 g GS.

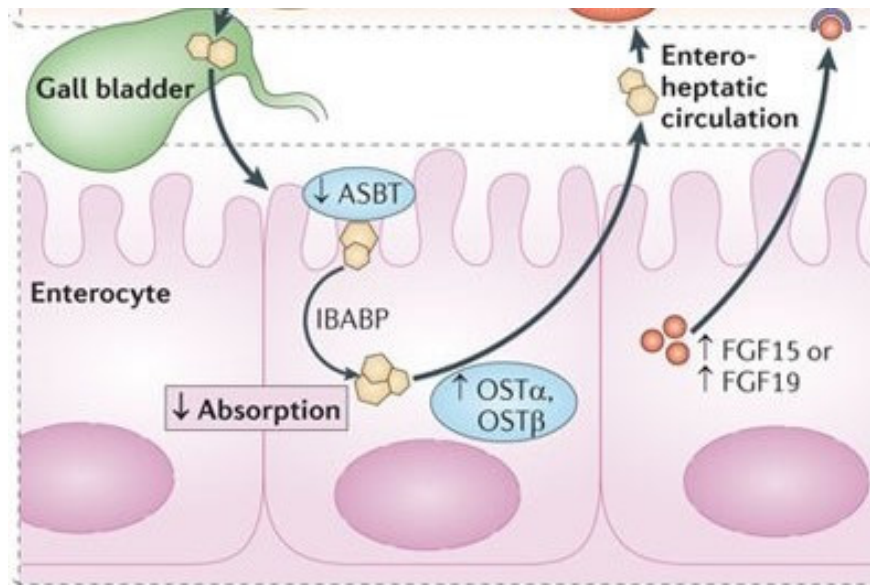
Weil der Gallensäurepool mehrere Male für eine Mahlzeit zirkulieren muss, liegt die GS-Sekretion bei 4 bis 6 g pro Mahlzeit bzw. 12 bis 18 g pro Tag (8). Es werden über 95% der GS im terminalen Ileum resorbiert. Nur 200-600 mg der GS werden pro Tag fäkal ausgeschieden und müssen dementsprechend neu in der Leber synthetisiert werden. Über den Urin werden täglich unter 0,5 mg GS ausgeschieden (siehe Abbildung 4) (12).

Abbildung 4: Enterohepatische Zirkulation (13)



Die Aufnahme von konjugierten GS in die Enterozyten erfolgt vorwiegend über einen Na^+ -abhängigen Transport durch den an der apikalen Membran lokalisierten Apical-Sodium-Dependent-Bile-Acid-Transporter (ASBT) (siehe Abbildung 5). In murinen Enterozyten wurde eine Na^+ -unabhängige Aufnahme von GS im Jejunum nachgewiesen. Diese wird über Organic-Anion-Transporting-Peptides (OATP3) vermittelt (11). Im Colon werden die GS vermutlich nur durch passive Diffusion aufgenommen (8). Nach der Aufnahme in die Enterozyten erfolgt wahrscheinlich eine Bindung der GS an Vesikel und zytosolische Proteine wie das Ileal-Bile-Acid-Binding-Protein (I-BABD). Der basolaterale Efflux der GS in das portalvenöse Blut erfolgt im terminalen Ileum über den Organic-Solute-Transporter ($\text{OST}\alpha/\text{OST}\beta$) (11).

Abbildung 5: Gallensäuretransportsysteme des Enterozyten (14)



1.2.5 Regulation der Gallensäurebiosynthese

Über komplexe Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren regulieren GS ihre eigene Synthese, die hepatozelluläre Aufnahme und Sekretion, sowie die intestinale Resorption.

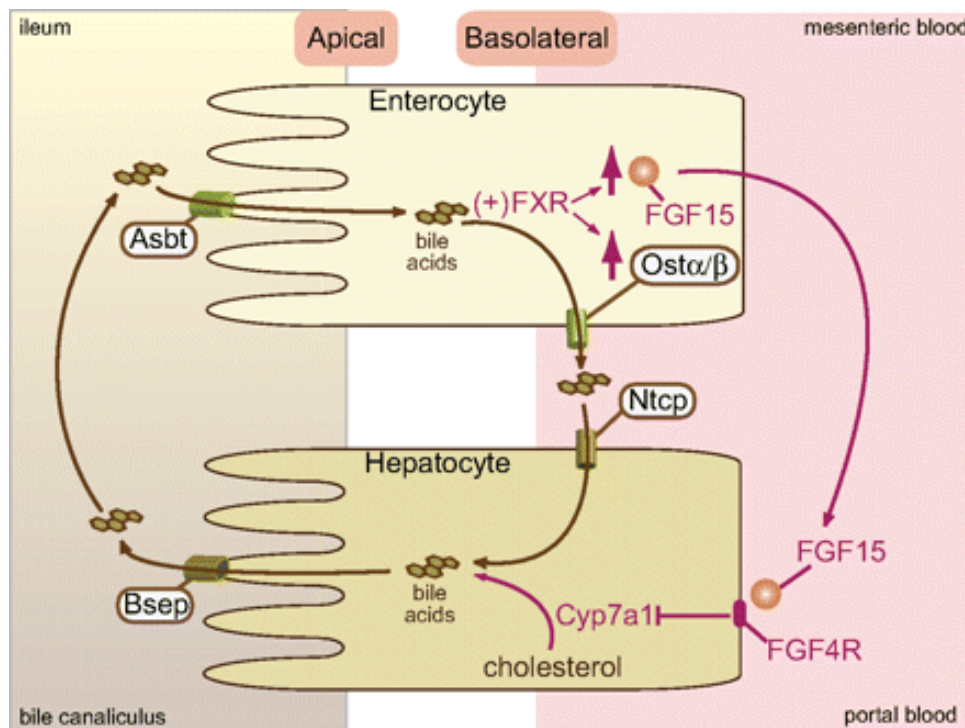
GS interagieren mit nukleären Rezeptoren, d.h. mit Transkriptionsfaktoren, die nach Aktivierung durch Liganden die Expression von Zielgenen regulieren. GS sind Liganden des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR), des Pregnane-X-Rezeptors (PXR) und des Vitamin-D-Rezeptors (VDR). Nach der Bindung eines Liganden ändern die Rezeptoren ihre Konformation und binden dann spezifisch an DNA-Bindungsdomänen in regulatorischen Abschnitten ihrer Zielgene. Die Transkription der Zielgene wird dadurch stimuliert oder inhibiert. FXR ist der zentrale nukleäre Rezeptor der GS-Biosynthese und des GS-Transports.

Die GS-Synthese wird durch einen negativen Feedbackmechanismus reguliert. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Wegs, CYP7A1, wird durch die aus dem Pfortaderblut aufgenommenen GS gehemmt. Dies geschieht über eine Aktivierung von FXR. FXR hemmt nach Bindung von GS über den

Fibroblast growth factor 19 (FGF-19) die CYP7A1- Gentranskription (11). Auch die Expression von CYP8B1, welches das Verhältnis zwischen CA und CDCA bestimmt (15), und der β -HMG-CoA-Reduktase, das Schrittmacherenzym der Cholesterinbiosynthese (7) wird von den GS selbst geregelt.

Außerdem steigern GS über FXR die Gentranskription der kanalikulären Effluxpumpen Bile-Salt-Export-Pump (BSEP) und Multidrug-Resistance-associated-Protein 2 (MRP2). Die GS stimulieren somit ihre eigene hepatische Sekretion und die von anderen hepatischen Anionen. Zusätzlich wird durch FXR die Expression des basolateralen Aufnahmetransporters Na^+ -Dependent-Taurocholate-Cotransporting-Peptide (NTCP) gehemmt (11). Die Regulation der GS-Synthese ist in Abbildung 6 grafisch dargestellt.

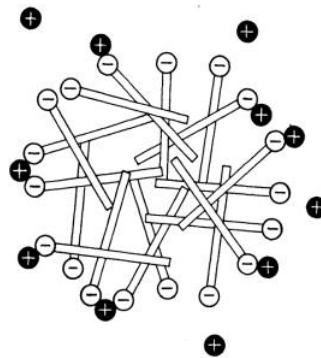
Abbildung 6: Regulation der Gallensäuresynthese (16)



1.2.6 Aufgaben der GS

Die wichtigste Funktion der GS ist die Elimination von Cholesterin. Wie schon beschrieben, kann das wasserunlösliche Cholesterin in der Leber in GS umgewandelt werden. GS sind amphiphile Moleküle, d.h. sie haben sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften. In wässriger Lösung sind solche Moleküle dazu befähigt sogenannte Mizellen zu bilden (siehe Abbildung 7). In diese Mizellen können auch noch andere lipophile und amphiphile Stoffe eingelagert und damit verpackt und transportiert werden (7). Erst die Einlagerung in Mizellen ermöglicht es dem Cholesterin von den Hepatozyten in das Darmlumen zu gelangen. Zusätzlich werden auch Phospholipide in die Mizellen eingelagert. Schlussendlich kann Cholesterin dann fäkal ausgeschieden werden (8).

Abbildung 7: Mizellenbildung (17)



Eine wichtige Rolle spielen die GS bei der Fettresorption. Die GS übernehmen, gemeinsam mit Lecithin, die Funktion des Emulgators zwischen der hydrophilen und der lipophilen Phase bei Emulsionen und Mizellen. In Folge dessen können Fette und auch die lipophilen Vitamine A, D, E und K über die Dünndarmwand aufgenommen werden (7). Aber auch die Resorption von Eisen und Calcium wäre ohne die GS nicht möglich.

Eine weitere Funktion der GS ist die Stimulation des Galleflusses. Die GS werden aktiv in die biliären Kanalikuli transportiert. Aufgrund ihrer osmotischen Eigenschaften induzieren sie so den Gallefluss. Auch die Stimulation der Sekretion von Phospholipiden in die Gallenflüssigkeit ist eine Aufgabe der GS.

Phospholipide unterstützen die Mizellenbildung und verhindern, dass die GS das Epithel der Gallengänge schädigen (8). Des Weiteren agieren GS als Signalmoleküle, die nukleäre Rezeptoren aktivieren können (siehe Kapitel 1.2.5). GS aktivieren FXR und regulieren darüber den GS-, Lipoprotein- und Triglyceridstoffwechsel. Außerdem spielt FXR eine wichtige Rolle im Glukose- und Energiestoffwechsel. GS sind in der Lage einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (TGR5) in braunem Fettgewebe zu aktivieren und können unter anderem auf diese Weise Einfluss auf den Energiestoffwechsel nehmen (15).

1.2.7 Zytotoxizität der GS

GS sind sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zytotoxisch, wenn ihre Konzentrationen auf abnormal hohe Werte ansteigen. Das Ausmaß der Zellschädigung ist stark von der Struktur der GS abhängig: Je hydrophober eine GS desto größer die Zytotoxizität. CDCA und DCA sind beispielsweise hoch zytotoxisch, da sie sehr hydrophob sind. UDCA ist hydrophil und dadurch frei von zytotoxischen Eigenschaften (8). GS mit einer 7 β -Hydroxylgruppe wie UDCA können die hydrophoben GS ersetzen. Dies ist für die Behandlung von Erkrankungen wie angeborenen Stoffwechselstörungen der GS-Synthese von Bedeutung (9). CA ist in geringen Konzentrationen nicht zytotoxisch. Liegen jedoch größere Konzentrationen kann CA zellschädigend wirken.

Intrazelluläre Zellschäden werden nur verursacht, wenn die Zellmembran einen Transporter beinhaltet, der konjugierten GS den Eintritt in das Zellinnere ermöglicht. Derzeit konnten intrazelluläre Zellschäden durch konjugierte GS nur in Hepatozyten gesichert nachgewiesen werden. GS-Konjugate können bei Gesunden schnell aus den Hepatozyten eliminiert werden. Ist die Elimination allerdings beeinträchtigt, häufen sich die GS im Zellinneren an, schädigen die Zellorganellen und können bis zu Apoptose oder Nekrose führen (8). Dies ist zum Beispiel bei intrahepatischer Cholestase der Fall (18).

1.3 GS in der Pädiatrie

Die Galleproduktion beginnt am Anfang des 4. Schwangerschaftsmonats. Von diesem Zeitpunkt aus enthält das Gallenwegsystem ständig Galle, die in den Darm ausgeschieden wird und seinem Inhalt eine dunkelgrüne Farbe verleiht (Mekonium). Aus Studien ist bekannt, dass Gallebildung und -ausscheidung beim Fetus unreif sind: bis zu 40% werden über die Plazenta entfernt (9). GS sind hauptsächlich in der Gallenflüssigkeit, aber auch im Serum nachweisbar. In der Pädiatrie können die Serum-GS als Marker für angeborene oder erworbene hepatische Erkrankungen genutzt werden (1).

1.3.1 Normwerte der GS im Serum bei Kindern und Jugendlichen

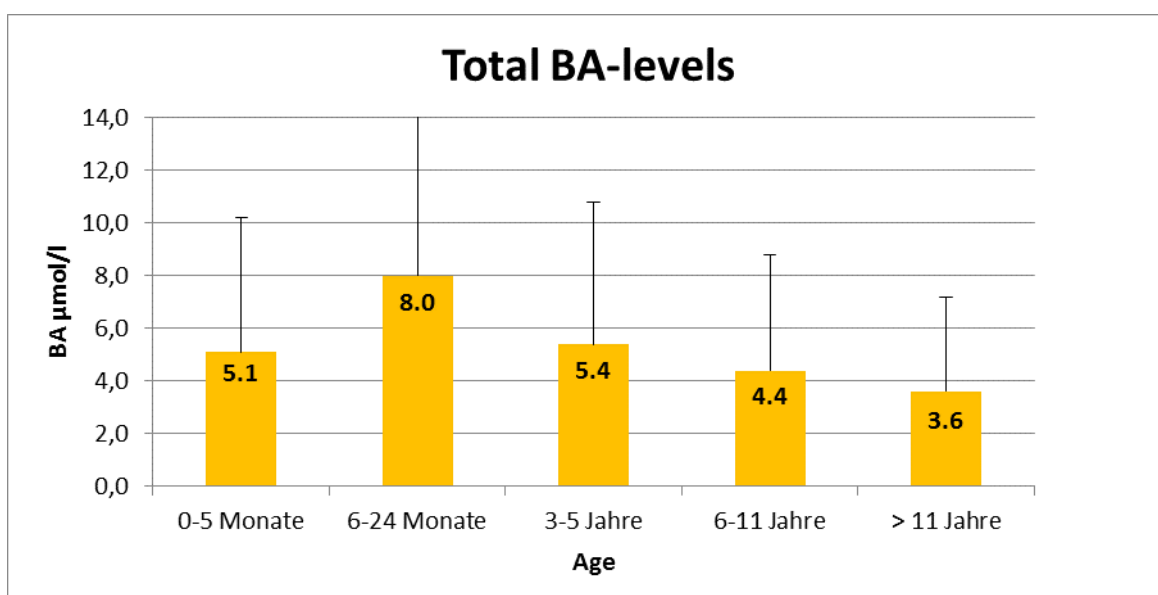
Interessanterweise unterscheidet sich der Gallensäurepool eines Neugeborenen erheblich von dem eines Jugendlichen. Jahnel *et al.* konnten im Rahmen einer Studie 2015 Normwerte für GS im Serum von Neugeborenen und Kindern definieren (siehe Tabelle 4). Die Werte wurden mittels „Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie“ (HPLC-MS/MS) gewonnen. Im Rahmen der Studie konnte festgestellt werden, dass die Gesamt-GS-Werte von Neugeborenen, verglichen mit denen von Erwachsenen, erhöht sind und sogar noch nach der Geburt ansteigen. Im Alter zwischen 6 bis 24 Monaten erreichen sie einen Peak. Danach nehmen die Gesamt-GS-Werte bis zum Alter von elf Jahren kontinuierlich ab, bleiben dann konstant und ähneln denen eines Erwachsenen. Die Unterschiede der GS-Werte im Serum von Neugeborenen und Kindern könnten aus einer physiologischen Unreife des enterohepatischen Kreislaufes resultieren. In Abbildung 8 sind die Gesamt-GS bei Kindern und Jugendlichen graphisch dargestellt.

