

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
UNIV.- PROF. DR. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***Evaluation der massenspektrometrischen Analyse von
Serumgallensäuren in der Differentialdiagnostik
(cholestatischer) Lebererkrankungen
im Kindes- und Jugendalter und zum
therapeutischen Drug Monitoring
der Behandlung mit Ursodeoxycholsäure***

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
STEFANIE-KLARA KEIL

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN
UNIV.- PROF. DR. MICHAEL MELTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***Evaluation der massenspektrometrischen Analyse von
Serumgallensäuren in der Differentialdiagnostik
(cholestatischer) Lebererkrankungen
im Kindes- und Jugendalter und zum
therapeutischen Drug Monitoring
der Behandlung mit Ursodeoxycholsäure***

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
STEFANIE-KLARA KEIL

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Melter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. André Gessner

Mitbetreuung durch: Jan Vermehren

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2018

Erklärung

Ich bestätige, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel:

*Evaluation der massenspektrometrischen Analyse von Serumgallensäuren
in der Differentialdiagnostik (cholestatischer) Lebererkrankungen
im Kindes- und Jugendalter und zum therapeutischen
Drug Monitoring der Behandlung mit Ursodeoxycholsäure*

ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Name und Vorname

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	V
Inhaltsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Gallensäuren	2
1.1.1 Chemische Eigenschaften und Synthese der Gallensäuren.....	2
1.1.2 Metabolismus der Gallensäuren	6
1.1.3 Physiologische Funktionen von Gallensäuren	10
1.1.4 Pathologische Wirkungen von Gallensäuren	10
1.1.5 Regulationsmechanismen bei Cholestase.....	11
1.1.6 Therapeutische Wirkung der Ursodeoxycholsäure	12
1.2 Hepatobiliäre Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter.....	14
1.2.1 Cholestatische Erkrankungen.....	15
1.2.2 Entzündliche Lebererkrankungen	19
1.2.3 Hepatische Stoffwechselerkrankungen	21
1.2.4 Vaskuläre Malformationen der Leber.....	24
2 Fragestellungen der Arbeit	25
3 Methodik und Patientenkollektiv.....	26
3.1 Analytische Methode	26
3.2 Studiendesign	26
3.2.1 Einschlusskriterien.....	26
3.2.2 Ausschlusskriterien.....	27
3.2.3 Datenerfassung	27

3.2.4	Zielparameter	27
3.2.5	Diagnosestellung	28
3.2.6	Gruppeneinteilung	29
3.2.7	Verzerrende Störgrößen	30
3.3	Statistische Methoden	31
3.4	Darstellung der Gallensäuren	35
3.5	Analyse des Gallensäure-Profiles	37
3.6	Ethische Belange	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Basisdaten der Studienpopulation	38
4.1.1	Geschlechterverteilung der Patienten	38
4.1.2	Altersverteilung der Patienten	39
4.1.3	Häufigkeitsverteilung der Diagnosen	40
4.2	Gallensäure-Profil der Kontrollgruppe	43
4.3	Gallensäure-Profil bei cholestatischen Erkrankungen	46
4.3.1	Besonderheiten bei den cholestatischen Erkrankungen	53
4.3.2	Beziehung zwischen Cholestase-Parametern und Gallensäuren	55
4.4	Gallensäure-Profil bei hepatischen Stoffwechselerkrankungen	57
4.4.1	Zystische Fibrose	57
4.4.2	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung	63
4.5	Gallensäure-Profil bei entzündlichen Erkrankungen der Leber	64
4.6	Gallensäure-Profil bei vaskulären Malformationen der Leber	66
4.7	Einfluss der Nüchternheit auf das Gallensäure-Profil	67

4.8	Veränderungen im Gallensäure-Profil unter der Therapie mit Ursodeoxycholsäure.....	68
5	Diskussion	74
5.1	Gallensäure-Profil bei cholestatischen Erkrankungen	74
5.2	Gallensäure-Profil bei Stoffwechselerkrankungen der Leber	77
5.2.1	Zystische Fibrose	77
5.2.2	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung	79
5.2.3	Weitere Stoffwechselerkrankungen der Leber: α 1-AT-Mangel, Morbus Meulengracht, Morbus Wilson, Glykogenose, Mitochondriopathie....	80
5.3	Gallensäure-Profil bei entzündlichen Lebererkrankungen	81
5.4	Gallensäure-Profil bei vaskulären Malformationen der Leber	82
5.5	Einfluss der Nüchternheit auf das Gallensäure-Profil	83
5.6	Gallensäure-Profil unter der Therapie mit Ursodeoxycholsäure	83
5.7	Einschränkungen der Auswertung und Ausblick.....	86
6	Zusammenfassung.....	87
	Abbildungsverzeichnis.....	90
	Tabellenverzeichnis.....	92
	Literaturverzeichnis	93
	Abkürzungsverzeichnis	102
	Danksagung	105
	Anhang	106
	A Patienteninformationen mit Einwilligungserklärungen für die Eltern und pädiatrischen Patienten	107

B	Fragebogen für die ambulante Vorstellung bzw. während des stationären Aufenthaltes.....	111
C	Z-Score für den Parameter Body Mass Index (BMI)	112
D	Sekundäre Leberhautzeichen und Pruritus.....	112
E	GS-Profil bei cholangiodysplastischen Erkrankungen	115
G	GS-Profil bei hepatischen Stoffwechselerkrankungen	116

1 Einleitung

Die Cholestase stellt ein wichtiges Leitsymptom für eine Reihe von chronischen Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar und geht mit einer Retention gallepflichtiger Substanzen wie z. B. den Gallensäuren (GS) einher. Diesem Rückstau mit einer Akkumulation von Gallensäuren liegen unterschiedliche Ursachen zugrunde. Zum einen kann die Cholestase durch Obstruktionen des hepatobiliären Gallengangsystems hervorgerufen werden, zum anderen werden auch Defekte im Gallensäuretransportsystem auf hepatozellulärer Ebene für eine Cholestase verantwortlich gemacht. Als weitere ursächliche Faktoren einer Blut-GS-Erhöhung sind neben autoimmun und viral bedingten entzündlichen Lebererkrankungen auch hepatische Stoffwechselerkrankungen wie die cystische Fibrose in Betracht zu ziehen.

Die unterschiedlichen Pathomechanismen der chronischen hepatobiliären Erkrankungen beeinflussen sowohl die Synthese und Konjugation der Gallensäuren, als auch deren Transport im enterohepatischen Kreislauf, einschließlich ihrer Sekretion und Absorption, was mutmaßlich zu krankheitscharakteristischen quantitativen und qualitativen Veränderungen in der Zusammensetzung des Gallensäure-Pools (GS-Pools) führen könnte. Somit dürfte die initiale Bestimmung und Differenzierung der Gallensäuren einen wichtigen Beitrag zur differentialdiagnostischen Abgrenzung und zur Abschätzung der Schwere der zugrunde liegenden Erkrankung leisten. Um gezielte therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können, ist eine zeitnahe Diagnosestellung für den weiteren Verlauf und die Prognose einer hepatobiliären Erkrankung von entscheidender Bedeutung.

Die in der Routinediagnostik durchgeführte Bestimmung der Gesamtkonzentration der GS lässt keine Differenzierung der einzelnen Gallensäurespezies zu. Durch die Umstellung der enzymatischen Gallensäureanalytik auf eine massenspektrometrische Methode ergibt sich nun die Möglichkeit, neben der bisher üblichen Erfassung der Gesamtkonzentration der GS, sowohl endogene Gallensäuremetaboliten als auch die therapeutisch zugeführte Ursodeoxycholsäure (UDCA) quantitativ zu erfassen. Die Frage, ob charakteristische Gallensäure-

Profilmuster verschiedene hepatobiliäre Erkrankungen zu differenzieren vermögen, ist bisher nicht geklärt.

1.1 Gallensäuren

Die Zusammensetzung der Galle und deren Funktion im Verdauungsprozess faszinierte schon früh bedeutende Wissenschaftler.

*„Ich weiss, dass die Galle ein nothwendig Glied des Lebens,
ein Balsam des Bluts und der Leber ist.“*

Johann B. van Helmont (1683)

Dem deutschen Chemiker Heinrich Otto Wieland (*1877-†1957) ist die Strukturaufklärung der Gallensäuren zu verdanken (Wieland et al. 2008).

Darauf bauen zahlreiche Erläuterungen zu den chemischen Eigenschaften und zur Synthese der Gallensäuren (Russell 2009) auf, welche im folgenden Kapitel beschrieben werden.

1.1.1 Chemische Eigenschaften und Synthese der Gallensäuren

Die chemische Struktur einer Gallensäure setzt sich aus hydrophoben (Steroidkern und Methylgruppen) und hydrophilen Anteilen (Aminosäuren, Hydroxyl- und Carboxylgruppen) zusammen. Die Position und die Anzahl der Hydroxylgruppen, deren Anordnung zum Steroidkern und die Konjugation mit den Aminosäuren Glycin und Taurin bestimmen die Hydrophobizität der GS und begründen ihre physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften (Thomas et al. 2008). Die Orientierung der Hydroxylgruppe kann in einer α - oder β - Positionierung zum Steroidkern erfolgen. Eine GS, die sowohl eine OH-Gruppe oberhalb (β) als auch unterhalb (α) zur Molekülebene ausgerichtet hat, gewinnt an Hydrophilie und zeigt weniger membranschädigende Wirkungen auf Lipidmembranen (Schölmerich et al. 1984) (siehe Abbildung 1).

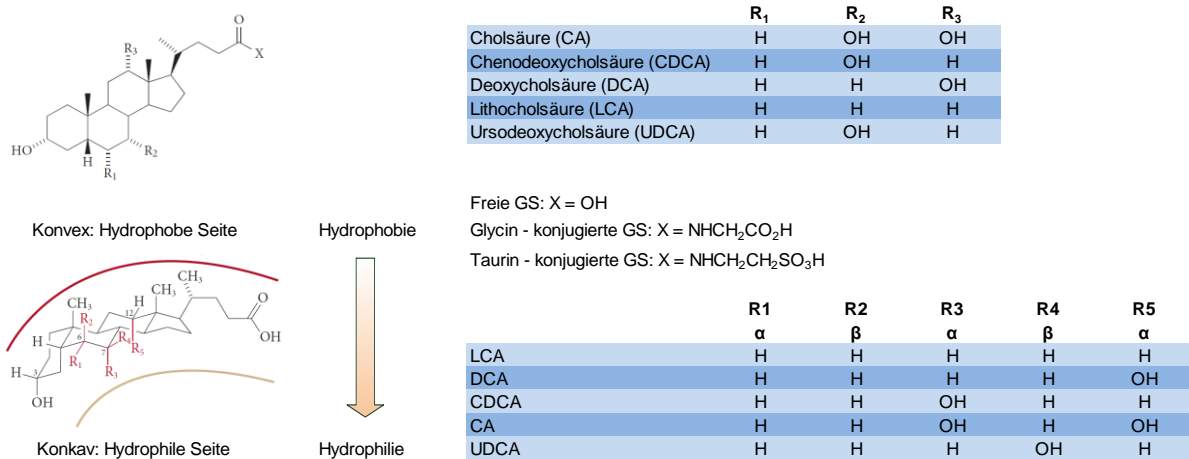


Abbildung 1: Darstellung der Molekülstruktur der GS, modifiziert nach (Thomas et al. 2008). Die Anzahl der Hydroxylgruppen bestimmt die Gallensäure-Spezies. Die Konjugation kann mit den Aminosäuren Glycin oder Taurin erfolgen. Eine Hydroxylgruppe in α -Positionierung ist unterhalb des Steroidkerns angeordnet, die β -Positionierung beinhaltet eine äquatoriale Stellung zum Steroidkern und erhöht die Hydrophilie. Ursodeoxycholsäure ist aufgrund einer Hydroxylgruppe in β -Positionierung hydrophiler im Vergleich zu den anderen Gallensäuren.