Tabelle 4: Normale GS-Werte in verschiedenen Altersgruppen (1)

Alter	N	GS ($\mu\text{mol/l}$)	Konfidenzintervall 95%
0-5 Monate	17	5.1 \pm 2.2	3.9 - 6.3
6-24 Monate	13	8.0 \pm 5.6	6.6 - 9.4
3-5 Jahre	22	5.4 \pm 2.7	4.3 - 6.4
6-11 Jahre	44	4.4 \pm 2.7	3.6 - 5.1
>11 Jahre	98	3.6 \pm 1.9	3.1 - 4.1

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 8: Graphische Darstellung der Gesamt-GS bei Kindern und Jugendlichen (1)



BA= GS; Age= Alter

In der Studie von Jahnle *et al.* wurden des Weiteren altersabhängige Unterschiede in der Komposition des Gallensäurepools festgestellt (1). Die Gallenflüssigkeit eines Neugeborenen weist lediglich primäre GS auf. Die anaerobe Flora des Darms, die für die Entwicklung der typischen sekundären GS essentiell sein könnte, entwickelt sich vermutlich erst innerhalb des ersten Lebensjahres. Gekennzeichnet ist diese Entwicklung durch das Auftauchen von DCA in der Gallenflüssigkeit (8). Bei Neugeborenen bestehen 95% des Gallensäurepools aus konjugierten primären GS. Mit zunehmendem Alter steigt allerdings der Spiegel der unkonjugierter GS an. Bei Neugeborenen liegen außerdem in erster Linie GS vor, die mit T konjugiert sind (1).

In einer Studie konnten Baldeón *et al.* zeigen, dass T reichlich in Muttermilch enthalten ist. Daher ist ein Zusammenhang zwischen der Menge der T-konjugierten GS bei Neugeborenen und der Ernährung wahrscheinlich (19). Schon nach sechs Monaten überwiegen die G-Konjugate. In der Studie von Jahnel *et al.* konnten keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in den GS-Profilen der untersuchten Kinder entdeckt werden (1).

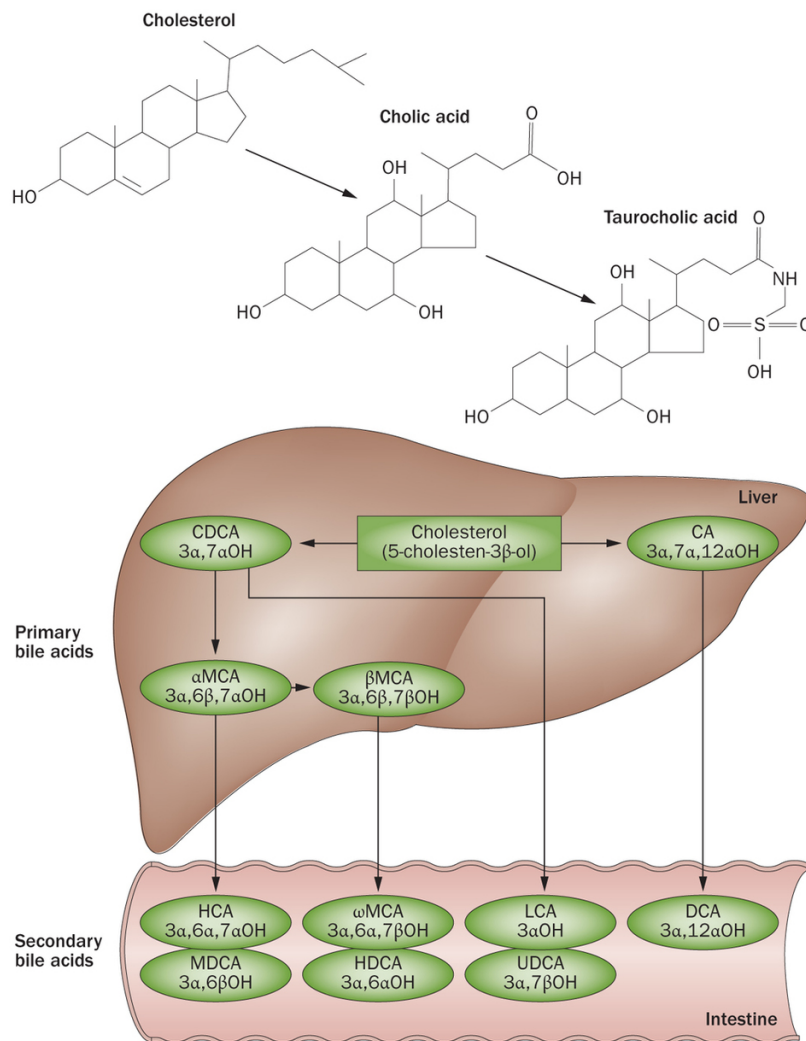
1.3.2 Atypische GS in der Pädiatrie

Studien konnten zeigen, dass im Gallensäurepool eines Neugeborenen ein Anteil atypischer GS messbar ist, welcher sich in der Gallenflüssigkeit eines gesunden Erwachsenen allerdings nicht nachweisen lässt (20). Atypische GS bei Jugendlichen wurden bisher nicht untersucht. In unserer Studie konnten jedoch auch im Serum von Kindern und Jugendlichen atypische GS gemessen werden. Atypische GS zeichnen sich dadurch aus, dass sie teilweise ungesättigt sind und zusätzliche Hydroxylgruppen an atypischen Stellen haben, insbesondere an den Positionen C1, C6 und C23 (21).

Das erste Mal wurden atypische GS fast zeitgleich zwischen 1955 und 1960 dokumentiert. Zum einen wurde eine speziesspezifische GS in Schweinegalle (2) zum anderen zwei speziesspezifische GS in Rattengalle (22) gefunden. Nach Isolation und Charakterisierung der GS wurde festgestellt, dass es sich um isomere 3 α ,6,7-Trihydroxy-5 β -Cholansäuren handelte. Die GS der Schweinegalle wurde Hyocholsäure bzw. γ -Muricholsäure (HCA/GMCA; 3 α ,6 α ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure) genannt. Die zwei GS der Rattengalle wurden als α - und β -Muricholsäure (AMCA; 3 α ,6 β ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure und BMCA, 3 α ,6 β ,7 β -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure) bezeichnet (23). Nachträglich konnte ein viertes Isomer in der Ratte gefunden werden, welches ω -Muricholsäure (OMCA) genannt wurde (24). Eine Auflistung der atypischen GS, die im Rahmen unserer Studie bestimmt wurden, ist in Tabelle 5 zu finden.

Auch bei den atypischen GS werden primäre und sekundäre GS unterschieden. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, werden die AMCA und BMCA zu den primären atypischen GS gezählt. Die GMCA, OMCA, HDCA und MDCA gehören den sekundären GS an (25). Die MDCA wurde in unserer Studie nicht bestimmt. Wie auch bei den humanen GS kann auch jede der atypischen GS mit G oder T konjugiert werden. Der genaue Bildungsweg der atypischen GS beim Menschen ist noch unbekannt.

Abbildung 9: Bildung der atypischen GS (25)



Back *et al.* stellten 1980 atypische GS im Mekonium fest (3). Im Jahre 1988 entdeckten Shoda *et al.* atypische GS im Nabelschnurblut und in der Amnionflüssigkeit von Reifgeborenen (4). Für die Entwicklungsphase der kindlichen Leber ist das Auftreten atypischer GS jedoch nicht ungewöhnlich. Der

wichtigste Unterschied zum Erwachsenen ist die Fähigkeit zur Hydroxylierung, welche im ersten Lebensjahr allerdings abnimmt. Die Polarität der GS wird durch die Hydroxylierung vergrößert. Dadurch können GS leichter über die Nieren ausgeschieden werden und das membranschädigende Potenzial der GS wird verringert (8).

In Studien konnte gezeigt werden, dass fetal gebildete atypische GS vom Fetus zur Mutter übertragen werden. Es wird vermutet, dass schwangere Frauen vermehrt GS über den Urin ausscheiden, um sowohl die fetalen als auch die mütterlichen GS-Konzentrationen zu senken (5). Im Jahr 1989 konnte von Batta *et al.* HCA im Serum und Urin von Patienten mit primär biliärer Zirrhose gefunden werden (6). Die Zusammensetzung des Gallensäurepools spiegelt in der Neugeborenenphase interessanterweise die Verhältnisse bei Erwachsenen mit schwerer Cholestase wieder. Daraus kann man schließen, dass in der erkrankten Leber ein Rückschritt auf diesen ersten Stoffwechselweg erfolgt (20).

Tabelle 5: Atypische GS

AMCA	Alphamuricholsäure
GAMCA	Glykoalphamuricholsäure
TAMCA	Tauroalphamuricholsäure
BMCA	Betamuricholsäure
GBMCA	Glycobetamuricholsäure
TBMCA	Taurobetamuricholsäure
GMCA	Gammamuricholsäure
GGMCA	Glycogammamuricholsäure
TGMCA	Taurogammamuricholsäure
OMCA	Omegamuricholsäure
GOMCA	Glycoomegamuricholsäure
TOMCA	Tauroomegamuricholsäure
HDCA	Hyodeoxycholsäure
GHDCA	Glychoyodeoxycholsäure
THDCA	Taurohyodeoxycholsäure

1.4 Bestimmung atypischer GS-Normwerte bei Kindern und Jugendlichen

Die Definition von Normwerten nimmt in der Medizin einen hohen Stellenwert ein, stellt aber vor allem in der Pädiatrie eine besondere Herausforderung dar. Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede sind bei Kindern und Jugendlichen durch die physiologische Entwicklung von größerer Relevanz als bei Erwachsenen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Ethik in der pädiatrischen Forschung. Studien an oder mit Kindern und Jugendlichen, die nicht rechtsverbindlich zustimmen können, sind selbstverständlich nur mit Einwilligung der Erziehungsberechtigten möglich. Grundsätzlich dürfen an Kindern keine Studien durchgeführt werden, die auch an Erwachsenen möglich sind. Es gibt allerdings eine Vielzahl an Krankheiten, die nur im Kindesalter vorkommen oder in diesem Alter einen spezifischen Verlauf nehmen. Außerdem gibt es entwicklungsbedingte Besonderheiten des kindlichen Organismus, mit der Folge, dass Medikamente oder Nahrungsbestandteile anders verstoffwechselt werden und auch andere Wirkungen und Nebenwirkungen haben als bei Erwachsenen. Pädiatrische Forschung ist also notwendig, wenn man Kinder und Jugendliche nicht von den Fortschritten der Medizin, d.h. von neuen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten, ausschließen will.

Die Evaluation neuer prophylaktischer oder diagnostischer Verfahren erfordert zuerst die Erhebung von Normalwerten und Normalbefunden bei gesunden Kindern. Daher ist eine genaue Definition von Ein- und Ausschlusskriterien wichtig. In der pädiatrischen Forschung müssen die Risiken, denen das Kind ausgesetzt werden könnte, sehr genau geprüft werden. Minimal sind die Risiken bei Untersuchungen des Spontanurins, des Speichels oder bei Verwendung von Blutproben, die im Rahmen notwendiger diagnostischer Untersuchungen gewonnen werden (26).

Wegen des geringen Risikos wurden auch in unserer Studie lediglich Blutproben verwendet, die ansonsten verworfen worden wären. Da die humanen GS als Biomarker für hepatische und intestinale Erkrankungen verwendet werden können, könnte auch in der Bestimmung der atypischen GS eine klinische Relevanz bestehen. Damit aber die atypischen GS als Biomarker genutzt werden können, muss zunächst die Erhebung von Normalwerten erfolgen. Aufgrund der fehlenden Datenlage, war das Ziel dieser Arbeit daher, Normwerte von atypischen GS im Serum von lebergesunden Kindern und Jugendlichen zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden zur Bestimmung von atypischen GS im Serum

2.1.1 Chromatografie

Die verschiedenen Methoden der Chromatografie liefern die wirksamsten Trenntechniken in einem chemischen Labor. Chromatografischen Trennungen liegen einfache Verfahren zugrunde, die grundlegende physikalische Eigenschaften von Molekülen ausnutzen. Die genutzten Eigenschaften sind:

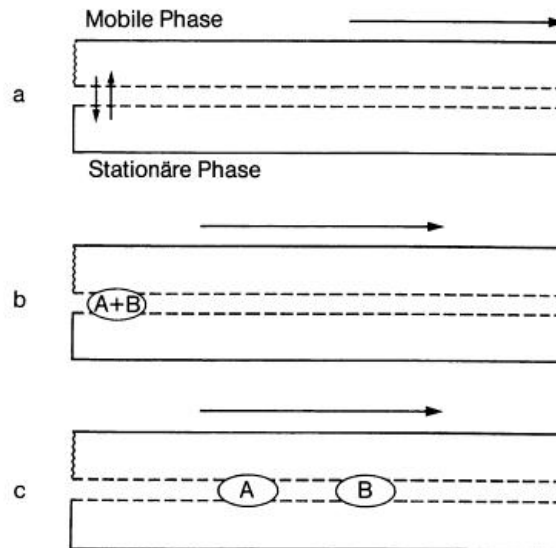
- Das Bestreben eines Moleküls sich in einer Flüssigkeit zu lösen (Löslichkeit)
- Das Bestreben eines Moleküls sich an der Oberfläche eines porösen Festkörpers anzulagern (Adsorption)
- Die Tendenz eines Moleküls zu verdampfen oder in den Gasraum überzugehen (Dampfdruck)

In einem chromatografischen System müssen sich die Komponenten des zu trennenden Gemischs in zwei dieser Eigenschaften unterscheiden. Auch wenn die Unterschiede sehr klein sind, schafft man so die Grundlage für eine Trennung. Eine Trennung kann erreicht werden, indem man eine Phase (die mobile Phase) mechanisch in Bezug zu einer anderen Phase (der stationären Phase) bewegt. Die mobile Phase kann ein Gas oder eine Flüssigkeit sein, die stationäre Phase durch einen Flüssigkeitsfilm auf einem festen Träger oder einer Festkörperoberfläche realisiert werden (siehe Abbildung 10a).

Bringt man die zu trennende Lösung (A+B) in das System ein (siehe Abbildung 10b), so werden sich die beiden Komponenten entsprechend ihrer jeweiligen Eigenschaften zwischen den beiden Phasen verteilen. Bewegt sich nun eine der beiden Phasen, so bewegen sich die Substanzen im Gemisch mit.

Die Substanz mit der größeren Affinität zur mobilen Phase wird sich schneller durch das System bewegen als die Substanz mit den gegenteiligen Eigenschaften (siehe Abbildung 10c). Die Substanzen liegen anschließend getrennt voneinander vor.

Abbildung 10: Chromatografie (27)



Es gibt verschiedenste Chromatografie-Techniken. Auf Basis der mobilen Phase, die eine Flüssigkeit oder ein Gas sein kann, ist es möglich die Chromatografie in Flüssigkeitschromatografie (englisch: Liquid Chromatography; LC) oder Gaschromatografie (englisch: Gas Chromatography; GC) einzuteilen. Auf der Grundlage der stationären Phase, Flüssigkeit oder Festkörper, gibt es die Möglichkeit zwischen Verteilungschromatografie und Adsorptionchromatografie zu unterscheiden. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der mobilen und stationären Phase sind in Tabelle 6 dargestellt (27).

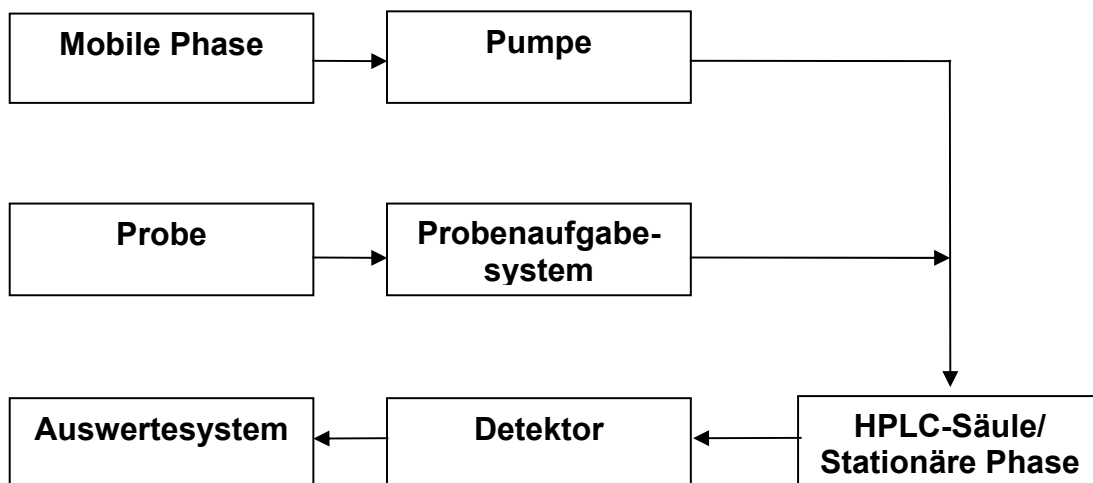
Tabelle 6: Bezeichnung der chromatografischen Grundtypen (27)

		Mobile Phase	
		Flüssig	Gasförmig
Stationäre Phase	Fest	Flüssig-Fest-Chromatografie	Gas-Fest-Chromatografie
	flüssig	Flüssig-Flüssig-Chromatografie	Gas-Flüssig-Chromatografie

2.1.2 High-performance liquid Chromatography

Die High-performance liquid Chromatography (HPLC) ist eine Form der Chromatografie und beruht auf dem gleichen Prinzip, das bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben wurde. Die stationäre Phase befindet sich in einer Säule, durch die die mobile Phase gepumpt wird (28). Die HPLC ermöglicht allerdings neben der Auftrennung von Substanzen eine gleichzeitige Quantifizierung (29). Ein HPLC-System besteht aus vier Hauptteilen: einer Pumpe, einem Probenaufgabesystem, einer Trennsäule und einem Detektor mit Auswertesystem, welches dann ein Chromatogramm erstellt (siehe Abbildung 11) (28). Der Detektor hat die Aufgabe jenen Zeitpunkt zu registrieren, zu dem ein Substanzpeak von der Säule eluiert wird. Diese Veränderungen werden vom Detektor wahrgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches anschließend von einem Computer ausgewertet wird. Anders als bei der Gaschromatografie kann mit Hilfe der HPLC eine Trennung von freien, aber auch von Glycin- und Taurin-konjugierten GS erreicht werden. In kurzer Zeit kann so eine große Anzahl von GS bestimmt werden (29).

Abbildung 11: HPLC-System

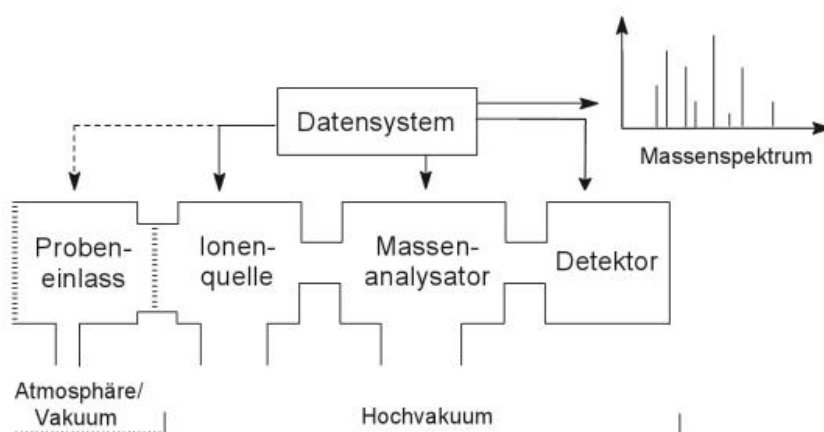


2.1.3 Massenspektrometrie

Ziel der Massenspektrometrie (MS) ist die Identifizierung einer Verbindung aus den Molekül- bzw. Atommassen ihrer Bestandteile. Das Grundprinzip besteht darin, aus anorganischen oder organischen Substanzen Ionen zu erzeugen, die dann nach ihrem spezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt werden. Anschließend werden sie mit Hilfe eines Registrierungssystems nach ihrem spezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnis qualitativ und quantitativ erfasst. Die Ionisation der Substanzen kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit energiereichen Elektronen, Ionen oder Photonen erfolgen. Durch statische oder dynamische, elektrische oder magnetische Felder erfolgt dann die Trennung der Ionen.

Es gibt ein Grundschema, nach dem alle Massenspektrometer aufgebaut sind (siehe Abbildung 12). Sie bestehen aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor, die unter Hochvakuumbedingungen betrieben werden. Des Weiteren sind Vorrichtungen zur Probenzuführung, Verdampfung und anschließenden Ionisation vorhanden (30).

Abbildung 12: Generelles Schema eines Massenspektrometers (30)



2.1.4 Tandem-MS

Die Tandem-MS oder Massenspektrometrie-Massenspektrometrie (MS/MS) macht die Untersuchung einzelner Ionen möglich, die sich in einer Mischung von Ionen befinden (31). Man versteht darunter sämtliche Techniken, bei denen massenselektierte Ionen einer zweiten massenspektrometrischen Analyse unterzogen werden (30). In einem typischen MS/MS Experiment werden zwei Massenspektrometer verwendet. Diese messen zum einen die Vorläufer-, zum anderen die Produkt-Ionen. Bei der ersten Messung werden die Ionen, die von Interesse sind, bestimmt. Diese sogenannten Vorläufer-Ionen werden dann dissoziiert und erzeugen letztlich Produkt-Ionen. Anschließend werden die Produkt-Ionen mit dem zweiten Massenspektrometer analysiert (31).

2.1.5 HPLC-MS/MS

Zur Analyse komplexer Gemische wird die MS in der Regel mit chromatografischen Trennverfahren kombiniert. So auch bei der HPLC-MS/MS. HPLC-MS/MS ist eine der sensitivsten und genauesten quantitativen Analysetechniken, die für organisches Probenmaterial zur Verfügung stehen. Die Flüssigkeitschromatografie dient hierbei zur Auftrennung der Stoffe und die MS der Quantifizierung der verschiedenen Bestandteile. Vor allem für Proben die nur in sehr geringen Mengen vorliegen, ist sie besonders geeignet (32). Aus diesem Grund wird auch am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Universitätsklinik Graz die HPLC-MS/MS zur Analyse von GS im Serum verwendet.

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Zur Bestimmung der Normwerte atypischer GS im Serum von Kindern und Jugendlichen wurde Blut von 45 PatientInnen herangezogen. Die Blutabnahmen erfolgten an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde in Graz. Der Grund für die Blutabnahmen waren verschiedene Indikationen, wobei keine Störung des enterohepatischen Kreislaufs vorlag.

Folgende Einschlusskriterien wurden für die Bestimmung der Normwerte atypischer GS im Serum von Kindern und Jugendlichen festgelegt:

- PatientInnen bis 19 Jahre
- Das Vorliegen folgender Daten: Geburtsdatum, Geschlecht, Ursache der Blutabnahme, eindeutige Diagnose
- Restblut von mindestens 50 µl, welches ansonsten verworfen werden würde

Folgende Ausschlusskriterien wurden für die Bestimmung der Normwerte atypischer GS im Serum von Kindern und Jugendlichen festgelegt:

- Erhöhte Entzündungswerte im Blut: Leukozytose, erhöhtes C-reaktives Protein (CRP)
- Erhöhte Leberwerte im Blut: Aspartataminotransferase (ASAT), Alaninaminotransferase (ALAT), γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT), Kreatininkinase (CK), Bilirubin (gesamt und frei), alkalische Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH)
- Akute rheumatische Erkrankung
- PatientInnen unter Chemotherapie
- PatientInnen mit Erkrankungen, bei denen der enterohepatische Kreislauf beeinträchtigt ist (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen; CED)
- PatientInnen mit primären Lebererkrankungen

2.3 Patientenkollektiv

Im Fachbereich für Kinder- und Jugendheilkunde der Universitätsklinik Graz wurden bereits von Heidrun Hargassner, Barbara Stering, Melanie Prietl-Glößl und Annemarie Saringer Diplomarbeiten verfasst, die sich mit dem Thema „Gallensäuren in der Pädiatrie“ im weitesten Sinne befassen. Aus diesem Grund sind bereits gesammelte Daten vorhanden, die zwischen 2012 und 2015 erhoben und in Tabellen zusammengefasst worden sind. Die klinische Studie wurde durch das Ethikkomitee (26-215 ex 13/14) der Medizinischen Universität Graz genehmigt.

2.4 Auswertung der Proben

Zur Bestimmung der GS im Serum von Kindern und Jugendlichen wurde Probenmaterial verwendet, welches zuvor zur serologischen Diagnostik kapillar abgenommen wurde. Ausschließlich Restblut, das für keine weiteren Diagnosezwecke im Interesse der PatientInnen mehr benötigt wurde, wurde zur Bestimmung der Gesamt-GS und des GS-Profiles herangezogen. Die Zustimmung der Eltern wurde eingeholt. Außerdem wurden die Daten der PatientInnen anonymisiert und standen lediglich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Mittels HPLC-MS/MS wurden am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Universitätsklinik Graz die unkonjugierten, aber auch T- und G-konjugierten atypischen (murinen) GS AMCA, BMCA, GMCA, OMCA und HDCA bestimmt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: atypische GS die mittels HPLC-MS bestimmt wurden

Unkonjugierte GS	G-konjugierte GS	T-konjugierte GS
AMCA	GAMCA	TAMCA
BMCA	GBMCA	TBMCA
GMCA	GGMCA	TGMCA
OMCA	GOMCA	TOMCA
HDCA	GHDCA	THDCA

2.5 Statistische Auswertung der Proben

Entsprechend der Altersgruppen wurden sowohl von den Gesamt-GS als auch von den GS-Profilen die Mittelwerte und Standardabweichungen mittels Microsoft Excel 2010 berechnet. Für die Bestimmung der Normwerte wurde zusätzlich ein 95%-Konfidenzintervall Untergrenze/Obergrenze herangezogen, welches mittels SPSS erstellt wurde. Unterschiede wurden mittels t-Tests für unabhängige Stichproben überprüft. Alle Werte mit einem Wert $p \leq 0,05$ wurden als signifikant anerkannt und anhand von Boxplots graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakterisierung

Das Patientenkollektiv wurde in fünf Altersgruppen eingeteilt, da sich die Laborparameter bei Kindern und Jugendlichen durch den Entwicklungsprozess verändern. In Tabelle 8 sind die fünf Gruppen entsprechend dem Alter und der Anzahl der TeilnehmerInnen (n) dargestellt.

Tabelle 8: Gruppeneinteilung für Normwerte

Gruppe	Alter	N
1	0-5 Monate	6
2	6-24 Monate	9
3	3-5 Jahre	11
4	6-11 Jahre	10
5	>11 Jahre	9

3.2 Gesamt-GS

Zunächst wurden die Gesamt-GS aus dem Serum der Kinder und Jugendlichen bestimmt. Deren Werte wurden anschließend den fünf Altersgruppen zugeordnet. Aus den Werten der einzelnen Gruppen wurden die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zur Bestimmung der Normwerte wurde mittels SPSS ein 95%-Konfidenzintervall erstellt (siehe Tabelle 9).