Die Molekülstruktur der einzelnen Gallensäuren wird durch die jeweiligen Syntheseschritte bestimmt. Zwei Wege der Synthese, der klassische und der alternative, werden in der Literatur genannt (Russell 2003). Die dafür erforderlichen enzymatischen Syntheseabläufe und deren Regulationsmechanismen können in Abbildung 2 schematisch nachvollzogen werden. An dieser Stelle der Arbeit werden nur die wesentlichen Vorgänge und die daran beteiligten Enzyme aufgeführt.

Die Biosynthese der Gallensäuren in der Leber dient der Umwandlung des unlöslichen hydrophoben Cholesterins zu einem löslichen amphipathischen Molekül, wodurch die Emulgierung wasserunlöslicher Verbindungen in Form von gemischten Mizellen ermöglicht wird. Die Synthese beinhaltet im Wesentlichen die Hydroxylierung der 7α -Position, die Modifikation der Sterol-Ringstruktur, die Oxidation und Verkürzung der Seitenkette sowie die Konjugation mit einer Aminosäure (Russell 2003).

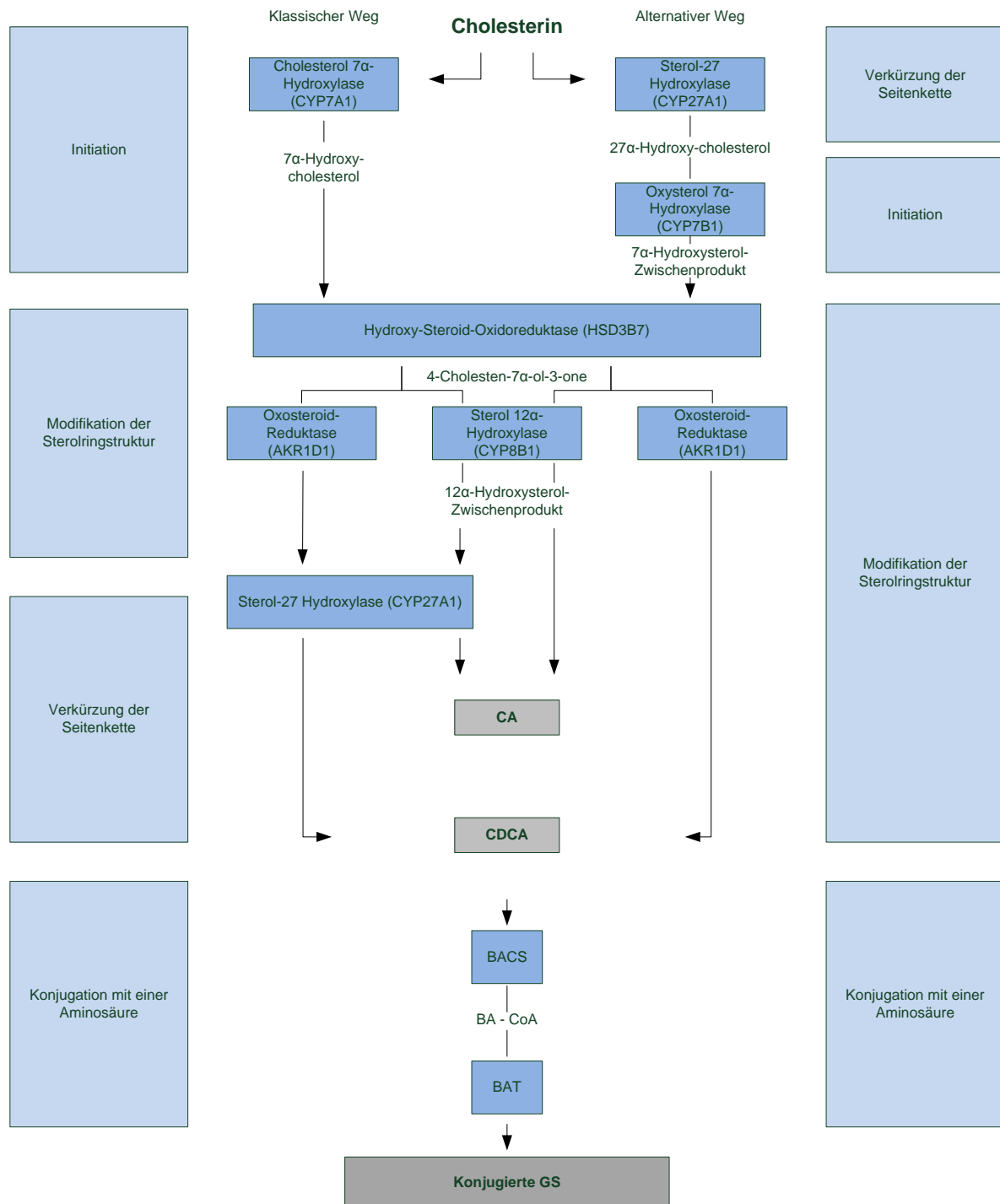


Abbildung 2: Synthese der Gallensäuren modifiziert nach (Russell 2003) und (Thomas et al. 2008). Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Syntheseschritte auf. Die Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) entscheidet durch eine negative Feedbackschleife über die Poolgröße an Gallensäuren. Die Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1) bestimmt das Verhältnis der beiden primären GS Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA).

Der klassische Weg leistet unter physiologischen Bedingungen mit mindestens 75% den größten Beitrag zur Gallensäuresynthese (Thomas et al. 2008). Dieser beginnt

mit der Hydroxylierung von Cholesterin zu 7 α -Hydroxycholesterol durch das leberspezifische Schrittmacherenzym, die mikrosomale Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1), welches ein Enzym der Cytochrom-P-450-Superfamilie ist (Russell und Setchell 1992). Die Regulation dieses Enzyms entscheidet durch eine negative Feedbackschleife über die Poolgröße an Gallensäuren.

Der alternative Weg startet mit der Hydroxylierung der Seitenkette durch die mitochondriale Sterol-27-Hydroxylase (CYP27) und findet auch im extrahepatischen Gewebe (in Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen) statt. Axelson und Mitarbeiter vermuten, dass dieser Weg vor allem bei einer eingeschränkten Leberfunktion an Bedeutung gewinnt, sofern der klassische Weg in Folge einer chronischen Hepatopathie nur bedingt möglich ist (Axelson und Sjövall 1990).

Nach der Initiationsphase kann das Zwischenprodukt an dieser Stelle der GS-Synthese in zwei verschiedene Wege einmünden. Bei Vorhandensein der mikrosomalen Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1) wird an Position 12 des Steroidkerns eine Hydroxylgruppe eingeführt. Das entstandene Produkt ist die Trihydroxy-Cholsäure (CA), welche als äußerst hydrophil eingestuft wird. Die Regulation dieses Enzyms bestimmt schließlich durch die Hydroxylierung an C₁₂ über das Verhältnis der beiden primären GS Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) (Pandak et al. 2001).

Die nächsten Syntheseschritte beinhalten eine Oxidation durch die mitochondriale Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) und die Verkürzung der Seitenkette durch verschiedene Enzyme (Russell 2003). Die Synthese endet mit der Aminosäurekonjugation durch die Enzyme bile acid-coenzyme A synthetase (BACS) und bile acid coenzyme A: amino acid N-Acyltransferase (BAT) (Shonsey et al. 2005). Die Konjugation mit den Aminosäuren Glycin oder Taurin erfolgt je nach Substratangebot, aber meistens im Verhältnis 3:1 von Glycin zu Taurin. Ungefähr 98% der Gallensäuren verlassen die Leber in konjugierter Form. Die Konjugation der GS mit den Aminosäuren Glycin und Taurin wirkt sich positiv auf die chemischen Eigenschaften der GS aus, indem sie die Hydrophobizität und damit die Toxizität der GS senkt.

Im Darm ermöglichen die bakteriellen Enzyme von anaeroben Mikroorganismen durch Dekonjugation der Aminosäuren, Oxidierungs- und Dehydroxylierungsschritte

die Bildung der sekundären GS Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) (Thomas et al. 2008). Dabei führt die bakterielle 7 α -Dehydroxylierung der primären GS CA zur Bildung von DCA. Die sekundäre Gallensäure LCA entsteht ebenso durch eine 7 α -Dehydroxylierung von CDCA (Hofmann und Hagey 2008). Durch die Abspaltung einer OH-Gruppe nimmt die Hydrophobizität der sekundären GS DCA und LCA zu. Je hydrophober eine GS ist, desto zytotoxischer kann sie wirken. Die Tatsache, dass die sehr hepatotoxische LCA im Gegensatz zu den anderen GS fast vollständig fäkal eliminiert wird, kann als eine Art physiologische Hepatoprotektion verstanden werden (Hofmann 1999a). Im Kolon kann außerdem eine Modifikation der primären GS CDCA in Form einer bakteriellen 7 β -Epimerisierung erfolgen, wodurch die hydrophilere Dihydroxysäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) entsteht. Aufgrund der β -orientierten Hydroxylgruppe wird UDCA im Vergleich zu den anderen Gallensäuren als sehr hydrophil eingestuft (Thomas et al. 2008).

Letztlich ergibt sich ein zirkulierender GS-Pool aus 15 verschiedenen GS-Metaboliten und zwar den primären GS Cholsäure und Chenodeoxycholsäure, den sekundären GS Deoxycholsäure und Lithocholsäure sowie Ursodeoxycholsäure mit ihren Konjugaten. Das Mengenverhältnis der GS Cholsäure, Chenodeoxycholsäure und Deoxycholsäure beträgt 2:2:1 (Breitmaier und Jung 2009). Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure sind nur in geringen Konzentrationen im zirkulierenden GS-Profil vertreten.

Die Konjugation mit den Aminosäuren Glycin und Taurin ermöglicht hohe GS-Konzentrationen in Galle und Darm. Allerdings können diese hydrophileren GS nur schwer durch lipophile Membranen diffundieren, weshalb spezifische Transportsysteme zur Aufrechterhaltung des enterohepatischen Kreislaufs (EHC) erforderlich sind.

1.1.2 Metabolismus der Gallensäuren

Die Gallensäuren durchlaufen einen enterohepatischen Kreislauf. Dem Produktions- und Sekretionsort Leber und dem Absorptionsort Darm ist die Speicherstation Gallenblase dazwischengeschaltet. Spezifische biochemische Transportsysteme in Form von Pumpen komplementieren diesen Kreislauf zur Aufrechterhaltung der

Gallensäure- und Cholesterinhomöostase (siehe Abbildung 3). Dieser Zyklus wird mehrmals am Tag durchlaufen.

Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert und gelangen als Gallebestandteile in den Darm. Im Darm werden die unkonjugierten GS durch passive Diffusion und die konjugierten GS durch natriumunabhängige Aufnahme im Jejunum sowie natriumabhängige Transporter im terminalen Ileum rückresorbiert (Alrefai und Gill 2007). Nur ein geringer Anteil (~ 5%) der ins Kolon gelangten GS wird über den Stuhl ausgeschieden und durch Neusynthese ersetzt (Maillette Buy Wenniger und Beuers 2010). Zur GS-Resorption benötigen die Ileozyten den apikalen natriumabhängigen Gallensäuretransporter ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter) auf ihrer Oberfläche (Kosters und Karpen 2008). Gebunden an ein zytosolisches Transportpeptid I-BABP (ileal bile acid binding protein, FABP6) werden die GS zur basolateralen (sinusoidalen) Membranseite befördert und über das heterodimere natriumunabhängige Transportsystem OST α/β (organic solute transporter) (Rao et al. 2008) und MRP3 (multidrug resistance associated protein 3, ABCC3) an das Blut abgegeben, während die unkonjugierten GS passiv diffundieren. Die an Transportproteine wie Albumin gekoppelten GS erreichen über die Pfortader (Vena portae) durch fenestriertes Gefäßendothel die sinusoidale (basolaterale) Seite der Hepatozyten in der Leber. Nach der Dissoziation von Albumin im Disse-Raum erfolgt die Aufnahme der zirkulierenden Gallensäuren aus dem portalvenösen Blut über eine Kombination von natriumabhängigen (NTCP, Na^+ -taurocholate-co-transporting peptide) und natriumunabhängigen (OATP, organic anion transport polypeptides) Transportsystemen (Meier und Stieger 2002). Dieser First-Pass-Effekt ermöglicht die Extraktion von ca. 75-90% der GS (Meier 1995). Der Transport durch das Zytosol von der basolateralen zur kanalikulären Zellmembran der Hepatozyten wird wahrscheinlich durch intrazelluläre Bindungsproteine oder durch Vesikel vermittelt (Agellon und Torchia 2000). In der Leber setzt sich der GS-Pool aus neusynthetisierten GS und „recycelten“ GS zusammen. Diese werden über apikale Gallensäuretransporter gegen einen hohen, 100 - -1000 - fachen Konzentrationsgradienten in den Gallenkanalikus reseziert (Trauner und Boyer 2003). Dadurch entsteht ein osmotischer Druck und lässt Wasser und Elektrolyte in die Gallenkanalikuli strömen. Für diesen Efflux der Primärgalle sind ATP-abhängige Transportsysteme der ATP-Binding-Cassette (ABC)-Superfamilie notwendig. Für den

Transport von monovalent konjugierten GS ist die kanalikuläre Gallensäureexportpumpe BSEP (bile salt exportary pump, ABCB11) verantwortlich. Den Transport für divalente GS (sulfatierte und glucuronidierte GS) übernimmt das Multidrug-Resistance-Related Protein (MRP2, multi drug resistant protein 2, ABCC2) und die Multidrug export pump (MDR1A, ABCB1A). Unter cholestatischen Bedingungen sorgen basolaterale Transporter (MRP 3, 4, OATP2, OST α/β) für einen alternativen Sekretionsweg von GS und Bilirubin aus den Hepatozyten.

Von den Gallenkanalikuli erfolgt die Weiterleitung der GS über Ductuli in die größeren Gallengänge des Gallengangsystems und anschließend in die Gallenblase. Dort werden sie zusammen mit den anderen Bestandteilen der Galle gespeichert. Bei Aufnahme einer Mahlzeit führt die durch Cholezystokinin (CCK) und Motilin vermittelte Kontraktion der Gallenblase zur Freisetzung der Galle – einschließlich der Gallensäuren – über den Ductus choledochus in das Lumen des Duodenums.

Die Gallensäuren, welche der enterohepatischen Zirkulation (Leber, Gallenblase, Darm und Portalblut) entgehen und nicht aus dem portovenösen Blut reabsorbiert werden, gelangen schließlich in die systemische Zirkulation.

In der Niere finden sich an der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen natriumabhängige Transporter (ASBT). Diese ermöglichen aus dem glomerulären Filtrat die Rückresorption der GS, so dass unter physiologischen Bedingungen nahezu keine Exkretion von GS im Urin nachweisbar ist (Schlattjan et al. 2003). Bei Cholestase werden basolaterale Transporter (MRP 2, 3 und 4 und OST α /OST β) im proximalen tubulären Epithel der Niere exprimiert und dienen der verstärkten renalen Ausschleusung von GS.

Ähnliche membranständige Transportsysteme zur Reabsorption von GS lassen sich nicht nur in der Leber, im Darm und in der Niere nachweisen, sondern finden sich auch in den Cholangiozyten. Die GS werden im Gallengang durch das biliäre Epithel mit Hilfe des ASBT resorbiert und an der basolateralen Membran der Cholangiozyten wahrscheinlich über t-ASBT, Ost α/β und/oder MRP3 ausgeschleust (Trauner und Boyer 2003). Die Aufnahme durch die Cholangiozyten und der Rücktransport zur Leber über das periduktale Kapillarsystem werden als cholehepatischer Shunt bezeichnet, dessen Funktion jedoch noch nicht vollständig geklärt ist. Vermutet wird eine Umgehung des enterohepatischen Kreislaufs, insofern eine ileale Absorption

der GS nicht möglich ist oder um intrazelluläre Signalwege in den Cholangiozyten einzuleiten (Xia et al. 2006).

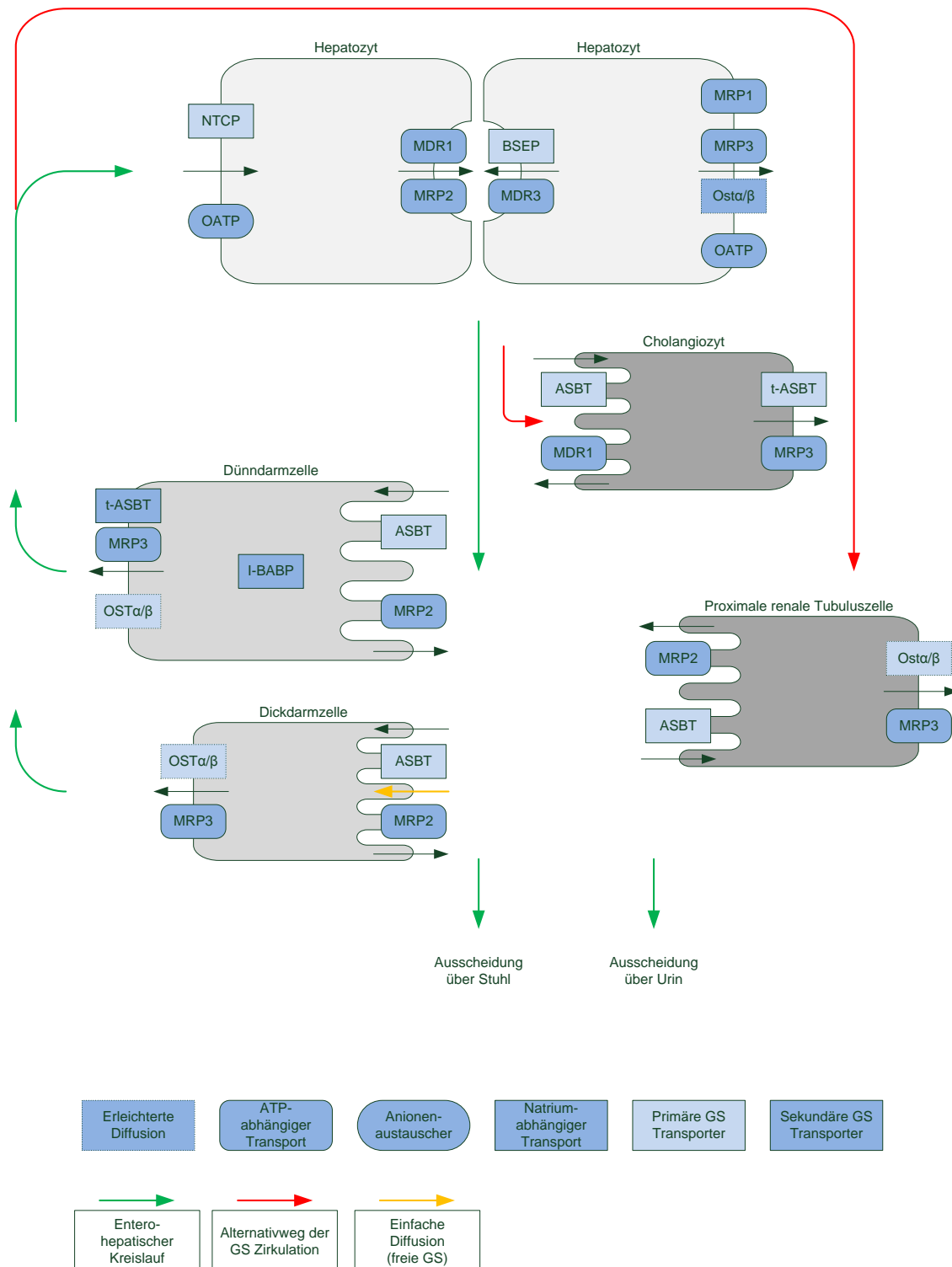


Abbildung 3: Transportersystem der GS modifiziert nach (Trauner und Boyer 2003; Thomas et al. 2008). Die Abbildung gibt einen schematischen Überblick über den enterohepatischen Kreislauf, welche die GS durchlaufen.

1.1.3 Physiologische Funktionen von Gallensäuren

Neben ihrer Funktion als physiologische Detergenzien zur Absorption hydrophober Nahrungsbestandteile wie Fette und fettlösliche Vitamine (A, D, E und K) gelten GS als komplexe Signalmoleküle mit systemischer Wirkung auf den gesamten Organismus. Unkonjugierte und konjugierte GS werden als Liganden für zellmembrangebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren GPCRs (G-protein-coupled receptors) (Kawamata et al. 2003) und intrazelluläre Hormonrezeptoren u. a. FXR (nuclear bile-acid-receptor) (Wang et al. 1999) angesehen, die nach Bildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes als Transkriptionsfaktoren spezifische DNS-Sequenzen binden und so die Expression von Genen modulieren können. Seit kurzem sind Gallensäuren auch der therapeutische Angriffspunkt bei verschiedenen metabolischen und hepatischen Erkrankungen wie Diabetes Typ II, Adipositas, Hypertriglyceridämie, Atherosklerose und Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (Thomas et al. 2008).

GS sind, abgesehen von ihren antimikrobiellen Eigenschaften, bei der Ausschleusung toxischer Substanzen und von Abfallprodukten involviert (Hofmann und Hagey 2008). 90% des hydrophoben und wasserunlöslichen Moleküls Cholesterin (~ 0,5 g/d) wird täglich zu amphipathischen Gallensäuren katabolisiert. Der verbleibende Anteil wird im Rahmen der Steroidhormonsynthese metabolisiert. Durch die hohe Absorptionsrate im Darm zeigt die enterohepatische Zirkulation eine enorme Effizienz, so dass nur wenig Energie für die Neusynthese von GS aufgewendet werden muss.

1.1.4 Pathologische Wirkungen von Gallensäuren

Während unter physiologischen Bedingungen die Gallensäuren essentielle Aufgaben übernehmen, werden ihnen bei der Cholestase potentiell zytotoxische Wirkungen zugeschrieben. Das Ausmaß der Zytotoxizität der GS hängt nicht nur von der Konzentrationshöhe der GS ab, sondern auch von der GS-Spezies. Hinsichtlich der Toxizität kommt vor allem den unkonjugierten hydrophoben GS wie LCA, DCA und CDCA eine Bedeutung zu, wie bereits in Kapitel 1.1.1 erläutert wurde.

In Modellversuchen wurde gezeigt, dass unter cholestatischen Bedingungen eine Akkumulation von GS innerhalb der Leber, in den Hepatozyten, im System-Kreislauf

und schlussendlich im „peripheren Gewebe“ resultiert (Rolo et al. 2001). Die erhöhten Konzentrationen an hydrophoben GS werden auf zellulärer Ebene für eine Reihe von pathologischen Wirkungen verantwortlich gemacht. Diese reichen von der Schädigung der Mitochondrien (Rolo et al. 2001), der direkten Membranschädigung bis hin zur Einleitung des programmierten Zelltods (der Apoptose) und der Nekrose (pathologischer Zelluntergang) von Hepatozyten und Cholangiozyten (Hofmann 1999b). Um diese zellschädigenden Effekte durch die Akkumulation zytotoxischer GS zu verhindern, stehen dem Organismus verschiedene Regulationsmechanismen zur Verfügung.

1.1.5 Regulationsmechanismen bei Cholestase

Die protektiven Mechanismen erstrecken sich auf die Ebene der Syntheseregulation und der Transportsysteme. Das Ziel ist die Supprimierung der GS-Aufnahme und die Unterstützung des GS-Effluxes (Cholerease), um schließlich die Schädigung durch potentiell toxische hydrophobe GS zu vermindern bzw. zu verhindern.