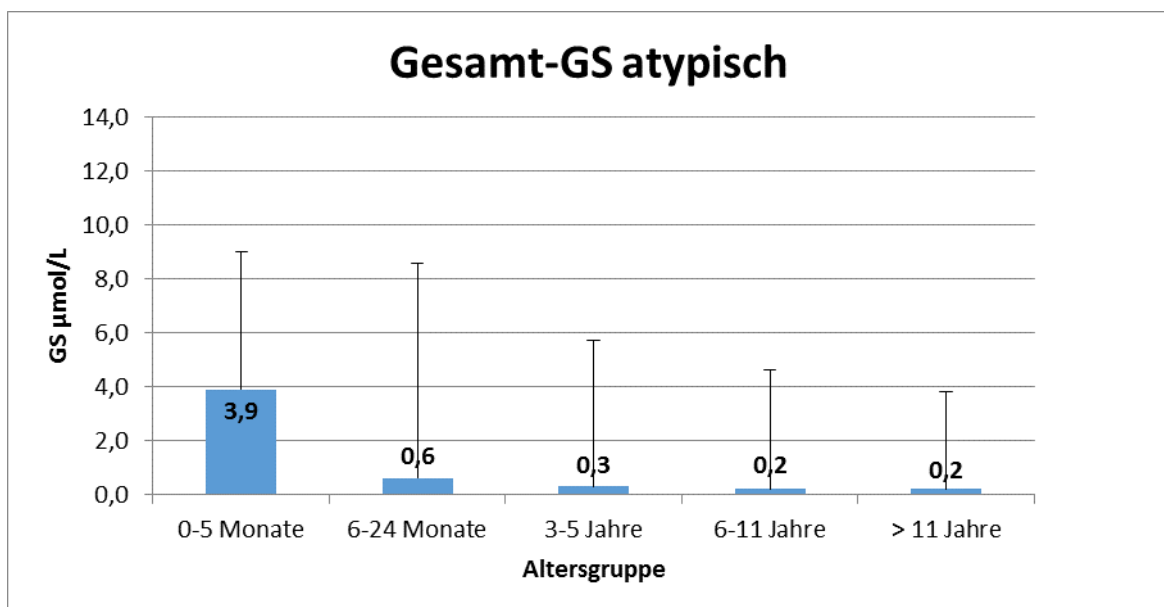
Tabelle 9: Normwerte der atypischen Gesamt-GS

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	3,90	2,25	6	1,54 – 6,26
6-24 Monate	0,63	0,44	9	0,29 – 0,97
3-5 Jahre	0,32	0,21	11	0,18 – 0,46
6-11 Jahre	0,24	0,18	10	0,11 – 0,37
>11 Jahre	0,23	0,23	9	0,05 – 0,40

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

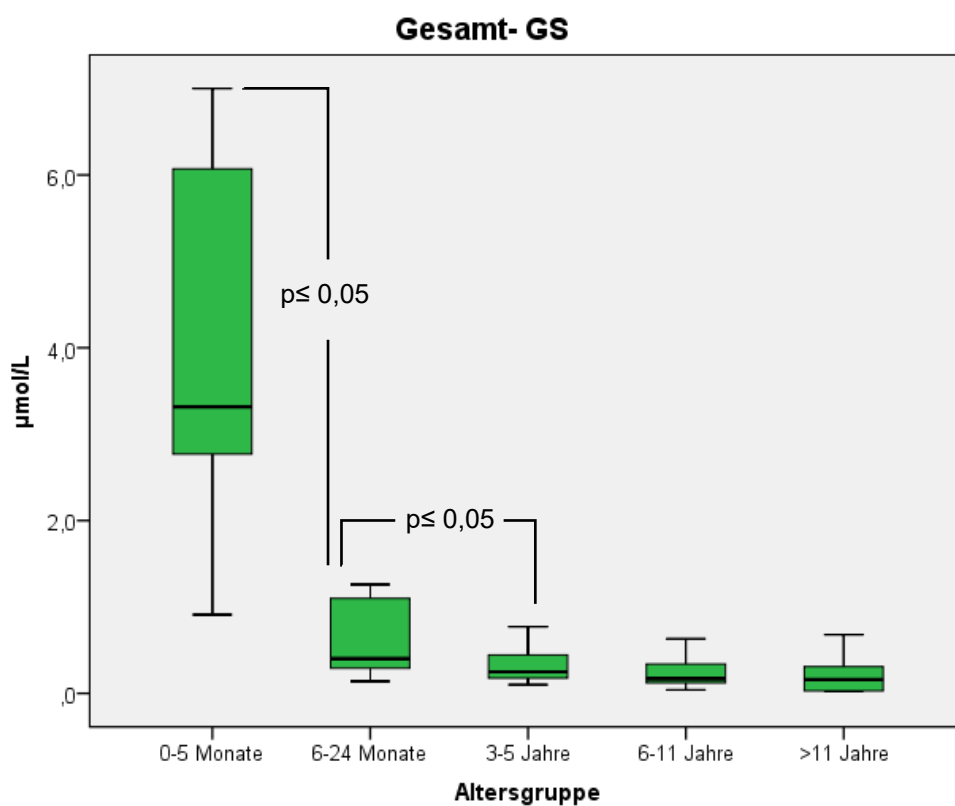
Es konnten altersabhängige Werte der Gesamt-GS festgestellt werden. Die Werte der atypischen GS sind nach der Geburt am höchsten (Mittelwert: $3,90 \mu\text{mol/L}$) und sinken dann kontinuierlich mit zunehmendem Lebensalter ab (siehe Abbildung 13). Es konnten keine deutlichen Schwankungen mehr ab der Altersgruppe 4 (6-11 Jahre) festgestellt werden.

Abbildung 13: Gesamt-GS atypisch bei Kindern und Jugendlichen



Mittels SPSS wurde ein Boxplot-Diagramm erstellt, welches die Verteilung der Gesamt-GS in den unterschiedlichen Altersgruppen zeigt (siehe Abbildung 14). Die Signifikanz wurde mittels t-Test bei unabhängigen Stichproben bestimmt. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) für die Mittelwerte der Altersgruppe 1 verglichen mit denen der Altersgruppe 2. Ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) ergab sich auch für die Mittelwerte der Altersgruppe 2 verglichen mit denen der Altersgruppe 3.

Abbildung 14: Gesamt-GS atypisch (Boxplot)



3.3 Profil der atypischen GS

Das GS-Profil der einzelnen atypischen GS wurde berechnet und ausgewertet. Zunächst wurden die freien GS analysiert und dann deren Konjugate. Die Verteilungen der einzelnen GS wurden grafisch mittels Boxplot dargestellt. Ausreißer wurden in den folgenden Boxplots als Sterne/Kreise gekennzeichnet. Nicht messbare Werte wurden mit n.m. in den Tabellen angegeben.

3.3.1 Alphamuricholsäure (AMCA)

Die AMCA konnte in keiner Altersgruppe nachgewiesen werden.

Tabelle 10: AMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	n.m.	n.m.	6	n.m.
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.
3-5 Jahre	n.m.	n.m.	11	n.m.
6-11 Jahre	n.m.	n.m.	10	n.m.
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

3.3.1.1 Glykoalphanuricholsäure (GAMCA)

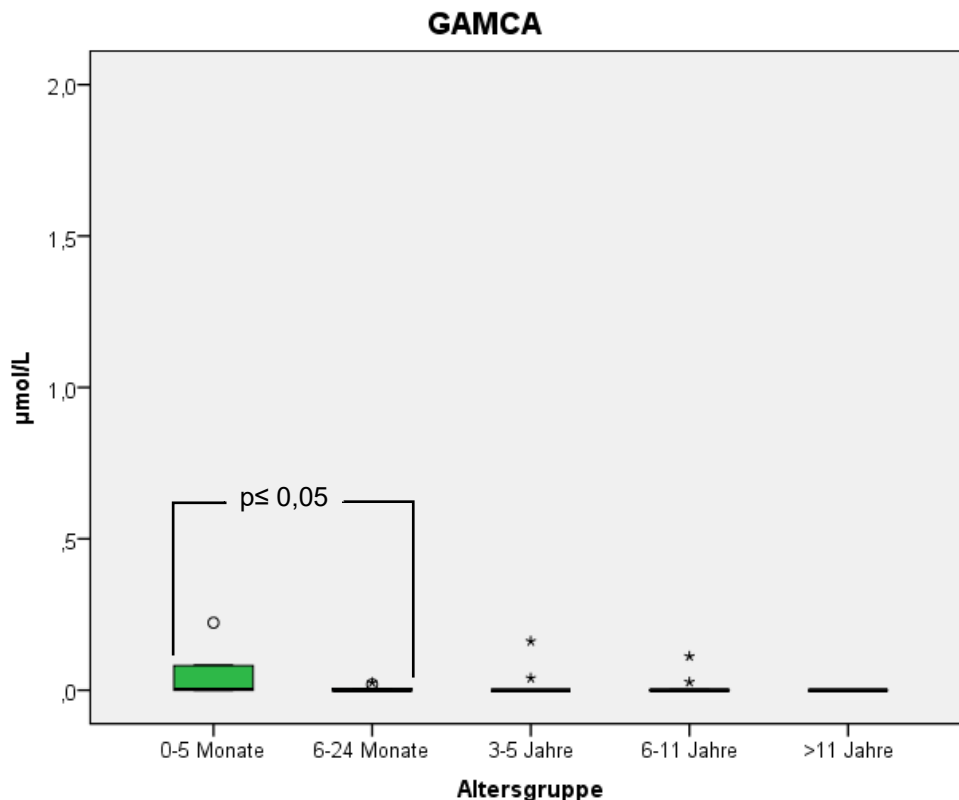
Die GAMCA war in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Nach der Geburt fanden sich die höchsten Werte. Mit zunehmendem Lebensalter sanken die Konzentrationen ab. In der 5. Altersgruppe war GAMCA schließlich nicht mehr nachweisbar.

Tabelle 11: GAMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	0,05	0,09	6	0	0,15
6-24 Monate	0,00	0,01	9	0	0,01
3-5 Jahre	0,02	0,05	11	0	0,05
6-11 Jahre	0,01	0,04	10	0	0,04
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

Abbildung 15: Boxplot GAMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.1.2 Taurogammamuricholsäure (TAMCA)

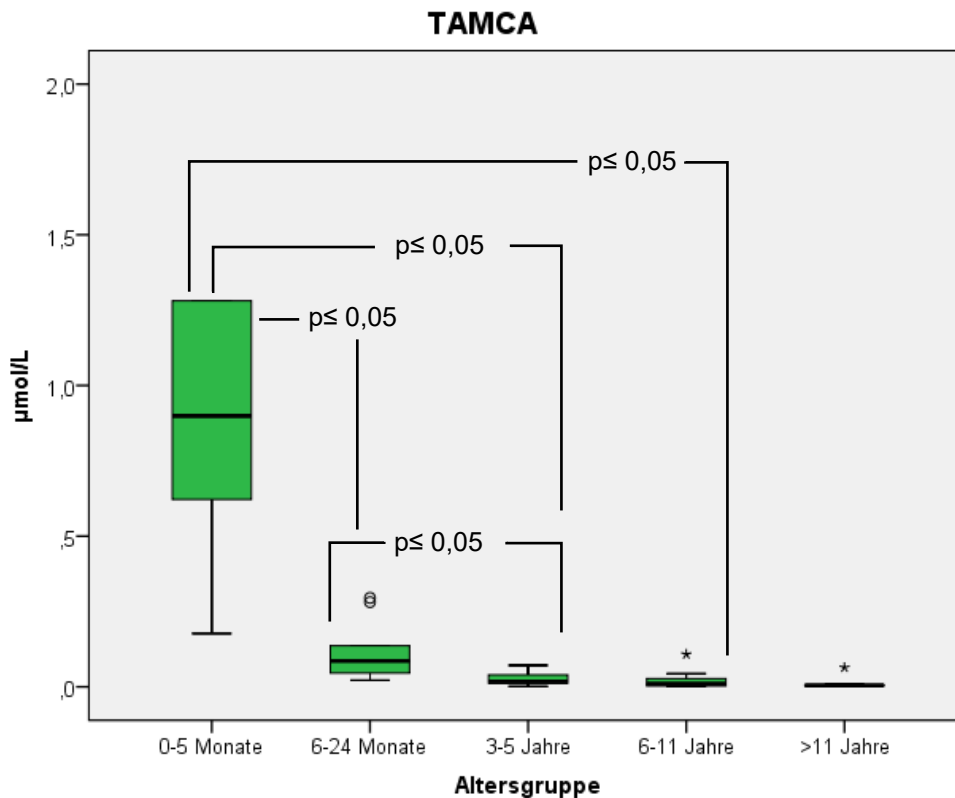
Die TAMCA war in sämtlichen Altersgruppen jene T-konjugierte GS mit den höchsten Konzentrationen. Die Werte sanken in der zweiten Altersgruppe ab. In der dritten Altersgruppe kam es erneut zu einem leichten Anstieg. Anschließend sanken die Konzentrationen kontinuierlich.

Tabelle 12: TAMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	1,11	0,90	6	0,16 – 2,05
6-24 Monate	0,12	0,10	9	0,04 – 0,20
3-5 Jahre	0,38	0,02	11	0,01 – 0,04
6-11 Jahre	0,02	0,03	10	0 – 0,04
>11 Jahre	0,01	0,02	9	0 – 0,03

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 16: Boxplot TAMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.2 Betamuricholsäure (BMCA)

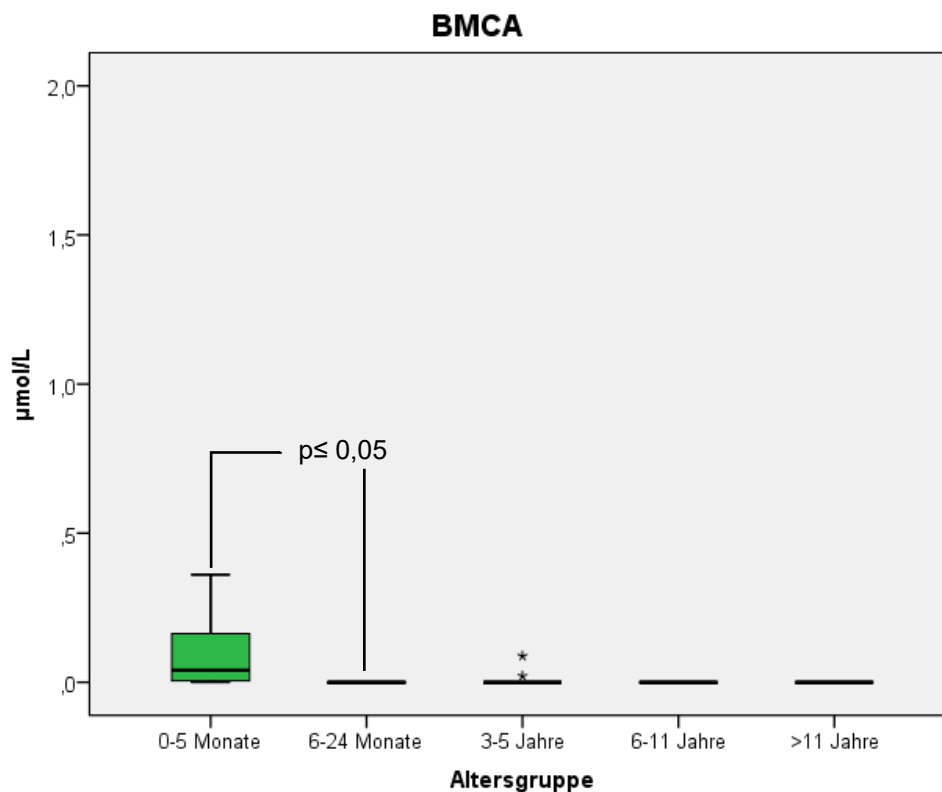
BMCA konnte hauptsächlich in der ersten Altersgruppe nachgewiesen. In der zweiten Altersgruppe war die BMCA nicht mehr messbar. Bei den 3- bis 5-jährigen lag BMCA in sehr geringen Konzentrationen vor.

Tabelle 13: BMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	0,10	0,14	6	0 – 0,25
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.
3-5 Jahre	0,01	0,03	11	0 – 0,03
6-11 Jahre	n.m.	n.m.	10	n.m.
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

Abbildung 17: Boxplot BMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.2.1 Glykobetamuricholsäure (GBMCA)

Die GBMCA konnte in keiner Altersgruppe nachgewiesen werden.

Tabelle 14: GBMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	n.m.	n.m.	6	n.m.
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.
3-5 Jahre	n.m.	n.m.	11	n.m.
6-11 Jahre	n.m.	n.m.	10	n.m.
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

3.3.2.2 Taurobetamuricholsäure (TBMCA)

Die TBMCA konnte in keiner Altersgruppe nachgewiesen werden.

Tabelle 15: TBMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	n.m.	n.m.	6	n.m.
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.
3-5 Jahre	n.m.	n.m.	11	n.m.
6-11 Jahre	n.m.	n.m.	10	n.m.
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

3.3.3 Gammamuricholsäure (GMCA)

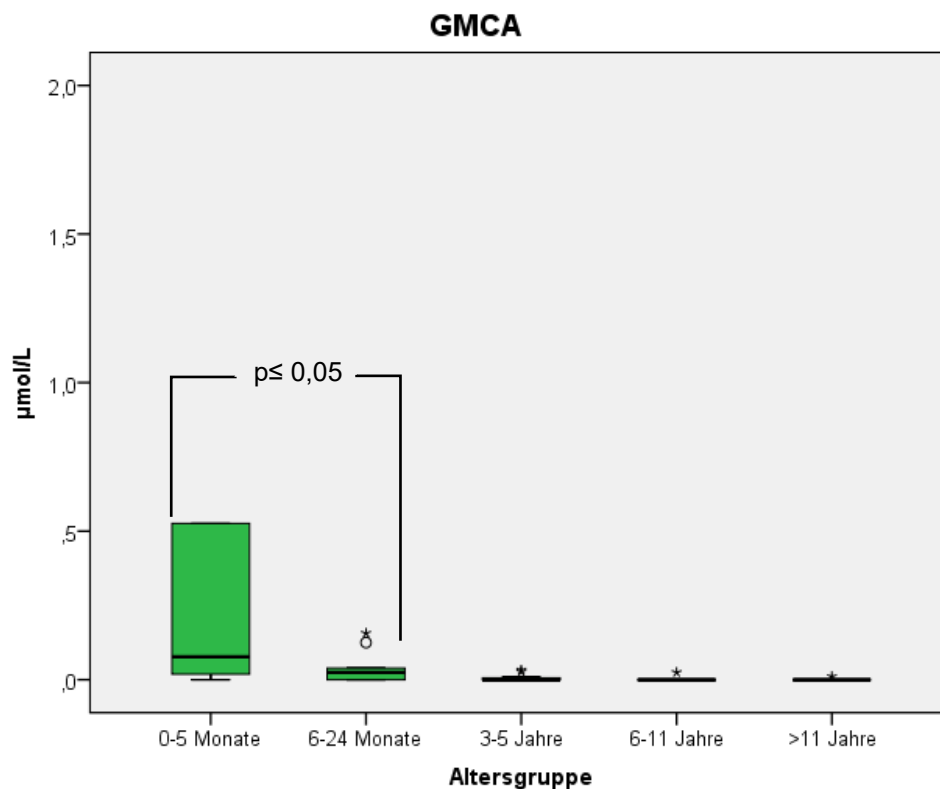
Die höchsten Konzentrationen der GMCA waren in der ersten Altersgruppe zu finden. Mit zunehmendem Alter kam es zu einem kontinuierlichen Abfall von GMCA im Serum der Kinder und Jugendlichen. In der Altersgruppe 5 waren nur noch Spuren der GMCA nachweisbar.

Tabelle 16: GMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	0,69	1,36	6	0	2,12
6-24 Monate	0,04	0,59	9	0	0,09
3-5 Jahre	0,01	0,01	11	0	0,01
6-11 Jahre	0,00	0,01	10	0	0,01
>11 Jahre	0,00	0,00	9	0	0,00

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 18: Boxplot GMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.3.1 Glykogammamuricolsäure (GGMCA)

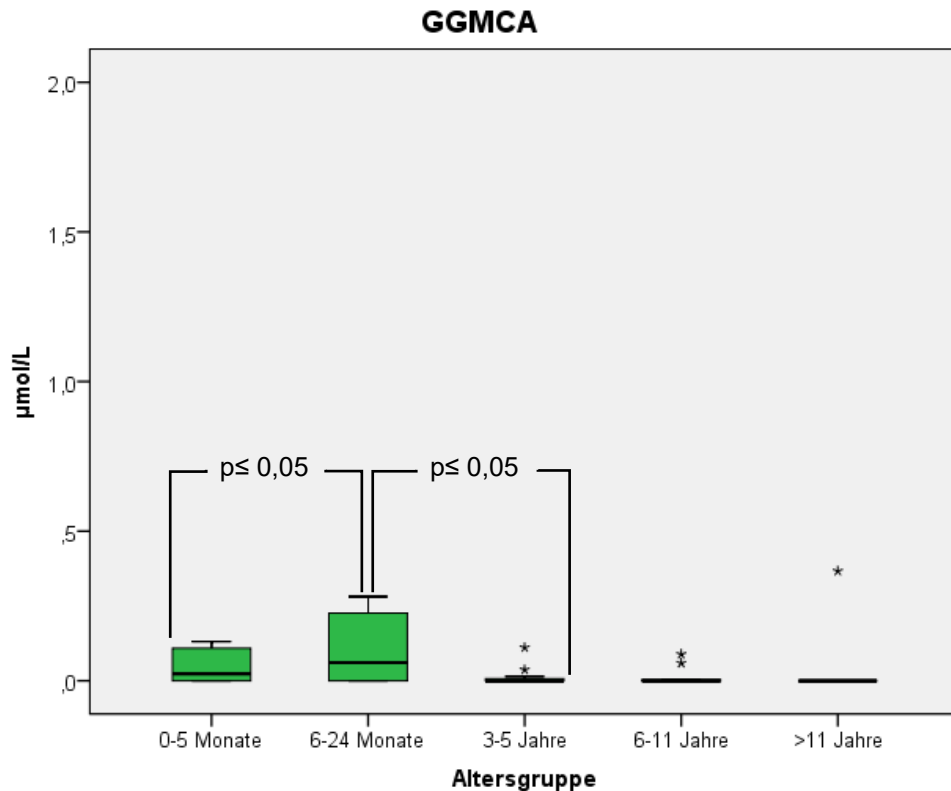
GGMCA wies in den ersten beiden Altersgruppen die höchsten Konzentrationen auf, wobei es bei den Kindern ab 6 Monaten sogar zu einem leichten Anstieg kam. Ab dem dritten Lebensjahr kam es allerdings zu einem deutlichen Abfall von GGMCA.

Tabelle 17: GGMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	0,05	0,06	6	0	0,11
6-24 Monate	0,11	0,12	9	0,02	0,21
3-5 Jahre	0,01	0,03	11	0	0,04
6-11 Jahre	0,02	0,03	10	0	0,04
>11 Jahre	0,04	0,12	9	0	0,13

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 19: Boxplot GGMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.3.2 Taurogammamuricholsäure (TGMCA)

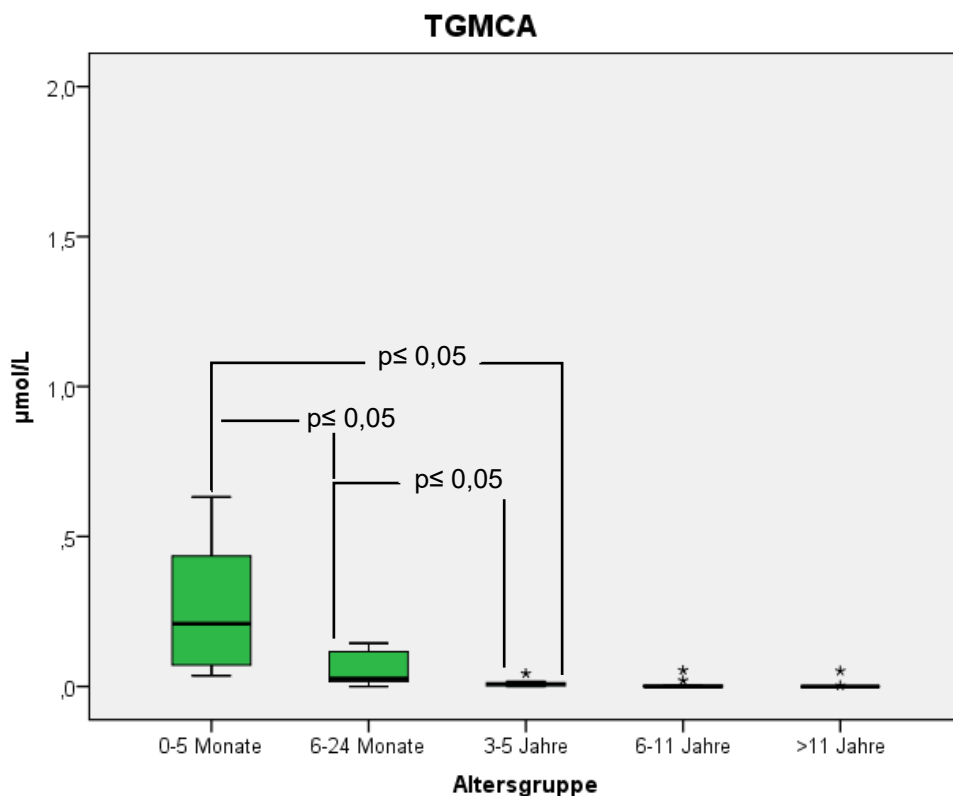
Vor allem bei den Neugeborenen zeigten sich höhere Konzentrationen von TGMCA. Ab dem sechsten Monat sank TGMCA allerdings stark ab und war anschließend in niedrigen konstanten Konzentrationen nachweisbar.

Tabelle 18: TGMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	0,27	0,23	6	0,03 – 0,50
6-24 Monate	0,05	0,06	9	0,01 – 0,10
3-5 Jahre	0,01	0,01	11	0,00 – 0,02
6-11 Jahre	0,01	0,02	10	0 – 0,02
>11 Jahre	0,01	0,02	9	0 – 0,02

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 20: Boxplot TGMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.4 Omegamuricholsäure (OMCA)

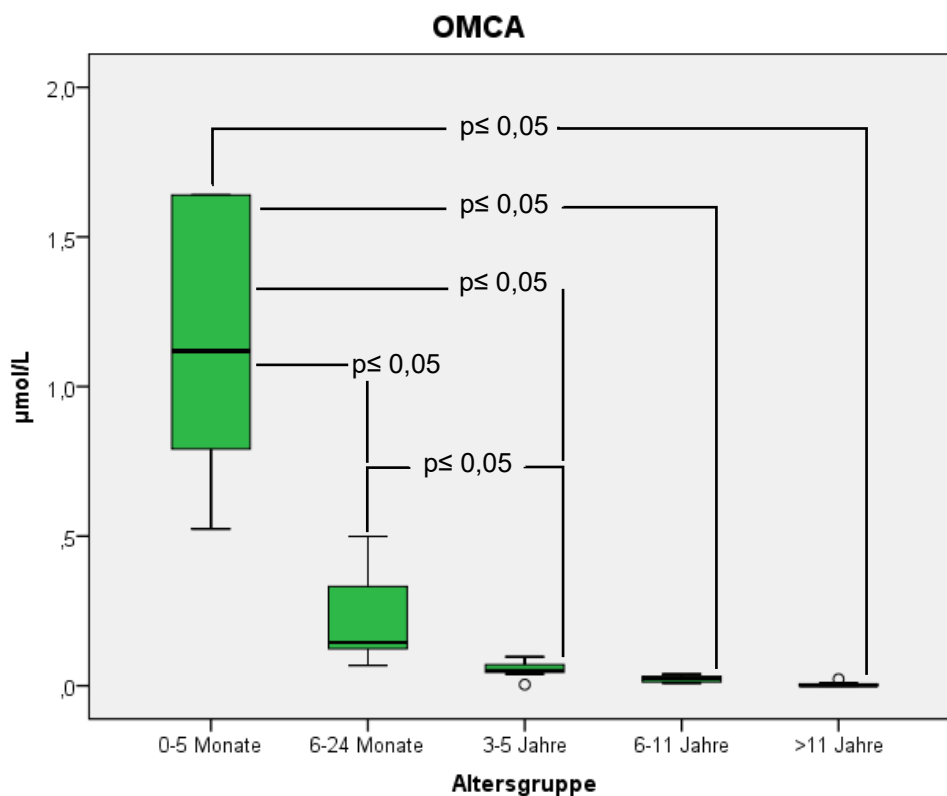
Die OMCA lag von allen unkonjugierten GS am häufigsten vor. Die höchsten Konzentrationen fanden sich bei den 0-5 Monate alten Kindern. Die Konzentration sank mit zunehmendem Lebensalter ab und war in der fünften Gruppe so gut wie nicht mehr messbar.