Durch negative Rückkopplungsmechanismen wird Einfluss auf die GS-Synthese genommen. Dies geschieht durch Hemmung der Transkription der beiden Schlüsselenzyme Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1), dessen Aktivität über die Höhe der GS-Konzentrationen entscheidet, und der Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1), dessen Aktivität Einfluss auf die GS-Zusammensetzung nimmt (Li-Hawkins et al. 2002). Als weitere hepatoprotektive Mechanismen sind eine vermehrte Konjugation der GS durch Induktion von BACS (bile acid-coenzyme A synthetase) und BAT (bile acid coenzyme A: amino acid N-Acyltransferase) (Pircher et al. 2003) und eine erhöhte Cholerease zur Ausschleusung der GS aus den Hepatozyten in die Gallenkanalikuli zu nennen.

Auf Transporterebene reagiert die Leberzelle unter Cholestase zum einen mit einer Suppression der Transporter NCTP (Denson et al. 2001) und ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter) (Hruz et al. 2006), die zuständig für die Aufnahme von GS sind, zum anderen mit einer verstärkten Expression der Transporter BSEP (bile salt exportary pump) (Ananthanarayanan et al. 2001), MRP (multidrug resistance associated protein) und OST (organic solute transporter) α/β (Landrier et al. 2006), welche den Export von GS und eine Aktivierung des intrazellulären

Transportproteins I-BABP (ileal bile acid binding protein) vermitteln (Grober et al. 1999). Schlussendlich ist der Pool an zirkulierenden GS von einer strengen Regulation der Expression und Aktivierung von Transportsystemen in der basolateralen und apikalen Membran der Hepatozyten, Cholangiozyten und Ileozyten abhängig (siehe Abbildung 4).

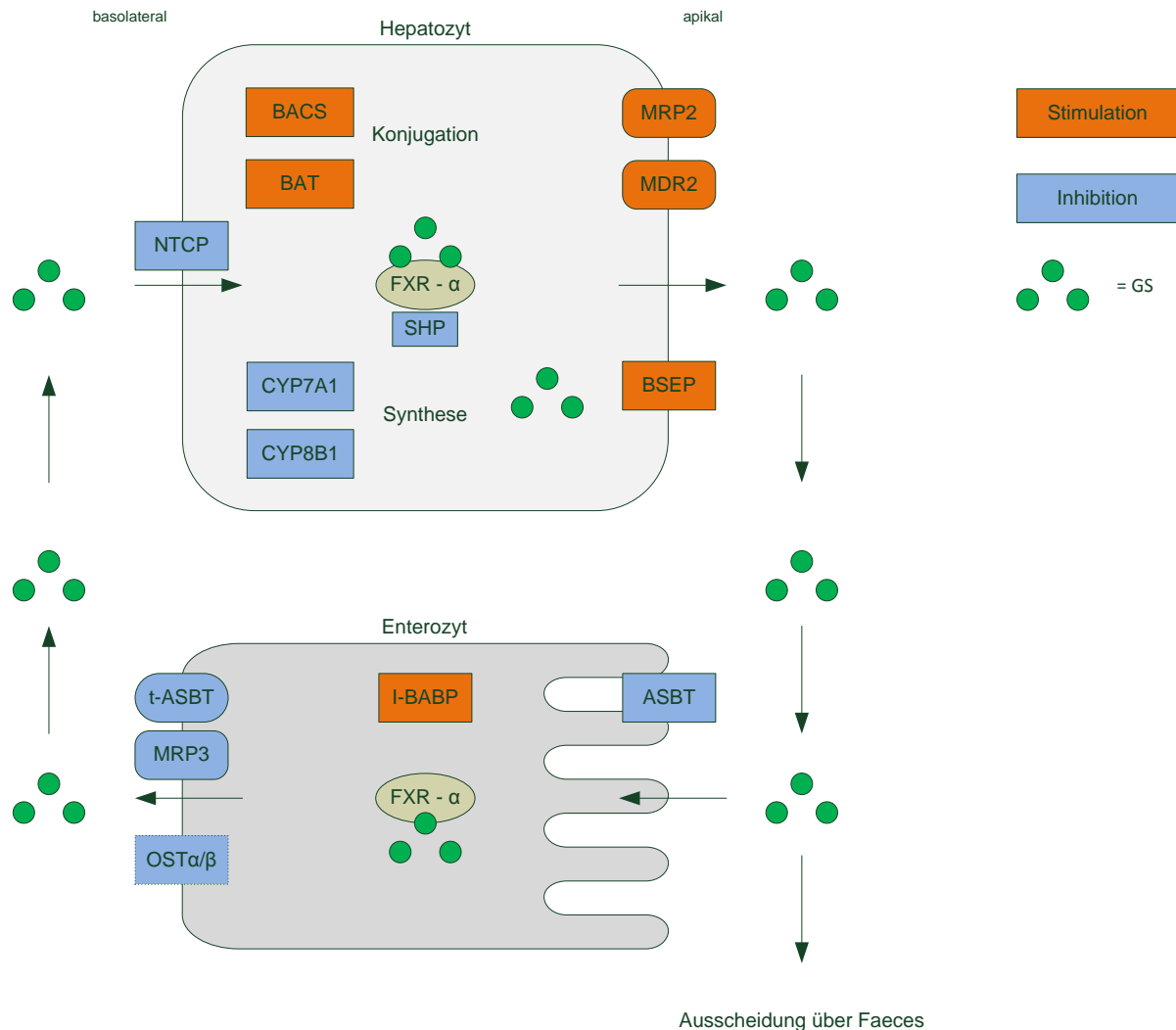


Abbildung 4: Regulationsmechanismen bei Cholestase modifiziert nach (Alrefai und Gill 2007).

1.1.6 Therapeutische Wirkung der Ursodeoxycholsäure

Um die Leber vor weiteren Schäden, welche durch die intrinsischen Schutzmaßnahmen des Organismus nicht abgefangen werden können, zu schützen, wird bereits seit langem auf die Gabe der hydrophilen Dihydroxy-Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) zurückgegriffen.

Zu den durch UDCA ausgelösten hepatoprotektiven Mechanismen werden die Cholerese, apoptosehemmende und zytoprotektive Wirkungen sowie Modifikationen in der GS-Zusammensetzung gezählt. Insbesondere werden über nukleäre Rezeptoren (FXR) die GS-Transportsysteme reguliert, die GS-Synthese via CYP7A1 gehemmt und über den Alternativweg die renale Exkretion verstärkt (Roma et al. 2011), um somit der zytosolischen Anreicherung hydrophober GS entgegenzuwirken. UDCA wirkt stabilisierend auf die GS-induzierte Lyse von Zellstrukturen (Plasmamembranen, Mitochondrien) der Hepatozyten und Cholangiozyten, welche einen Angriffspunkt vieler hydrophober GS darstellen (Lazaridis et al. 2001). Des Weiteren wird UDCA eine choleretische Wirkung zugeschrieben, indem Transportproteine, vesikuläre Exozytose (Lazaridis et al. 2001) und eine HCO_3^- -reiche dukuläre Sekretion der Cholangiozyten (Renner et al. 1988) induziert werden. Laborchemisch beeinflusst UDCA die leberspezifischen Parameter positiv und führt zu einer Linderung des Pruritus bei geringem Nebenwirkungsprofil (Poupon et al. 1991; Lindor et al. 2009). Eine Verzögerung fibrotischer und zirrhotischer Umbauvorgänge der Leber sowie ein Aufschub der Krankheitsprogression durch UDCA ließ sich jedoch bisher insbesondere bei der primär sklerosierenden Cholangitis nicht belegen (Lindor et al. 2009).

Nach oraler Einnahme erfolgt eine langsame Absorption von UDCA hauptsächlich intestinal (80%) und colisch (nur 20%) (Rubin et al. 1994). Die Absorptionsrate beträgt 30-60% (Rubin et al. 1994). Über den enterohepatischen Kreislauf erreicht UDCA die Leber und wird über Transporter (NCTP und OATP) in die Hepatozyten aufgenommen, in denen die Konjugation mit den Aminosäuren Glycin (hauptsächlich) und Taurin erfolgt. Im Anschluss werden die UDCA-Metaboliten biliär ausgeschieden. Der First-Pass-Effekt durch die Leber beträgt annähernd 70%, so dass die Konzentration in der systemischen Zirkulation einen niedrigen Anteil einnimmt (Saksena und Tandon 1997). Nach Sezernierung in die Galle wird sie wiederum aktiv im terminalen Ileum mit den endogenen Gallensäuren reabsorbiert. UDCA konkurriert mit den endogenen GS um die intestinale und hepatozelluläre Absorption (Sauer et al. 1999; Poupon et al. 1988) und kann so durch orale Zufuhr zur prädominanten Gallensäure sowohl in der Galle als auch im Serum werden.

Beim gesunden Kollektiv entspricht der Anteil von UDCA im GS-Profil ungefähr 1-3%. Unter der dauerhaften Therapie mit UDCA ist bei einer gewichtsbezogenen Tagesdosis von 13-15 mg/kg Körpergewicht (KG) ein Anstieg um bis zu 65% der relativen UDCA-Konzentration zu beobachten, ohne dass dies zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS im Blut führt (Poupon et al. 1993). Die anticholestatische Wirkung von UDCA beruht auf dem Austausch endogener hydrophober GS durch UDCA-Metaboliten und somit der Verschiebung zugunsten hydrophileren weniger toxischen GS im GS-Pool (Roma et al. 2011).

Demgegenüber wird in Studien behauptet, dass die Medikation mit UDCA zu keiner Modifikation in der GS-Pool-Zusammensetzung, insbesondere zu keiner Verschiebung zugunsten der UDCA-Metaboliten führt (Beuers et al. 1992; Rudolph et al. 1993). In der Studie von Sinakos und Mitarbeitern wird darüber hinaus postuliert, dass bei UDCA-therapierten Patienten keine Konzentrationsveränderungen von CA, CDCA und DCA, aber ein Anstieg der hepatotoxischen GS LCA infolge verringerter enteraler Absorption von UDCA und mikrobieller Konversion von UDCA zu 7-Ketolithocholsäure und Lithocholsäure hervorgerufen wird (Hofmann 1994; Sinakos et al. 2010). In dieser Studie wird deshalb u. a. untersucht, ob und welche Veränderungen sich im GS-Profil unter der Therapie mit UDCA nachweisen lassen. Darüber hinaus gilt UDCA nicht nur bei obstruktiv-cholestatischen Hepatopathien als Therapie der Wahl, sondern ist auch bei Cystischer Fibrose (CF) und nach Lebertransplantation als Therapeutikum etabliert (Lazaridis et al. 2001).

1.2 Hepatobiliäre Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter

Ein breites Spektrum an hepatobiliären Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter stellt eine differentialdiagnostische Herausforderung dar. Aufgrund der unterschiedlichen Pathomechanismen der Erkrankungen könnten diese auf unterschiedliche Weise zu Veränderungen der GS-Konzentrationen in Quantität und Qualität führen und schließlich in einer charakteristischen GS-Pool-Zusammensetzung resultieren. Deren Ätiologie und die bisherigen Erkenntnisse zur GS-Zusammensetzung werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Cholestatische Erkrankungen

Zu den häufigsten pädiatrischen cholestatischen Erkrankungen werden die (extrahepatische) Gallengangatresie (GGA) und das Alagille-Syndrom (AGS) sowie die durch Transporterdefekte bedingten progressiven familiären intrahepatischen Cholestase-Syndrome (PFIC) gezählt. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) findet sich im pädiatrischen Kollektiv dagegen eher selten. Liegt vorwiegend ein extra-/intrahepatisches Abflusshindernis der Galle vor, spricht man von einer obstruktiv-cholestatischen Erkrankung (GGA, AGS, PSC). Eine Sekretionseinschränkung auf hepatozellulärer Ebene definiert die nicht-obstruktive Cholestase, wie z. B. die nicht-obstruktiven familiären intrahepatischen Cholestase-Syndrome (PFIC).