Tabelle 19: OMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	1,36	0,87	6	0,45	2,27
6-24 Monate	0,22	0,16	9	0,10	0,35
3-5 Jahre	0,06	0,03	11	0,04	0,07
6-11 Jahre	0,02	0,01	10	0,02	0,03
>11 Jahre	0,00	0,01	9	0	0,01

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 21: Boxplot OMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.4.1 Glykoomegamuricholsäure (GOMCA)

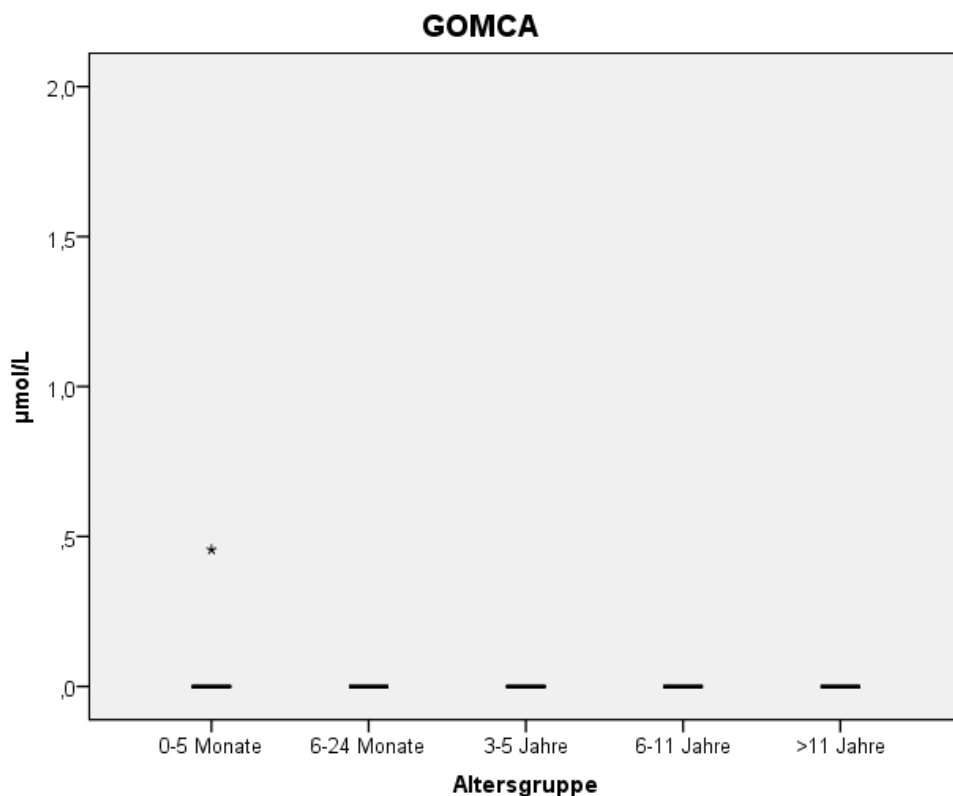
Die GOMCA war lediglich bei den Kindern zwischen 0 und 5 Monaten nachweisbar. Betrachtet man das Boxplot-Diagramm fällt auf, dass es sich lediglich um Spuren der GOMCA zu handeln scheint.

Tabelle 20: GOMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	0,08	0,19	6	0 – 0,27
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.
3-5 Jahre	n.m.	n.m.	11	n.m.
6-11 Jahre	n.m.	n.m.	10	n.m.
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

Abbildung 22: Boxplot GOMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.4.2 Tauroomegamuricholsäure (TOMCA)

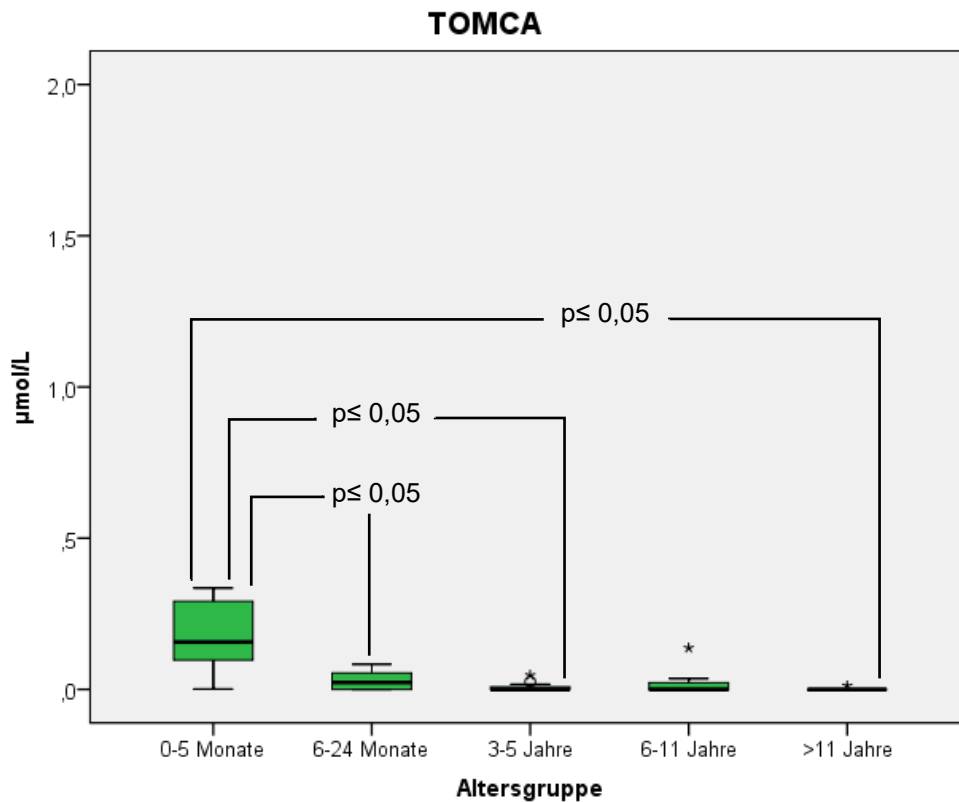
Die höchsten Konzentrationen der TOMCA waren in der ersten Altersgruppe nachweisbar. Ab sechs Monaten sank die Konzentration der TOMCA stark und ab elf Jahren war sie kaum noch nachzuweisen.

Tabelle 21: TOMCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	0,17	0,12	6	0,04	0,30
6-24 Monate	0,03	0,03	9	0,00	0,05
3-5 Jahre	0,01	0,02	11	0	0,02
6-11 Jahre	0,02	0,04	10	0	0,05
>11 Jahre	0,00	0,00	9	0	0,00

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 23: Boxplot TOMCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.5 Hyodeoxycholsäure (HDCA)

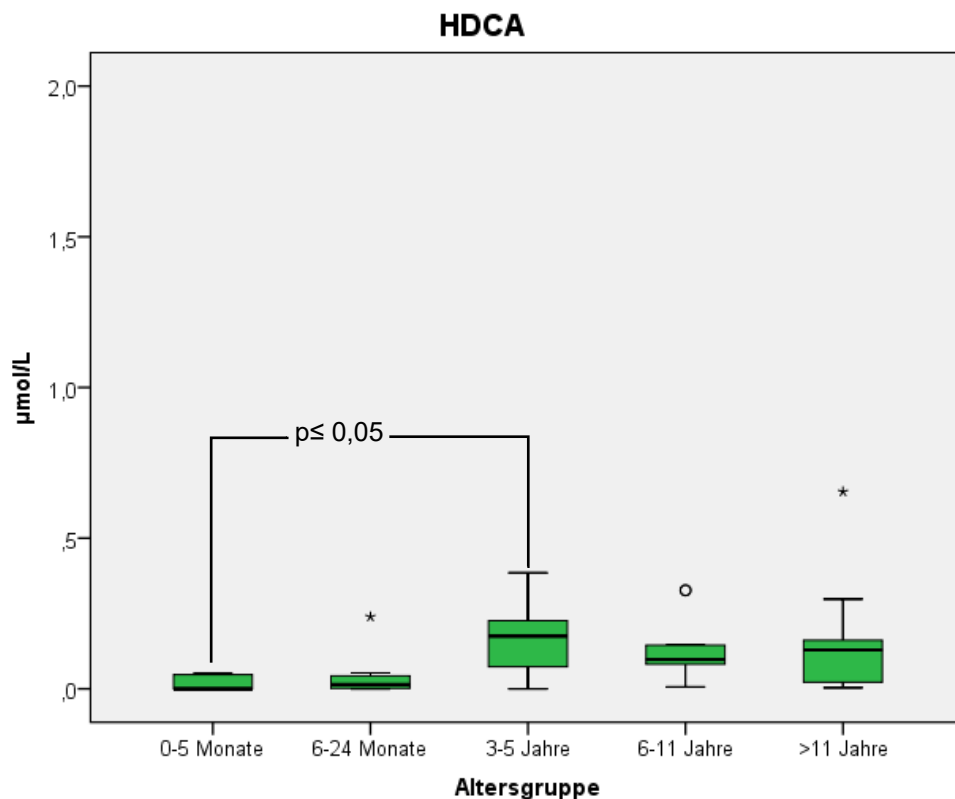
Anders als bei den anderen unkonjugierten GS, fanden sich die geringsten Konzentrationen von HDCA in der ersten Altersgruppe. Die Werte stiegen an und erreichten einen Peak im Alter zwischen 3-5 Jahre. In der 4. Altersgruppe sanken die Werte leicht, um dann in der 5. Altersgruppe erneut anzusteigen.

Tabelle 22: HDCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	0,02	0,03	6	0	0,04
6-24 Monate	0,05	0,08	9	0	0,10
3-5 Jahre	0,17	0,12	11	0,09	0,26
6-11 Jahre	0,13	0,11	10	0,05	0,21
>11 Jahre	0,16	0,21	9	0,00	0,32

Einheit: $\mu\text{mol/L}$

Abbildung 24: Boxplot HDCA in den verschiedenen Altersgruppen



3.3.5.1 Glykohyodeoxycholsäure (GHDCa)

Die GHDCa konnte in keiner Altersgruppe nachgewiesen werden.

Tabelle 23: GHDCa in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall Untergrenze - Obergrenze
0-5 Monate	n.m.	n.m.	6	n.m.
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.
3-5 Jahre	n.m.	n.m.	11	n.m.
6-11 Jahre	n.m.	n.m.	10	n.m.
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

3.3.5.2 Taurohyodeoxycholsäure (THDCA)

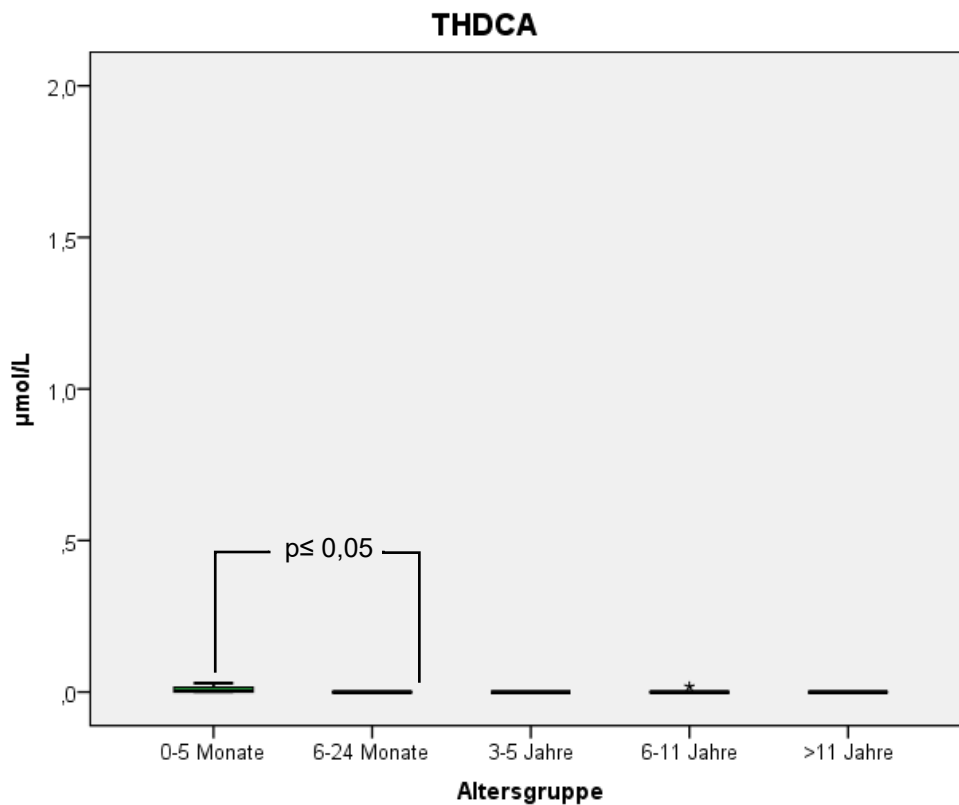
Die THDCA war in der ersten Altersgruppe nachweisbar, allerdings lagen nur sehr geringe Konzentrationen vor. In den übrigen Altersgruppen war die THDCA fast nicht messbar.

Tabelle 24: THDCA in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe	Mittelwert	Standardabweichung	n	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0-5 Monate	0,01	0,01	6	0	0,02
6-24 Monate	n.m.	n.m.	9	n.m.	
3-5 Jahre	n.m.	n.m.	11	n.m.	
6-11 Jahre	0,00	0,01	10	0	0,01
>11 Jahre	n.m.	n.m.	9	n.m.	

Einheit: $\mu\text{mol/L}$; n.m. = nicht messbare Werte

Abbildung 25: Boxplot THDCA in den verschiedenen Altersgruppen



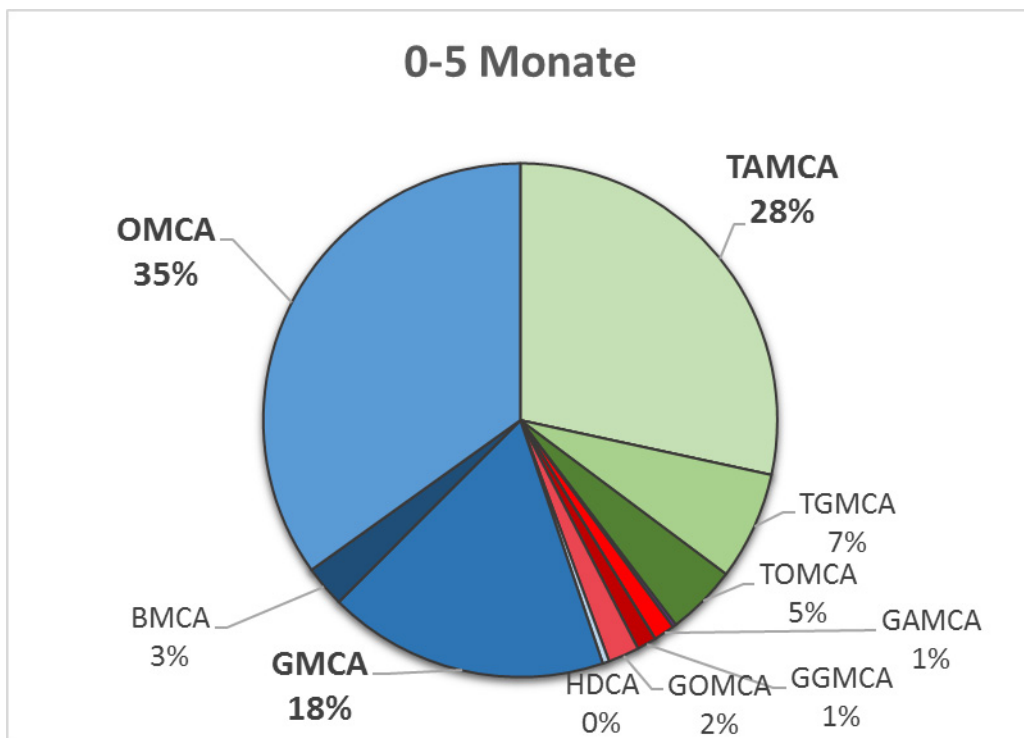
3.4 Altersabhängige Darstellung der atypischen GS

In diesem Kapitel werden alle atypischen GS innerhalb einer Altersgruppe gegenübergestellt. Die freien GS sind in den folgenden Diagrammen in Blautönen dargestellt. Die T-Konjugate sind durch Grüntöne und die G-Konjugate durch Rottöne gekennzeichnet worden. Die Prozentzahlen der dominantesten GS wurden fett hervorgehoben.

3.4.1 Altersgruppe 1: 0-5 Monate

In der Gruppe der 0-5 Monate alten Kinder kann ein Überwiegen der unkonjugierten GS festgestellt werden. Die OMCA liegt mit 35% am häufigsten vor. Die T-Konjugationen sind stärker ausgeprägt als die G-konjugierten GS. Vor allem TAMCA ist mit 28% in großem Ausmaß vorhanden.

Abbildung 26: GS-Profil in der Altersgruppe 1

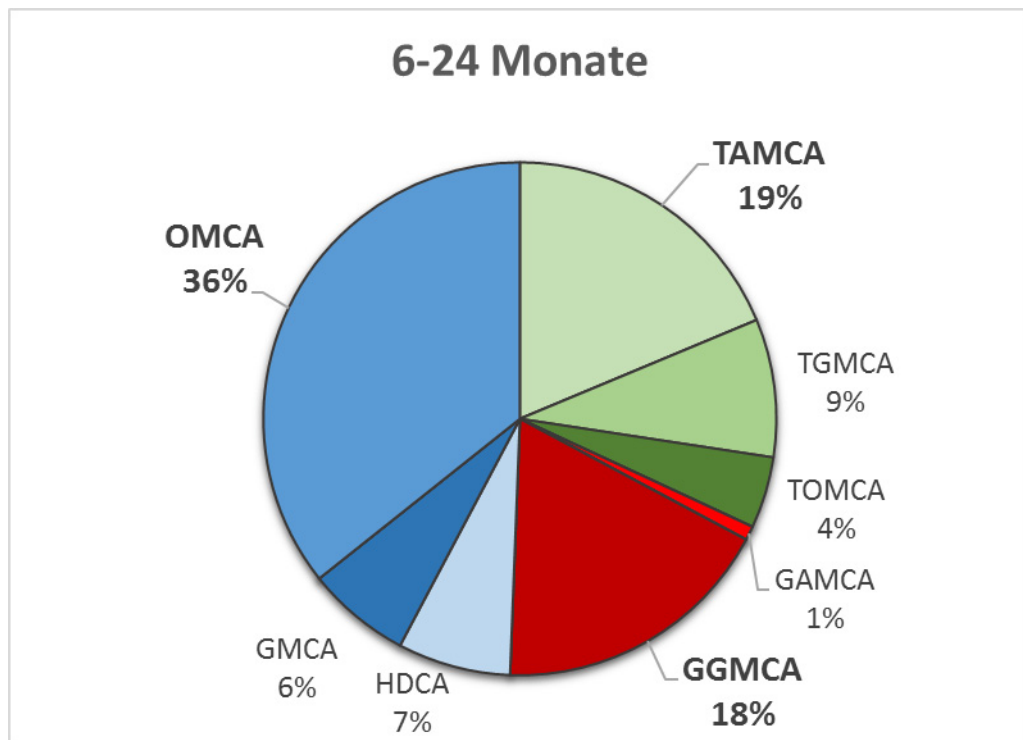


blau= freie GS; grün= T-Konjugate; rot= G-Konjugate

3.4.2 Altersgruppe 2: 6-24 Monate

In der 2. Altersgruppe (6-24 Monate) kann festgestellt werden, dass die Menge der freien GS zurückgegangen ist. Die OMCA ist mit 36% weiterhin die häufigste freie atypische GS. Die konjugierten GS insgesamt überwiegen nun leicht. Weiterhin überwiegen in dieser Altersgruppe die T-Konjugate, wobei die TAMCA noch immer die häufigste GS ist. Die GGMCA ist im Vergleich zu Altersgruppe 1 stark angestiegen (18%). HDCA steigt vom 0% auf 7% an.

Abbildung 27: GS-Profil in der Altersgruppe 2

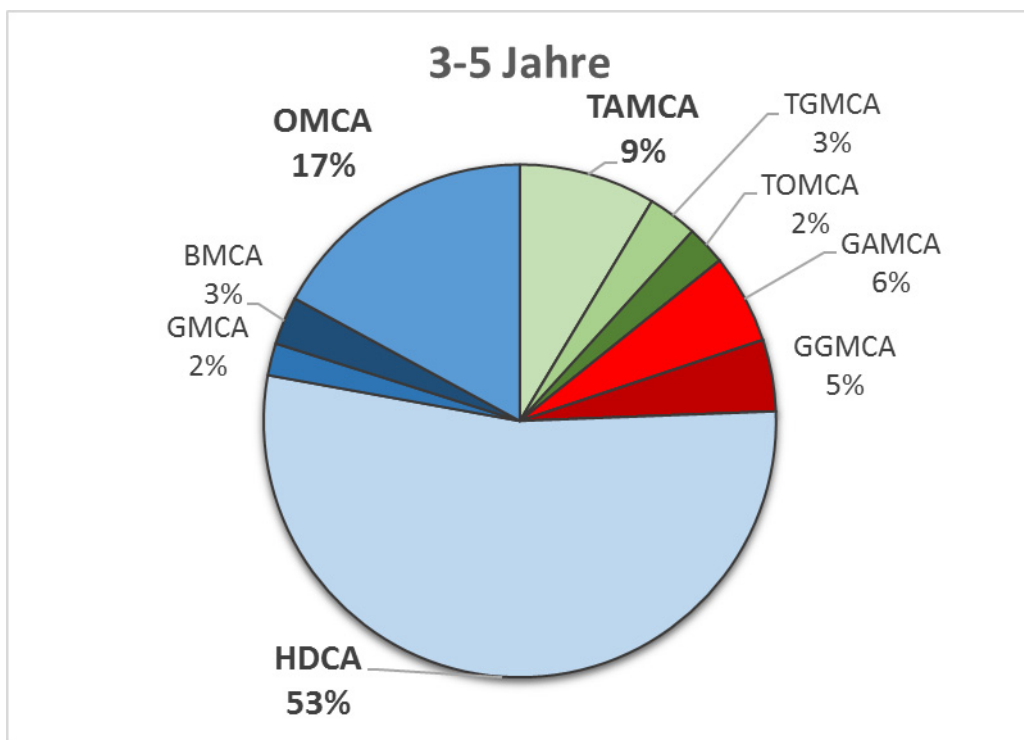


blau= freie GS; grün= T-Konjugate; rot= G-Konjugate

3.4.3 Altersgruppe 3: 3-5 Jahre

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die freien GS in Altersgruppe 3 nun wieder stark überwiegen. Die HDCA steigt weiterhin an und erreicht nun 53%, wobei die OMCA nun auf 17% absinkt. Die Menge der konjugierten GS ist stark zurückgegangen, noch immer überwiegen die T-Konjugate, obwohl die TAMCA auf 9% sinkt. Auch die Menge an GGMCA ist wieder zurückgegangen.

Abbildung 28: GS-Profil in der Altersgruppe 3

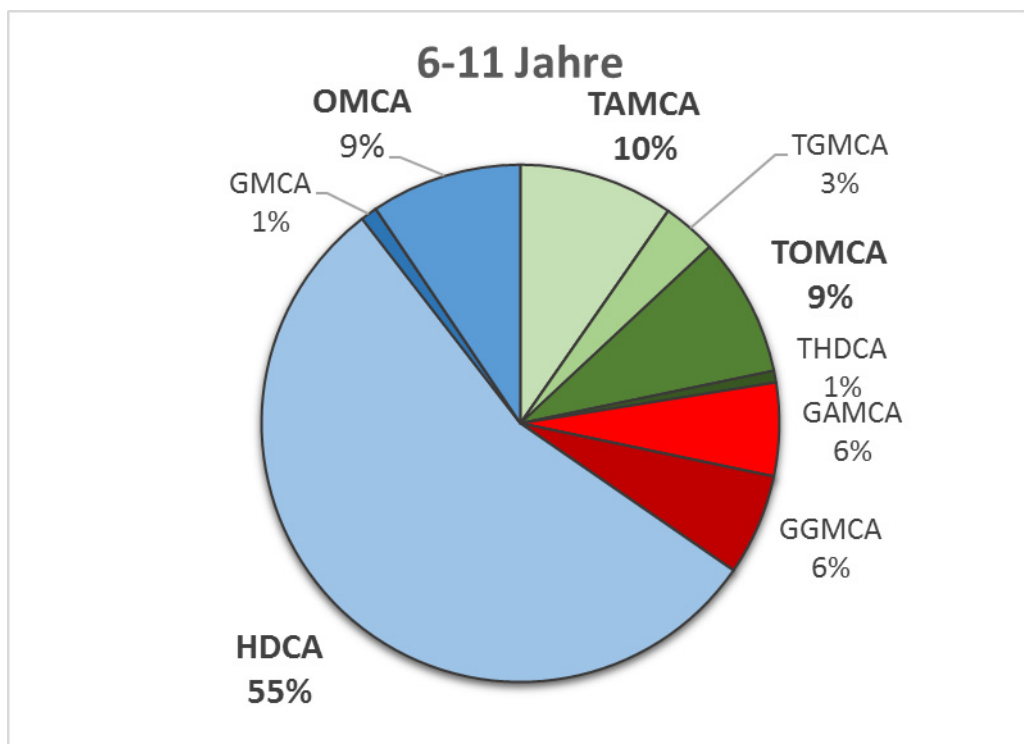


blau= freie GS; grün= T-Konjugate; rot= G-Konjugate

3.4.4 Altersgruppe 4: 6-11 Jahre

In Altersgruppe 4 überwiegen weiterhin die freien GS. Die HDCA steigt weiter an und erreicht 55%. Bei Kindern zwischen sechs und elf Jahren sinkt die OMCA weiterhin ab. Im Vergleich zu Altersgruppe 3 liegen nun wieder vermehrt konjugierte GS vor. Auch in dieser Altersgruppe überwiegen dabei die T-konjugierten GS. Die TOMCA steigt in dieser Gruppe auf 9% an.

Abbildung 29: GS-Profil in der Altersgruppe 4

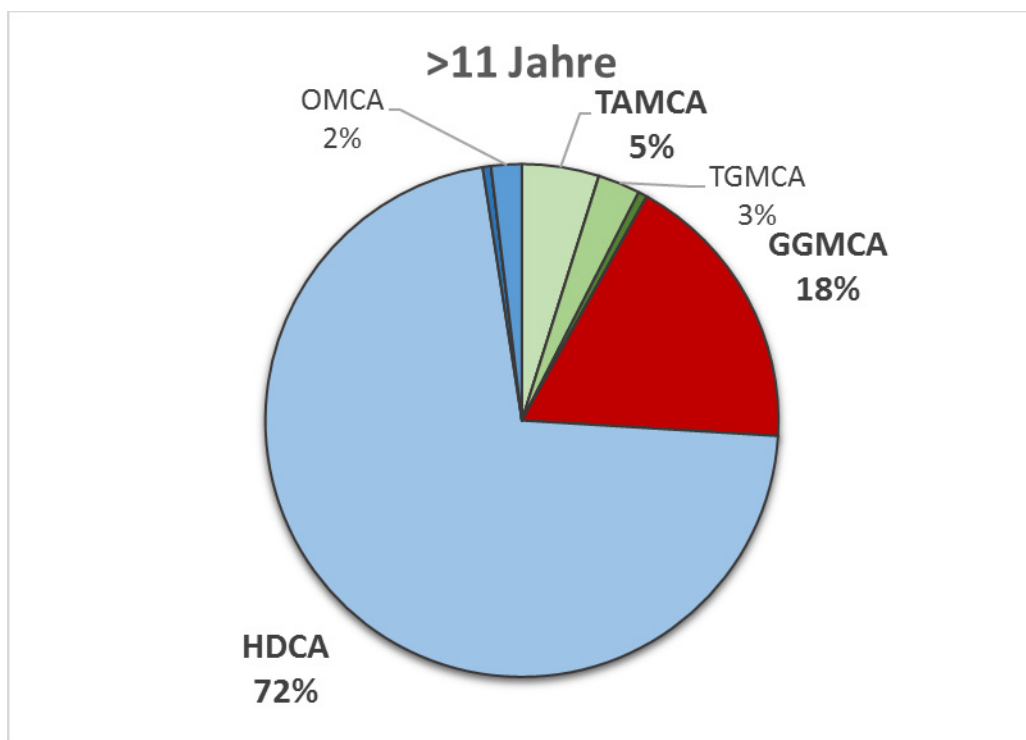


blau= freie GS; grün= T-Konjugate; rot= G-Konjugate

3.4.5 Altersgruppe 5: >11 Jahre

Die freien GS nehmen im Vergleich zu Gruppe 4 weiter zu. HDCA steigt weiter an auf 72%. Die Menge an G- und T-konjugierten GS ist wieder zurückgegangen, wobei in dieser Altersgruppe das erste Mal die G-Konjugationen in Form von GGMCA überwiegen.

Abbildung 30: GS-Profil in der Altersgruppe 5



blau= freie GS; grün= T-Konjugate; rot= G-Konjugate

3.4.6 Zusammenfassung der GS-Profile der Gruppen 1-5

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Werte atypischer GS im Serum von Neugeborenen am höchsten sind und mit zunehmendem Lebensalter abnehmen. Des Weiteren fällt anhand der GS-Profile auf, dass die OMCA bei Neugeborenen sehr ausgeprägt vorliegt. Mit steigendem Lebensalter nimmt die OMCA ab und ist schließlich bei den über 11-jährigen nur noch in geringen Konzentrationen nachweisbar. Anders verhält es sich mit der HDCA, die im Serum von Neugeborenen noch nicht nachweisbar ist. Ab Altersgruppe 3 (3-5 Jahre) macht sie jedoch den höchsten prozentualen Anteil aller atypischen GS aus. Der prozentuale Anteil nimmt bis hin zu Gruppe 5 (>11 Jahre) stetig zu.