Extrahepatische Gallengangatresie (GGA)

Die Gallengangatresie ist die häufigste Ursache einer neonatalen Cholestase mit dem klinischen Erscheinungsbild von acholischen Stühlen und Ikterus prolongatus. Wie der Name vermuten lässt, fällt sie zunächst durch eine Obstruktion der extrahepatischen Gallengänge auf, was wiederum eine Störung des enterohepatischen Kreislaufs durch Behinderung des Galleflusses zwischen Leber und Dünndarm zur Folge hat. Als Ursache wird eine immunologische Komponente in Folge eines hepatotropen Virusinfektes mit fehlgesteuerter immunologischer Reaktion diskutiert. Darüber hinaus wird bei ca. 15% der Betroffenen eine sog. syndromale Form der GGA im Rahmen von Heterotaxie-Syndromen mit Störung der Lateralisation abdominalen Organe beschrieben (Melter et al. 2013). Unbehandelt führt die GGA meist innerhalb der ersten Lebensmonate zu einer sekundär biliären Leberzirrhose. Histologisch lässt sich ein fibrosierender und entzündlicher Prozess in Form einer von distal nach proximal ascendierenden Cholangitis nachweisen, wodurch eine partielle oder vollständige Obliteration und Vernarbung der extra- und intrahepatischen Gallengänge resultiert. Aufgrund der ausgeprägten Galleabflussstörung zeigt sich eine hepatokanalikuläre Cholestase und als Folge eine neoduktuläre Proliferation. Hinsichtlich der Beurteilung der Funktionsfähigkeit des GS-Transportes steht die biliäre Obstruktion im Bereich der extrahepatischen Gallenwege mit fehlendem Abfluss in den Darm im Vordergrund. Dies führt zu erhöhten Konzentrationen der primären GS in der Leber und schlussendlich auch im

Blut sowie zu verminderten Konzentrationen der im Darm synthetisierten sekundären GS (Abukawa et al. 1998; Javitt et al. 1977).

Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)

Sowohl eine progressiv fibrosierende Entzündung als auch eine Destruktion der intra- und/oder extrahepatischen Gallengänge in Form von multiplen Stenosen mit prästenotischen Dilatationen als histologisches Korrelat finden sich bei der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), deren Ätiologie unbekannt ist (Silveira und Lindor 2008b). Vermutet wird neben genetischen, toxischen und mikrobiellen Faktoren auch eine autoimmunbedingte Komponente. Häufig zeigt sich eine Assoziation (~ 70%) mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa (Silveira und Lindor 2008a) und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung hepatobiliärer (v. a. cholangiozelluläres Karzinom) und kolorektaler Karzinome. Aufgrund der Pathophysiologie der Erkrankung resultiert ähnlich wie bei der Gallengangatresie eine mechanische Obstruktion im Gallenwegsystem, so dass der Galleabfluss beeinträchtigt ist und letztlich eine Erhöhung der GS im Blut zur Folge hat (Trauner et al. 2010b).

Alagille-Syndrom (AGS)

Das Alagille-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Multisystemerkrankung. Je nach phänotypischer Ausprägung sind neben der biliären Manifestation in Form einer Hypoplasie der intra- und z. T. extrahepatischen Gallengänge u. a. das Herz und die herznahen Gefäße (periphere Pulmonalstenose), das Skelett (Schmetterlingswirbel), die Fazies (breite Stirn, Hypertelorismus), die Augen (Embryotoxon) und die Nieren mitbetroffen (Nierenzysten) (Alagille et al. 1987). Diese beschriebenen Dysmorphien führen oft zu einer Blickdiagnose. Genetisch ließen sich Mutationen im Jagged 1-Gen (JAG1) oder Notch 2 (NOTCH2)-Gen (McDaniell et al. 2006) nachweisen. Aufgrund der v. a. intra-, z. T. aber auch extrahepatischen Galleabflussstörung finden sich sowohl in den Hepatozyten als auch im Blut erhöhte Konzentrationen der primären GS. Typische Symptome bei Patienten mit Alagille-Syndrom sind die ausgeprägte Fettmalabsorption und der oft quälende Juckreiz, der nicht selten in Zusammenhang mit der Erhöhung bestimmter pruritogener toxischer GS gebracht wird (El-Koofy et al. 2011). Inwieweit diesem Aspekt einer charakteristischen Veränderung der GS-Zusammensetzung im

Vergleich zu den anderen obstruktiv-cholestatischen Erkrankungen Bedeutung zukommt, ist Inhalt dieser Dissertation.

Progressive familiäre intrahepatische Cholestase-Syndrome (PFIC)

Auf Ebene der Hepatozyten sind die kanalikulären Exportpumpen für die Ausschleusung diverser gallepflichtiger Substanzen in die Gallenkanalikuli verantwortlich. Mutationen von Genen, welche für Transporterproteine kodieren, sind die Ursache der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase-Syndrome (PFIC) Typ 1-3 (siehe Abbildung 5).

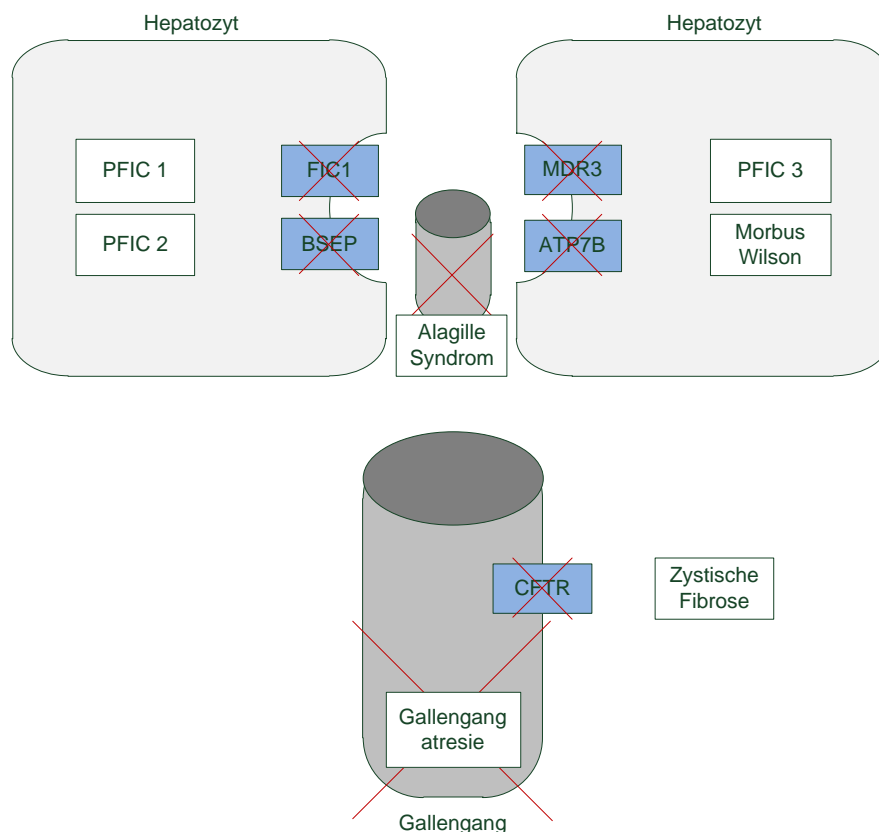


Abbildung 5: Defekte am hepatobiliären Transportsystem modifiziert nach Trauner und Boyer 2003.

Je nachdem, welcher Transporterdefekt in der kanalikulären Hepatozytenmembran vorliegt, werden drei Formen der autosomal rezessiv vererbten progressiven familiären intrahepatischen Cholestase-Syndrome unterschieden. Die PFIC Typ 1 (Morbus Byler) wird durch eine Mutation im kanalikulären Aminophospholipid-Transporter (Flippase) FIC 1 (Gen: ATP8B1) verursacht und führt zu einer Beeinträchtigung der biliären GS-Sekretion. Mutationen, die zu einer weniger

schwerwiegenden Funktionsstörung des Proteins führen, manifestieren sich mit dem Krankheitsbild der benignen rekurrierenden intrahepatischen Cholestase (BRIC 1) (Santos et al. 2010). Diese Erkrankung hat einen weniger ausgeprägten Verlauf und führt nicht zur Leberzirrhose. Die kanalikuläre Gallensäureexportpumpe BSEP ist für den Efflux von GS aus den Hepatozyten essentiell und eine Mutation derselben führt zur PFIC Typ 2 (Gen: ABCB11) (Oude Elferink et al. 2006). Das Pendant der milden Form manifestiert sich als BRIC Typ 2. Demgegenüber ist bei PFIC Typ 3 (Gen: ABCB4) eine Mutation der kanalikulären Phospholipidpumpe MDR 3 (multidrug-resistance-Glykoprotein 3) beschrieben, welche Phospholipide vor allem Phosphatidylcholin (PC) aus dem Zellinneren exportiert, um eine Bildung von gemischten Mizellen mit GS zu ermöglichen. Alle drei Formen werden den nicht-obstruktiven cholestatischen Erkrankungen zugeordnet. Während bei der PFIC Typ 1 und 2 ein Mangel an Transportproteinen mit intrazellulärer Akkumulation von GS im Vordergrund steht, führt bei der PFIC Typ 3 die eingeschränkte Mizellenbildung der GS mit Phospholipiden zu einer Fibrosierung der Gallengangzellwände durch ungebundene toxische Gallensäuren (Melter et al. 2013). Aufgrund des Transporterdefektes bei den PFIC-Subtypen kommt es zu einer erniedrigten biliären Sekretion von GS, was wieder zu erhöhten Konzentrationen der primären GS im Serum und in den Hepatozyten selbst führt (Tazawa et al. 1985).

Zwischenzeitlich konnten weitere Gene identifiziert werden, die bei entsprechenden Mutationen das klinische Bild einer PFIC verursachen können (TJP, FXR) (Gomez-Ospina et al. 2016; Sambrotta et al. 2014). Patienten mit diesen Erkrankungen befinden sich jedoch nicht in dem von uns untersuchten Kollektiv.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Behinderung des zirkulierenden GS-Pools bei den cholestatischen hepatobiliären Erkrankungen eine Retention hydrophober GS einhergehend mit einer erhöhten Gesamtkonzentration der GS resultiert, wie von einigen Autoren übereinstimmend dargelegt wurde (Rudman und Kendall 1957; Trottier et al. 2012). Des Weiteren stützen sie sich gegenseitig dahingehend, dass vor allem eine Akkumulation primärer GS und ein Mangel an im Darm synthetisierten sekundären GS imponiert (Délèze und Paumgartner 1977; Javitt et al. 1977; Tazawa et al. 1984). Diese Arbeit soll klären, ob die Analyse der GS-Pool-Zusammensetzung als nicht-invasiver diagnostischer

Baustein distinktive Unterschiede zwischen den hepatobiliären Erkrankungen aufdeckt. Ein Augenmerk richtet sich darauf, ob sich je nach Lokalisation der Galleabflussstörung ein charakteristisches GS-Profil-Muster ergibt.

Cholangiodysplastische Erkrankungen

Zu den cholangiodysplastischen Erkrankungen werden die kongenitale Leberfibrose und kongenitale Zysten im Gallengangsystem gezählt, die alle Anteile der intra- und extrahepatischen Gallengänge betreffen können (Deutsch et al. 2013). Sie alle beruhen auf einer Duktalplattenmalformation, einer Störung in der Ontogenese der Gallenwege (Deutsch et al. 2013).

Die Pathogenese von Choledochuszysten ist unklar. Die Zysten präsentieren sich klinisch sowohl intra- als auch extrahepatisch in unterschiedlichen anatomischen Variationen. Je nach Ausprägung resultiert eine obstruktive Cholestase mit sekundären Veränderungen des Leberparenchyms. In der Literaturrecherche finden sich bisher keine Studien zur GS-Zusammensetzung bei dieser Diagnosegruppe. In der hier vorliegenden Auswertung wird die Gruppe der cholangiodysplastischen Erkrankungen hinsichtlich der GS-Pool-Zusammensetzung als eigenständige Diagnosegruppe analysiert.

1.2.2 Entzündliche Lebererkrankungen

Der Diagnosegruppe mit vorwiegend entzündlicher Komponente werden die Erkrankungen Autoimmun- und Virushepatitis zugeordnet.