Die T-Konjugate überwiegen im Vergleich zu den G-Konjugaten bis zur Altersgruppe 5. Erst bei den über 11-jährigen liegen vergleichsweise mehr G-konjugierte atypische GS vor.

In allen Altersgruppen ist die häufigste T-konjugierte GS die TAMCA, wobei sich die höchsten Konzentrationen in der Gruppe der Neugeborenen finden. Mit zunehmendem Lebensalter sinkt die TAMCA kontinuierlich ab.

Die GGMCA steigt von der Geburt (1%) bis zum 24. Monat (18%) an. Danach nahm der prozentuale Anteil ab. In der 5. Altersgruppe (>11 Jahre) erreichte die GGMCA einen erneuten Peak (18%).

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, Normwerte atypischer GS im Serum von Kindern und Jugendlichen zu definieren. Bisher gibt es wenig Literatur über atypische GS in der Pädiatrie. Bezogen auf GS allgemein, konnten verschiedene Studien zeigen, dass die Serumwerte von Kindern und Jugendlichen nicht mit jenen von Erwachsenen ident sind. Zu diesem Zweck definierten Jahnel *et al.* Normwerte für humane GS im Kinder- und Jugendalter (1). Außerdem konnte festgestellt werden, dass im Serum von Neugeborenen und Kindern neben den humanen GS auch atypische GS nachweisbar sind. Da GS als Biomarker für angeborene oder erworbene hepatobiliäre Erkrankungen dienen können, wäre es denkbar, dass auch in der Bestimmung atypischer GS eine klinische Relevanz besteht. Zum Nachweis atypischer GS im Serum verwendeten wir die HPLC-MS/MS. Dieses Verfahren zeichnet sich durch das geringe Probenvolumen aus, welches für die Messungen nötig ist.

Unsere Ergebnisse zeigten eine kontinuierliche Abnahme der atypischen Gesamt-GS mit zunehmendem Lebensalter der Kinder. In der Altersgruppe von 0-5 Monaten konnten folglich die höchsten Serumwerte gemessen werden (Mittelwert: 3,90 $\mu\text{mol/L}$). Dieses Resultat passt zu den Ergebnissen anderer Studien. Ushijima *et al.* konnten nachweisen, dass der Fetus während der Schwangerschaft große Mengen atypischer GS bildet. Diese werden über die Plazenta auf die Mutter übertragen und mit dem mütterlichen Harn vermehrt ausgeschieden (5). Shoda *et al.* wiesen atypische GS in Nabelschnurblut und Fruchtwasser von reifen Neugeborenen nach (4). Barbara *et al.* nehmen an, dass die erhöhten GS-Werte in den ersten Lebensmonaten durch eine persistierende fetale Stoffwechsellage begründet sind (33). All diese Ergebnisse könnten durch eine Unreife der Leber von Neugeborenen zu erklären sein. Es ist möglich, dass aufgrund dessen die GS nicht ausreichend abgebaut werden können was zu erhöhten Serumwerten führen würde. Durch ihre zusätzlichen Hydroxylierungen, könnten atypische GS aber auch dem Schutz des Neugeborenen dienen. Je hydrophober eine GS ist, desto zytotoxischer wirkt sie. Durch die Hydroxylierung wird die Polarität der GS vergrößert und infolge dessen können die GS leichter über die Nieren ausgeschieden werden (8).

Es konnte ein signifikanter Unterschied des Mittelwerts von Altersgruppe 1 (0-5 Monate) verglichen mit jenem aus Altersgruppe 2 (6-24 Monate) ermittelt werden. Auch der Mittelwert aus Altersgruppe 2 war signifikant im Vergleich zu dem Mittelwert aus Altersgruppe 3 (3-5 Jahre). Jahnelt *et al.* zeigten im Rahmen ihrer Publikation, dass die humanen GS nach der Geburt zunächst ansteigen und in der Altersgruppe von 6-24 Monaten einen Peak erreichen. Bis zum elften Lebensjahr nehmen die GS-Werte dann kontinuierlich ab (1). Addiert man allerdings zu den Werten der humanen GS die der atypischen GS, fällt auf, dass es ab dem Zeitpunkt der Geburt zu einem kontinuierlichen Absinken der Gesamt-GS mit zunehmendem Lebensalter kommt.

Die Auswertung der atypischen GS-Profile zeigte ein Überwiegen der freien, sekundären atypischen GS in allen Altersgruppen. Es fällt die hohe Konzentration von OMCA bei Neugeborenen auf, die mit zunehmendem Lebensalter absinkt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die HDCA mit zunehmendem Alter der Kinder ansteigt und ihre Höchstwerte bei Jugendlichen (>11 Jahre) aufzuweisen scheint. Die Tatsache, dass schon bei Neugeborenen hohe Konzentrationen freier, sekundärer atypischer GS vorliegen, ist verwunderlich. Studien, die sich allerdings auf humane GS beziehen, zeigten, dass vor allem bei Neugeborenen die primären konjugierten GS überwiegen (1, 33). Zu erklären ist dies durch die geringe Bakterienbesiedlung im Darm, die sich erst innerhalb des ersten Lebensjahres entwickelt (8). Das Überwiegen der freien, sekundären atypischen GS könnte durch eine andere Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Neugeborenen zu erklären sein. Weitere Untersuchungen diesbezüglich wären interessant.

Vor allem in der 1. Altersgruppe (0-5 Monate) konnten im Vergleich mehr T- als G-Konjugationen nachgewiesen werden. Beim Erwachsenen überwiegt jedoch physiologisch die Konjugate mit G. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf die Ernährung der Neugeborenen zurück zu führen, da sowohl in Muttermilch als auch in Formulanahrung T enthalten ist. T-konjugierte GS fördern die Bildung von Mizellen, was für die Fettresorption essentiell ist und somit auch für eine optimale Versorgung mit Nährstoffen (34). In Bezug auf die humanen GS nehmen die T-Konjugate bereits ab Altersgruppe 2 (6-24 Monate) stark ab und sind auch in

höheren Altersgruppen rückläufig. Im Gegensatz dazu nehmen die G-Konjugationen zu und überwiegen schon bei den 6-24-Monatigen (1). Zu erklären ist dieser Umstand durch die Umstellung der Kinder von Muttermilch/Formulanahrung auf Vollkost. Bei atypischen GS scheint dieser Umstand allerdings nicht gegeben zu sein, bzw. schleicher zu verlaufen. Die Menge an G-Konjugationen nimmt zwar mit steigendem Lebensalter zu, allerdings überwiegen erst bei Kindern über 11 Jahre die G-Konjugationen im Vergleich zu den T-konjugierten GS.

Am Ende gilt es noch zu betonen, dass die Datenerhebung in dieser Altersgruppe allgemein schwierig ist. Daher gibt es bisher auch wenig Literatur zum Thema GS in der Pädiatrie. Ein wichtiger Punkt ist die ethische Frage einer Blutabnahme bei Neugeborenen, Kindern und Jugendlichen. In dieser Studie wurde nur Restblut verwendet, welches ansonsten verworfen worden wäre. Außerdem ist die Gewinnung von Probenmaterial erschwert, da bei Kindern und Jugendlichen keine Blutabnahme zu Screening- oder Vorsorgezwecken erfolgt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass für eine Definition von Normwerten stoffwechselgesunde Kinder, d.h. ohne Beeinträchtigung des enterohepatischen Kreislaufs, benötigt werden. Des Weiteren sind alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede bei Kindern und Jugendlichen durch die physiologische Entwicklung von größerer Relevanz als bei Erwachsenen.

Zusammenfassend konnten Normwerte der atypischen GS im Serum von Kindern und Jugendlichen definiert werden. In Zukunft könnten sie als Biomarker sowohl nützlich für die Diagnose als auch für die Prognose von hepatischen, hepatobiliären und intestinalen Erkrankungen sein. Des Weiteren konnte eine Grundlage für weiterführende Arbeiten geschaffen werden.

Projektplan

- **August 2014:** Kontaktaufnahme mit OA Dr. Jahnel, erstes Treffen mit OA Dr. Jahnel zur Vorstellung des Projektes „Gallensäuren in der Pädiatrie“ im weitesten Sinne
- **Oktober bis Dezember 2014:** erstes Treffen mit Mag. Zöhrer, Mitverfolgung der Arbeitsschritte, die im Rahmen von Heidrun Hargassners Diplomarbeit getätigt wurden, v wie beispielsweise Erstellung eines Konzeptformulars, Aufbereitung der gesammelten Daten und deren statistischer Auswertung
- **Juli 2015:** erneute Kontaktaufnahme mit OA Dr. Jahnel und Mag. Zöhrer zur Findung eines geeigneten Diplomarbeitsthemas
- **September 2015:** Übermittlung einführender Literatur von Mag. Zöhrer und Bearbeitung dieser
- **Oktober 2015:** Definition der Fragestellung, Übermittlung der bereits vorhandenen Daten in Form von Microsoft Excel Tabellen durch Mag. Zöhrer
- **November 2015:** Beginn der Ausarbeitung theoretischer Themen der Arbeit
- **Dezember 2015:** Auswertung der Daten mittels Microsoft Excel 2010 und Erstellen von Tabellen und Grafiken, Rücksprache mit Mag. Zöhrer in Bezug auf die Ergebnisse, weitere Ausarbeitung theoretischer Themen, Besuch des Labors und Vorbereitung der Proben zur anschließenden Messung unter Anleitung von Mag. Zöhrer
- **April 2016:** Auswertung der Daten mittels SPSS, berechnen des 95%-Konfidenzintervalls, hinzuziehen des t-Tests zur Bestimmung der Signifikanz der Werte, Erstellen von Boxplots
- **07.06.2016:** Präsentation der Ergebnisse
- **Mai bis Juni 2016:** Fehlerkorrektur und Fertigstellung der Arbeit

Literaturverzeichnis

1. Jahnel J, Zöhrer E, Scharnagl H, Erwa W, Fauler G, Stojakovic T. Reference ranges of serum bile acids in children and adolescents. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015.
2. Haslewood G. Comparative studies of bile salts'. 9. The isolation and chemistry of hyocholic acid. *Biochemical Journal*. 1956;62(4):637.
3. Back P. Developmental pattern bile acid metabolism. *Gastroenterology*. 1980;78(6):1651-2.
4. Shoda J, Mahara R, Osuga T, Tohma M, Ohnishi S, Miyazaki H, et al. Similarity of unusual bile acids in human umbilical cord blood and amniotic fluid from newborns and in sera and urine from adult patients with cholestatic liver diseases. *Journal of lipid research*. 1988;29(7):847-58.
5. Seki Y, Matsushita M, Kimura A, Nishiura H, Aoki K, Inokuchi T, et al. Maternal and fetal circulation of unusual bile acids: A pilot study. *Pediatrics International*. 2011;53(6):1028-33.
6. Batta AK, Arora R, Salen G, Tint GS, Eskreis D, Katz S. Characterization of serum and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: effect of ursodeoxycholic acid treatment. *Journal of Lipid research*. 1989;30(12):1953-62.
7. Horn F. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*: Georg Thieme Verlag; 2009.
8. Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of internal medicine*. 1999;159(22):2647-58.
9. Rodeck B, Zimmer K-P. *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*: Springer; 2013.
10. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(8):678-93.
11. Adam B. *Gastroenterologie: das Referenzwerk für Klinik und Praxis*: Georg Thieme Verlag; 2007.
12. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R. *Duale Reihe Physiologie*: Georg Thieme Verlag; 2012.

13. Siegenthaler W, Blum HE. Klinische pathophysiologie: Georg Thieme Verlag; 2013.
14. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(4):213-24.
15. Monga SP, Cagle PT. *Molecular pathology of liver diseases*: Springer Science & Business Media; 2010.
16. Davis RA, Attie AD. Deletion of the ileal basolateral bile acid transporter identifies the cellular sentinels that regulate the bile acid pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(13):4965-6.
17. Bergell N, Chwala N, Dittmer N, Freytag N, Gäbler N, Gerhardt N, et al. *Seifen und seifenartige Stoffe*: Springer-Verlag; 2013.
18. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. *Pathologie*: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
19. Baldeón ME, Mennella JA, Flores N, Fornasini M, San Gabriel A. Free amino acid content in breast milk of adolescent and adult mothers in Ecuador. *SpringerPlus*. 2014;3(1):104.
20. Deutsch J. Embryologie und Physiologie der Leber. *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. 2013:375.
21. Back P, Walter K. Retrodifferenzierung des Gallensäurenstoffwechsels bei Cholestase. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin*: Springer; 1980. p. 793-5.
22. Norman A, Sjövall J. On the Transformation and Enterohepatic Circulation of Cholic Acid in the Rat BILE ACIDS AND STEROIDS 68. *Journal of Biological Chemistry*. 1958;233(4):872-85.
23. Hsia S. Hyocholic acid and muricholic acids. *The Bile Acids Chemistry, Physiology, and Metabolism*: Springer; 1971. p. 95-120.
24. Hsia S, Elliott WH, Matschiner JT, Doisy E, Thayer SA, Doisy EA. Bile Acids XIII. FURTHER CONTRIBUTIONS TO THE CONSTITUTION OF MURICHOLIC ACIDS. *Journal of Biological Chemistry*. 1960;235(7):1963-7.
25. Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap [mdash] bile acids in metabolic control. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014;10(8):488-98.
26. Lentze MJ, Schaub J, Schulte F-J, Spranger J. *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*: Springer-Verlag; 2013.

27. Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE. Einführung in die Chromatographie: Springer-Verlag; 2013.
28. Lutzenberger K. Künstlerfarben im Wandel: synthetische organische Pigmente des 20. Jahrhunderts und Möglichkeiten ihrer zerstörungsarmen, analytischen Identifizierung: Herbert Utz Verlag; 2009.
29. Roda A, Gioacchini AM, Cerrè C, Baraldini M. High-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of bile acids in biological fluids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995;665(2):281-94.
30. Gross JH. Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch: Springer-Verlag; 2012.
31. Kazakevich YV, Lobrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists: John Wiley & Sons; 2007.
32. Ahuja S, Rasmussen H. HPLC method development for pharmaceuticals: Academic Press; 2011.
33. Barbara L, Lazzari R, Roda A, Aldini R, Festi D, Sama C, et al. Serum bile acids in newborns and children. *Pediatr Res*. 1980;14(11):1222-5.
34. Chesney RW, Helms RA, Christensen M, Budreau AM, Han X, Sturman JA. The role of taurine in infant nutrition. *Taurine 3*: Springer; 1998. p. 463-76.