Autoimmunhepatitis (AIH)

Die Autoimmunhepatitis ist eine chronische Entzündung der Leber mit einem variablen Ausmaß der Parenchymzerstörung, deren Pathogenese bis heute noch nicht gänzlich geklärt ist. In der histologischen Untersuchung findet sich bei Patienten mit AIH eine portale Hepatitis mit typischer Grenzzonenaktivität und Plasmazellinfiltration ohne hepatokanalikuläre Cholestasezeichen. Neben der typischen Erhöhung der Gammaglobuline lassen sich typische Autoantikörper nachweisen. Im Verlauf der Erkrankung kann es zur Ausbildung einer Zirrhose kommen. Erkrankungen, die sowohl Autoantikörper aufweisen, als auch histologisch eine sklerosierende Cholangitis (Autoimmunchoolangitis, AIC) zeigen, werden als Überlappungs-Syndrome (Overlap-Syndrome) bezeichnet (Squires 2004). Es stellt

sich nun die Frage, zu welchen Veränderungen in der GS-Pool-Zusammensetzung eine Entzündung und Schädigung auf hepatozellulärer Ebene führt. Anzunehmen ist, dass zum einen die Synthese der GS beeinträchtigt ist und dies zu Veränderungen in der GS-Pool-Zusammensetzung führen wird. Auf der anderen Seite könnte im Rahmen der hepatozellulären Schädigung die Transportpumpenfunktion aufgrund z. B. von Energiemangel eingeschränkt sein. Bisher liegen nur beschränkt Ergebnisse zu GS-Profilen bei Patienten mit AIH vor (Trauner et al. 2010b). In unseren Studien erfolgt auch ein Vergleich des GS-Profiles hinsichtlich des Vorliegens einer AIH ohne/mit Autoimmuncholangitis (AIC).

Virushepatitiden

Von den infektiös bedingten Erkrankungen werden in dieser Arbeit nur die Virushepatitiden behandelt, die durch eine Infektion mit Hepatitis B oder C Virus hervorgerufen werden. Die Hepatitis B-Erkrankung kann akut oder chronisch verlaufen. Bei Kindern und Jugendlichen tritt sie oft asymptomatisch auf und heilt in den meisten Fällen symptomlos aus (Ganem und Prince 2004). Die Chronifizierung ist stark abhängig vom Lebensalter. Je jünger der Patient ist, desto höher ist das Risiko der Entwicklung einer chronischen Hepatitis B (Wirth et al. 2013).

Die akute Hepatitis C-Infektion unterscheidet sich klinisch kaum von einer Hepatitis A oder B und weist ebenso eher uncharakteristische Krankheitszeichen auf (Wirth et al. 2013). Unbehandelt mündet sie bei der Mehrzahl der Patienten in eine chronische Hepatitis, welche aber im Kindes- und Jugendalter meist einen milden Verlauf zeigt (Burdelski et al. 2004). Im Erwachsenenalter besteht das Risiko der Entwicklung einer Leberzirrhose und eines konsekutiven hepatozellulären Karzinoms.

Wenige Studien lassen sich zur GS-Pool-Zusammensetzung bei Patienten mit Virushepatitis finden. Eine Studie von Pennington zeigte bei Patienten mit viraler Hepatitis eine erhöhte Konzentration an CDCA-Metaboliten (Pennington et al. 1978). Eine mögliche Ursache könnte in einer verminderten Synthesefähigkeit der mikrosomalen Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1) liegen (Pennington et al. 1978). Inwieweit sich Veränderungen in der GS-Zusammensetzung im untersuchten Patientenkollektiv herausstellen, wird in dieser Arbeit untersucht.

1.2.3 Hepatische Stoffwechselerkrankungen

Zu den hepatischen Stoffwechselerkrankungen werden u. a. die zystische Fibrose, die nicht-alkoholisch bedingte Fettlebererkrankung, der Morbus Wilson, der alpha 1-Antitrypsin-Mangel, die Glykogenosen, der Morbus Meulengracht und die Mitochondriopathien gezählt.

Zystische Fibrose (CF)

Die autosomal-rezessiv vererbte Multisystemerkrankung Zystische Fibrose ist auf Ebene der Cholangiozyten mit der Mutation des CFTR-Kanals (cystis fibrosis transmembrane conductance regulator) assoziiert. Die gestörte Funktion des Chloridkanals und die daran gekoppelte eingeschränkte Bikarbonatsekretion ergibt ein abnorm visköses Sekret in den Gallenwegen. Eine hepatobiliäre Beteiligung kann in unterschiedlicher klinischer Ausprägung von Cholestase über Cholangitis, Stenosen im Gallengangsystem, Cholelithiasis, Fibrose bis hin zur Leberzirrhose auftreten (Colombo et al. 1994). Inwieweit sich daraus Implikationen auf den GS-Metabolismus ergeben, steht bereits im Fokus verschiedener Untersuchungen der letzten Jahrzehnte. Vor ungefähr 40 Jahren postulierten die ersten Autoren einen Einfluss von GS-Veränderungen auf die Pathogenese CF-assoziiierter Lebererkrankungen (CFLD) (Weber et al. 1973). Daraufhin folgten mehrere Untersuchungen von GS-Profilen bei CF-Patienten, welche Verschiebungen innerhalb des GS-Pools aufzeigten. Die Autoren verweisen aufgrund einer gestörten intestinalen Absorption auf einen hohen fäkalen Verlust von GS (Setchell et al. 1985) und einen Mangel an Taurin-konjugierten GS (Weber et al. 1973; Robb et al. 1985; Smith et al. 2004). In dieser Auswertung analysiere ich sie bewusst als eigenständige Diagnosegruppe. In das Studienkollektiv werden nur Patienten mit CF und klinisch relevanter Hepatopathie eingeschlossen.

Nicht-alkoholisch bedingte Fettlebererkrankung (NAFLD)

Aufgrund der Zunahme von Adipositas im Kindesalter gewinnt die nicht-alkoholisch bedingte Fettlebererkrankung (NAFLD, „non-alcoholic fatty liver disease“) in der Differentialdiagnostik pädiatrischer Hepatopathien zunehmend an Bedeutung. Infolge des oft asymptomatischen Verlaufs wird die Erkrankung nicht selten spät erkannt. Neben erhöhten Transaminasen weist die Fettlebererkrankung histologisch ein breites Spektrum auf. Sie manifestiert sich mit einer Anhäufung von fein- bis

grobtröpfigen Fettvakuolen ohne entzündliche Komponente (hepatische Steatose), (lobulär oder portal) mit Entzündung (nicht-alkoholisch bedingte Fettleber-Hepatitis, NASH) bis hin zu fokalen Nekrosen mit Degeneration der Hepatozyten. Histologisch ergeben sich keine Anzeichen für eine Cholestase bei regelrechten Gallenkanälchen und Gallengängen. Im Verlauf kann sich eine (lobuläre oder portale) Fibrose und/oder Zirrhose entwickeln, so dass im schlimmsten Fall die Indikation zur Lebertransplantation als einzige Therapieoption gestellt werden muss (Powell et al. 1990). Bei den Patienten findet sich oft eine Assoziation mit den Risikofaktoren Bewegungsmangel, Adipositas und/oder gestörter Glukosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ II sowie eine genetische Disposition (Sheth et al. 1997). Aufgrund der Akkumulation von Nahrungsfetten kommt es zu einem „first hit“ sowie durch chronische Schädigung der genannten Noxen („second hits“) zu Inflammation und Fibrose (Rodeck et al. 2013). Bisher ist zur GS-Pool-Zusammensetzung bei Patienten mit NAFLD wenig bekannt.

Morbus Wilson

Ein genetischer Defekt im Transportersystem der Hepatozyten verursacht den autosomal-rezessiv vererbten Morbus Wilson, hervorgerufen durch eine Störung der hepatozellulären kanalikulären Kupferexportpumpe (ATP7B) (Rodeck et al. 2013). Die verminderte Kupfersekretion über die Gallenwege führt zu Kupferablagerungen in verschiedenen Geweben, u. a. in der Leber und vor allem im Gehirn, in der Niere, im Knochen und in der Kornea (Muntau 2011). Das Spektrum der hepatischen Manifestation ist breit. So kann sich histologisch das Bild einer Steatose, einer Hepatitis bis hin zu einer Fibrose und im fortgeschritten Stadium eine Leberzirrhose zeigen. Ob sich Veränderungen in der GS-Pool-Zusammensetzung zeigen, wurde bisher laut Literaturrecherche noch nicht untersucht.

Alpha 1-Antitrypsin-Mangel (α_1 -AT-Mangel)

Das Glykoprotein alpha 1-Antitrypsin (α_1 -AT) wird in der Leber gebildet und ist ein Protease-Inhibitor. Bei fehlender Hemmung der Serinproteasen aufgrund von Mutationen im α_1 -AT-Gen (SERPINA1) führt dies vor allem bei homozygoten Allel-Trägern vom Phänotyp PiZZ zu einer proteolytischen Andauung von Lungengewebe bis hin zum Emphysem (Rodeck et al. 2013). In der Leber akkumulieren α_1 -AT-Proteinaggregate im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten, was, je nach

Verlauf, frühzeitig zu Entzündungsprozessen in der Leber führen und in einer Fibrose/Zirrhose resultieren kann (Sveger 1988; Perlmutter 1991). Die Pathogenese der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung ist bis heute nicht geklärt. Die Autoren Nemeth und Mitarbeiter untersuchten pädiatrische Patienten mit alpha 1-Antitrypsin-Mangel und stellten fest, dass bei Vorliegen einer Zirrhose erhöhte Serum-Konzentrationen an GS nachgewiesen werden konnten, bei histologisch nachgewiesener Fibrose zeigten sich die GS im Normbereich (Nemeth et al. 1982). Aufgrund der ähnlichen Symptomatik zur Gallengangatresie ist klinisch eine Unterscheidung oft schwierig, so dass der alpha 1-Antitrypsin-Mangel bei einer neonatalen Cholestase differentialdiagnostisch abgeklärt werden sollte.

Glykogenspeichererkrankungen

Als weitere hepatisch bedingte Stoffwechselerkrankung sind die Glykogenspeichererkrankungen (Glykogenosen) zu nennen. Durch Enzym- und Transporterdefekte des Kohlenhydratstoffwechsels kommt es bei diesen zu Ablagerungen von Glykogen in verschiedenen Organen u. a. auch in den Hepatozyten (Rodeck et al. 2013). Primär ist mit Konsequenzen auf den GS-Metabolismus nicht zu rechnen, jedoch können einige Glykogenosen eine Leberzirrhose induzieren. Aufgrund der eingeschränkten Leberfunktion im Rahmen der Parenchymschädigung und des Leberumbaus könnte dies zu Veränderungen in der Zusammensetzung des GS-Pools führen.

Mitochondriopathien

Bei den Mitochondriopathien liegt eine Funktionsstörung der Mitochondrien zugrunde, wodurch verschiedene Organsysteme mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung betroffen sind. Bei fehlender Verfügbarkeit von Energie resultiert u. a. konsekutiv eine eingeschränkte Funktion, der auf ATP (Adenosintriphosphat) angewiesenen Transportpumpen in der Niere, im Darm und in der Leber, so dass es möglicherweise zu Auswirkungen auf die Import- und Exportpumpen des enterohepatischen Kreislaufs kommen könnte. Zur GS-Profil-Zusammensetzung bei diesen Patienten finden sich bisher in der Literaturrecherche keine Ergebnisse.

Morbus Meulengracht

Beim Morbus Meulengracht (Gilbert-Syndrom), der klinisch durch einen intermittierenden konjunktivalen Ikterus charakterisiert ist, liegt aufgrund einer

verminderten Enzymaktivität der mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferase (UDP-GT, Uridindiphosphoglukuronat-Glucuronyltransferase) eine milde Hyperbilirubinämie mit Erhöhung ausschließlich des unkonjugierten Bilirubins ohne Hinweise auf eine Hämolyse oder globale Hepatopathie vor (Strassburg 2010). Aufgrund der Pathophysiologie der Erkrankung in Form einer eingeschränkten Glucuronidierung von unkonjugiertem Bilirubin zu Bilirubinmono- und Bilirubindiglukuronid ist primär nicht mit einem Einfluss auf den GS-Metabolismus zu rechnen. In dieser Studie wird die Erkrankung vergleichend zu anderen pädiatrischen hepatischen Stoffwechselerkrankungen analysiert.

1.2.4 Vaskuläre Malformationen der Leber

Die in dieser Studie inkludierten Patienten mit vaskulären Malformationen der Leber wiesen venöse Gefäßverbindungen zwischen Pfortader- und Systemkreislauf auf (sog. Abernethy-Malformation). Hinsichtlich des GS-Metabolismus kann vermutet werden, dass im Darm synthetisierte sekundäre GS ohne portalen „first-pass-Effekt“ in den Systemkreislauf gelangen und somit in erhöhter Konzentration im Serum nachgewiesen werden können. Bislang wurde keine Studie zur GS-Profil-Zusammensetzung bei diesem Kollektiv veröffentlicht.

2 Fragestellungen der Arbeit

Die Zusammensetzung des Gallensäure-Pools bei hepatobiliären Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter ist bis jetzt noch nicht im Einzelnen definiert. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse zu GS und die unterschiedlichen Pathomechanismen der Erkrankungen deuten aber auf Unterschiede hin.

FRAGESTELLUNGEN:

- Welchen Stellenwert haben Gallensäuren und deren Pool-Zusammensetzung im Blut in der Differentialdiagnostik cholestatischer (obstruktiver versus nicht-obstruktiver) und nicht-cholestatischer Lebererkrankungen?
- Lassen sich anhand des GS-Profiles verschiedene Lebererkrankungen differenzieren?
- Inwieweit ist die Einhaltung einer strikten Nüchternzeit essentiell für die Auswertung und Beurteilbarkeit der GS-Profile?
- Wie wirkt sich die orale Gabe von Ursodeoxycholsäure auf die GS-Pool-Zusammensetzung aus und kann letztere als Instrument zum therapeutischen „Drug Monitoring“ eingesetzt werden?

3 Methodik und Patientenkollektiv

3.1 Analytische Methode

Die Anfänge der Gallensäureanalytik beruhen auf Detektionsverfahren durch Titration und Spektroskopie. Letztere reichen jedoch nicht aus, um spezielle Fragestellungen beantworten zu können. Am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Regensburg wurde deshalb ein geeignetes Verfahren entwickelt, um die einzelnen Gallensäurespezies sensitiv, schnell und auch in niedrigsten Konzentrationen ($< 10 \text{ nmol/l}$) bestimmen zu können (Scherer et al. 2009). Im Detail wird das Detektionsverfahren LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) benutzt. Die Tandem MS ist an ein chromatographisches Auftrennsystem und zwar die Liquidchromatographie (LC) gekoppelt. Der Vorteil dieser Kopplung ist, dass nicht nur die Gesamtkonzentration einer Substanz, sondern auch deren einzelne Komponenten bestimmt werden können. Diese uns in der Routinediagnostik zur Verfügung stehende Analytik ermöglicht somit die Identifizierung und Quantifizierung von fünf verschiedenen Gallensäuren (GS) sowie ihren Glycin (G)- und Taurin (T)-Konjugaten, und zwar die primären GS Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA), die sekundären GS Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) sowie Ursodeoxycholsäure (UDCA).

3.2 Studiendesign

Die prospektive Studie wird an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie, am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

3.2.1 Einschlusskriterien

In die Studie werden Patienten im Alter von 0-17 Jahren, die sich mit dem Verdacht oder dem Nachweis einer (cholestatischen) Lebererkrankung ambulant oder stationär im Rahmen der initialen Diagnostik und der weiteren Betreuung vorstellen, eingeschlossen.

3.2.2 Ausschlusskriterien

Die Kriterien für einen Ausschluss aus der Studie sind eine fehlende Einwilligungserklärung der Eltern sowie des Patienten und die Vollendung des 18. Lebensjahres.

3.2.3 Datenerfassung

Um die Daten der Patienten erheben zu können, werden die Patienten ausführlich durch die betreuenden Ärzte (w/m) über die Studie aufgeklärt. Im Anschluss erhalten sie eine detaillierte Patienteninformation und eine Einwilligungserklärung. Die Einwilligungserklärungen werden archiviert. Die Erhebung und Auswertung der Studiendaten erfordert keine zusätzlichen Ambulanzbesuche oder Blutentnahmen, da die erforderlichen Studiendaten bereits Bestandteil der Routinediagnostik sind.

3.2.4 Zielparameter

In pseudonymisierter Form werden folgende Zielgrößen, Einflussgrößen und Begleitvariablen von den Patienten erfasst:

- Zielgröße: Diagnose
- Einflussgröße: Gallensäure-Profil
- Verzerrende Störgrößen: UDCA-Medikation (Tagesdosis), Nüchternzeit vor der Blutentnahme
- Anamnestische Daten: Alter, Geschlecht, Supplementierung mit mittelkettigen Triglyceriden, Operationen am Gastrointestinaltrakt, Erhebung der Stuhlfarbe mittels Testkarte (Chen et al. 2006)
- Körperliche Untersuchung: Größe, Gewicht, Pruritus Score und sekundäre Leberhautzeichen (Spider-Naevi, Palmarerythem, Uhrglasnägel)
- Zur besseren Vergleichbarkeit wird der Z-Score herangezogen, dieser ist im Gegensatz zu den Originalwerten auf Alter und Geschlecht standardisiert.
- Der Grad an Juckreiz wird durch den Pruritus Score in folgende Kategorien eingeteilt:
 - 0: fehlend
 - I: vorhanden, aber ohne erkennbare Kratzdefekte der Haut

- II: gelegentliche, zwischendurch abheilende Kratzdefekte
 - III: ständig vorhandene, deutliche Kratzspuren
 - IV: wie III, mit regelmäßig durch den Juckreiz gestörte Nachtruhe (Kardorff et al. 1996)
- Laborparameter: Albumin, Quick-Wert, Gerinnungsfaktoren II und V, CHE, GOT, GPT, GLDH, γ -GT, AP, Gesamtbilirubin (direktes und indirektes Bilirubin), Cholesterin, Lipoproteine (VLDL, HDL, LDL), Apolipoproteine (A-I, B), Vitamin A und E, Differentialblutbild, CrP.

3.2.5 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung erfolgt durch einen erfahrenen pädiatrischen Gastroenterologen und Hepatologen (w/m) nach ausführlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung, Labor-, Gewebsdiagnostik und ggf. bildgebenden Verfahren.

Das Diagnosespektrum in der Studie umfasst folgende Diagnosen:

- Extrahepatische Gallengangatresie (GGA)
- Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)
- Alagille-Syndrom (AGS)
- Progressive familiäre intrahepatische Cholestase-Syndrome (PFIC Typ I, II, III)
- Cholangiodysplastische Erkrankungen: Zystische Erkrankung („Choledochuszyste“), Kongenitale Leberfibrose, Caroli-Syndrom
- Autoimmunhepatitis (AIH) ohne/mit Autoimmuncholangitis (AIC)
- Virushepatitis: Hepatitis B, C
- Cystische Fibrose (CF)
- Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)
- Vaskuläre Malformation der Leber mit portosystemischem Shunt

- α 1-Antitrypsin-Mangel (α 1-AT-Mangel)
- Mitochondriopathie
- Morbus Wilson
- Morbus Meulengracht
- Glykogenose

Patienten, welche keiner der aufgeführten Diagnosen zugeordnet werden können, werden unter der Gruppe -Andere Hepatopathie- zusammengefasst. Hierunter fallen in der Studie u. a. folgende Erkrankungen: Leberzirrhose aufgrund systemvenöser Stauung, akutes Leberversagen (Non-A-E-Hepatitis), Pfortaderthrombose, Langerhans-Zell-Histiozytose, Mikrodeletionssyndrom, Solitäre Leberzyste.

Patienten, bei denen bis zum Studienende keine Diagnose gestellt werden konnte, verbleiben in der Gruppe -Unklare Hepatopathie-.

Patienten, bei denen im Verlauf keine Lebererkrankung nachweisbar ist, werden zur Gruppe –gesunde Probanden bzw. Kontrollgruppe- zugeordnet.

3.2.6 Gruppeneinteilung

Für bestimmte Fragestellungen ist es sinnvoller, das Patientenkollektiv in Gruppen zusammenzufassen, da einzelne Auswertungen durch die hohe Anzahl an Diagnosen sowie durch die niedrige Fallzahl pro Diagnose verzerrt werden.

Folgende Gruppen wurden zusammengefasst:

- Cholestatische Erkrankungen:
 - Biliär-obstruktiv: Extrahepatische Gallengangatresie, Primär sklerosierende Cholangitis, Alagille-Syndrom
 - Nicht-obstruktiv: Progressive familiäre intrahepatische Cholestase-Syndrome
- Cholangiodysplastische Erkrankungen: Kongenitale Leberfibrose, Zystische Erkrankung (Gallengangzyste, Choledochuszyste)

- Entzündliche Erkrankungen: Autoimmunhepatitis ohne/mit Autoimmuncholangitis, Virushepatitis (Hepatitis B, C)
- Zystische Fibrose
- Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
- Hepatische Stoffwechselerkrankungen: Morbus Wilson, α 1-Antitrypsin-Mangel, Glykogenose, Mitochondriopathie, Morbus Meulengracht
- Vaskuläre Malformationen der Leber mit portosystemischem Shunt
- Sonstige Hepatopathien: Unklare Hepatopathie, Andere Hepatopathie
- Kontrollgruppe

3.2.7 Verzerrende Störgrößen

- Der Metabolismus der GS ist von der Dauer der Nüchternheit abhängig. Nach Einnahme einer Mahlzeit steigen die Konzentrationen der GS in der Leber, im Darm und in der systemischen Zirkulation an (Ho 1976). Die strikte Einhaltung einer Nüchternzeit von acht Stunden ist aufgrund des jungen Erkrankungsalters in der Praxis schwer umzusetzen. Bei einem ambulanten Termin wird telefonisch darauf hingewiesen, dass möglichst ein langer Zeitraum ohne Nahrungsaufnahme vor der Blutentnahme vorliegt. Die Dauer der Nüchternheit wird in den Evaluationsdaten vermerkt. Auch die Zusammensetzung der letzten Mahlzeit wird protokolliert. Wird der Patient stationär behandelt, ist die Umsetzung der Nüchternzeit von acht Stunden in der Regel gegeben. In dieser Arbeit wird die Notwendigkeit der Einhaltung einer konsequenten Nüchternheit von mindestens acht Stunden untersucht.
- Die Auswertung der GS-Konzentrationen ist entsprechend des Alters der Studienteilnehmer abzustimmen. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten weisen zum Teil ein sehr junges Erkrankungsalter auf. Wenige Autoren befassen sich mit diesem Thema und zeigen auf, dass der enterohepatische Kreislauf, die Strukturen des Gallengangsystems, die verschiedenen Membrantransportsysteme, die Synthese der GS und die Hydroxylierung und Konjugation in den ersten Lebensmonaten noch nicht vollständig ausgereift sind (Nijima 1985). Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass sich die anaerobe Mikroflora erst im ersten Lebensjahr entwickelt, so dass die Bildung von sekundären GS noch eingeschränkt

ist (Hofmann 1999a). Nach diesem Zeitraum können die GS-Werte zu validen Schlussfolgerungen herangezogen werden.

- Einige Patienten wurden mit UDCA therapiert. Um den Einfluss der UDCA-Medikation zu untersuchen, werden die Diagnosen diesbezüglich unterschieden und die Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten betrachtet.
- Unter Berücksichtigung der sehr kleinen Patientenzahl ($n < 5$) in der Diagnosegruppe hepatische Stoffwechselerkrankungen ist die Analyse und Aussagekraft der Signifikanztests deutlich eingeschränkt.

3.3 Statistische Methoden

Die patientenbezogenen Daten wurden pseudonymisiert.

Die statistischen Auswertungen wurden in SPSS Version 19.0 durchgeführt.

a) Deskriptive (beschreibende) Statistik

- Als statistische Kenngrößen werden der Median (Zentralwert), Quartilsabstand (Range, 25. bis 75. Quartile), der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, der Minimalwert und der Maximalwert berechnet, um einen Eindruck über die Merkmalsverteilungen zu bekommen.
- Die Darstellung der Merkmalsverteilungen erfolgt mit Hilfe von Übersichtstabellen, welche die deskriptiven Parameter ausweisen.
- Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse werden Histogramme, Balkendiagramme, „Box-and-Whisker-Plots“ und „Scatter-Plots“ verwendet.
- Die Box-and-Whisker-Plots weisen in der Mitte den Median aus. Die Box wird begrenzt durch die beiden Quartilen (25.-75. Perzentile) und definiert den Hälftespielraum, d. h. 50% der Messwerte liegen in diesem Bereich. Die beiden Extremwerte (Minimalwert und Maximalwert) werden durch die Whiskers (Schnurrhaare) ausgewiesen.
- Zur Quantifizierung der Stärke eines statistischen Zusammenhangs von zwei metrischen Merkmalen wird der Rangkorrelationskoeffizient r nach Spearman Rho erhoben. Der Korrelationskoeffizient ist dimensionslos und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Je näher der Wert r bei 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Bei einem positiven Vorzeichen ist dieser gleichsinnig.

b) Induktive (Schließende) Statistik

- Signifikanztests verfolgen das Ziel, durch den Vergleich von Stichprobenwerten über folgende Hypothesen eine Entscheidung zu treffen.
 - Nullhypothese (H_0): Die beiden Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit, d. h. die Unterschiede sind zufallsbedingt.
 - Alternativhypothese (H_1): Die beiden Stichproben entstammen verschiedenen Grundgesamtheiten, d. h. die Unterschiede sind nicht zufallsbedingt.
- Ein geeignetes statistisches Verfahren zeigt durch die Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p , welche Hypothese beizubehalten ist.
- Die sog. Irrtumswahrscheinlichkeiten p können Werte von 0 bis 1 (0-100%) annehmen, wobei für alle Signifikanztests generell die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ (5%) als signifikant gewählt wird.
- Zur Überprüfung der metrischen Daten, ob diese die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllen, dient der Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei kleineren Stichprobenumfängen (< 50) wird der Shapiro-Wilks-Test angewendet (Janssen und Laatz 2007).
- Anhand des Student's t-Test und der univariaten Varianzanalyse werden die Diagnosen hinsichtlich Unterschiede in den Merkmalsausprägungen, den GS-Konzentrationen, untersucht, um einen Überblick über signifikante Unterschiede zu erhalten (Weiß 2010).
- Der Student's t-Test ermöglicht es zwei Fallgruppen in Bezug auf eine abhängige Variable zu unterscheiden.
- Die univariate Varianzanalyse stellt die Erweiterung dar und lässt eine Überprüfung signifikanter Unterschiede einer abhängigen Variablen zwischen mehreren Vergleichsgruppen zu. Die Varianzanalyse untersucht, ob mindestens ein Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten auszumachen ist. Welche Gruppe sich unterscheidet, wird durch einen Mehrfachvergleichstest (nach Bonferroni und Duncan) im Post Hoc Verfahren untersucht (Janssen und Laatz 2007).
- Zur Festlegung von Trennwerten für einzelne Parameter wird die ROC-Analyse angewendet. Durch diese Analyse werden Erkrankte von Nicht-Erkrankten durch optimale Schwellenwerte einzelner Parameter diskriminiert (Weiß 2010). Der

Flächenanteil der ROC-Kurve ist ein Maß für die Testgenauigkeit. Je näher dieser bei 1 liegt, desto besser eignet sich der Parameter zur Trennung der Patientengruppen.

c) Datenanalyse

- Um die Signifikanztests durchführen zu können, ist vorher zu überprüfen, ob eine Normalverteilung der GS vorliegt. Zur Überprüfung auf Normalverteilung wird an dieser Stelle der Arbeit der Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test angewendet. Aufgrund der hohen Anzahl an Variablen (GS) folgt die Darstellung exemplarisch anhand der Cholsäure und deren Konjugate (CA, GCA, TCA) bei den Patienten mit Gallengangatresie (n=20).

		Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistik	n	Signifikanz	Statistik	n	Signifikanz
Gallengangatresie	CA	0,27	20	0,00	0,64	20	0,00
	GCA	0,29	20	0,00	0,64	20	0,00
	TCA	0,30	20	0,00	0,72	20	0,00
	logCA	0,17	20	0,15	0,90	20	0,05
	logGCA	0,09	20	0,20	0,98	20	0,89
	logTCA	0,08	20	0,20	0,97	20	0,71

Tabelle 1: Test auf Normalverteilung der GS exemplarisch anhand CA, GCA und TCA bei den Patienten mit GGA (n=20). In unserer Studie berechnet sich nach Logarithmieren der Merkmale $p > 0,05$ (siehe Spalte Signifikanz), somit weichen unsere Daten nicht signifikant von einer theoretischen Normalverteilung ab.

- In der Tabelle 1 werden sowohl die Ergebnisse der Datenanalyse des Kolmogorov-Smirnov-Tests als auch des Shapiro-Wilk-Tests ausgewiesen. Relevant ist die Spalte Signifikanz. Aufgrund der Signifikanzwerte $p < 0,05$ kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Stichprobe (Patienten mit Gallengangatresie) mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammt. Führt man diese Tests analog für alle weiteren GS und Diagnosen durch, bestätigen sich diese Ergebnisse. Die graphische Verdeutlichung erfolgt beispielhaft durch ein Histogramm der Cholsäure (Abbildung 6).

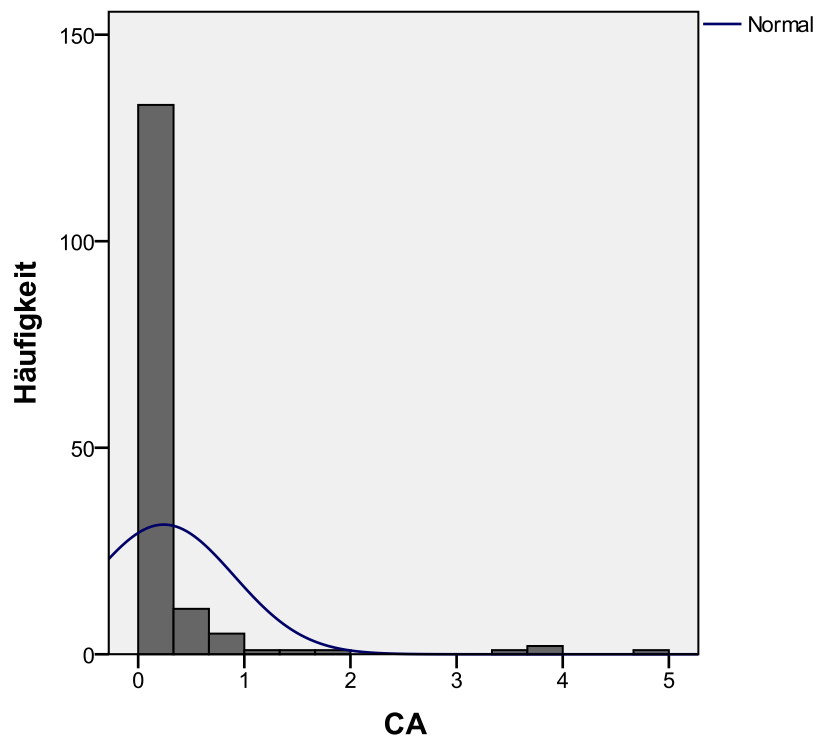


Abbildung 6: Histogramm der Cholsäure (CA). Auf der x-Achse werden die Messwerte, auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass die Daten schief verteilt sind.

- Nach Logarithmieren der Merkmale ($\log CA$, $\log GCA$, $\log TCA$) wird eine annähernde Normalverteilung (siehe Spalte Signifikanz) erreicht. Die Tabelle weist Irrtumswahrscheinlichkeiten $p > 0,05$ aus (Tabelle 1). Folglich kann angenommen werden, dass die Daten normalverteilt sind, was sich graphisch durch das Normalverteilungsdiagramm ($\log CA$) veranschaulichen lässt (Abbildung 7).

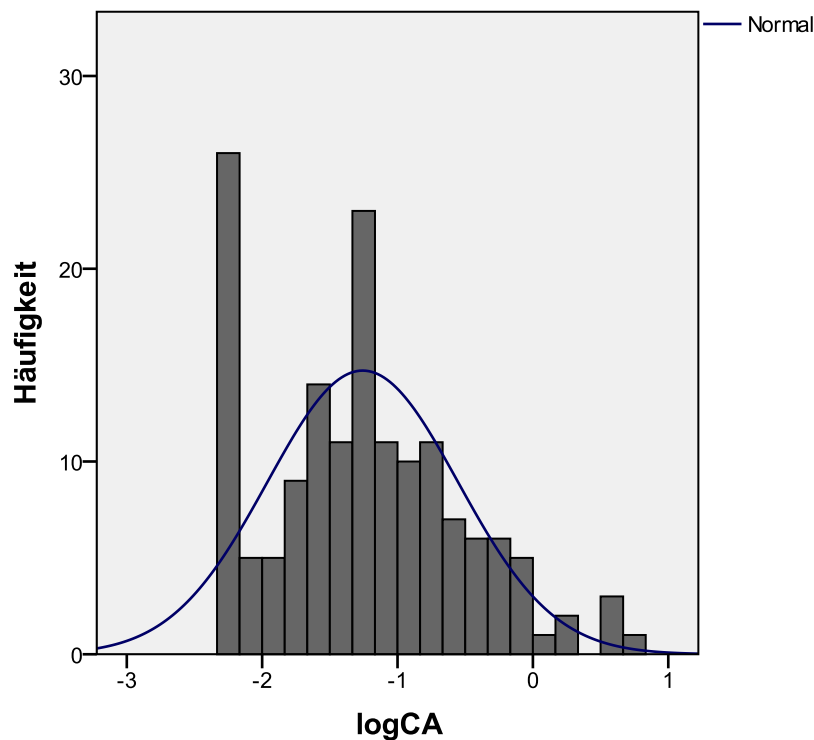


Abbildung 7: Histogramm der logarithmierten Cholsäure (logCA). Auf der x-Achse werden die Messwerte (logarithmiert), auf der y-Achse die Häufigkeit aufgetragen. Annähernd zeigt sich nun eine symmetrische glockenförmige Verteilung.

Nachdem die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllt ist, können die Analysen auf signifikante Unterschiede wie Student's t-Test und univariate Varianzanalyse angewendet werden. Da die Werte nur annähernd normalverteilt sind, wird im Balkendiagramm sowie Streu-/Punktdiagramm weiterhin der Median anstatt des Mittelwertes ausgewiesen.

3.4 Darstellung der Gallensäuren

Im Folgenden werden die Parameter dargestellt, welche aus den 15 verschiedenen GS berechnet und im Ergebnisteil analysiert werden (siehe Tabelle 2).

	GS	unkonj. GS	primäre GS	primär konj. GS	sekundäre GS	Glycin konj. GS	Taurin konj. GS	GS ohne UDCA	sekundäre GS ohne UDCA	CA-Metaboliten	CDCA-Metaboliten	DCA-Metaboliten	LCA-Metaboliten	UDCA-Metaboliten
CA	+	+	+					+		+				
GCA	+		+	+		+		+		+				
TCA	+		+	+			+	+		+				
CDCA	+	+	+					+			+			
GCDCA	+		+	+		+		+			+			
TCDCa	+		+	+			+	+			+			
DCA	+	+			+			+	+			+		
GDCA	+				+	+		+	+			+		
TDCA	+				+		+	+	+			+		
LCA	+	+			+			+	+				+	
GLCA	+				+	+		+	+				+	
TLCA	+				+		+	+	+				+	
UDCA	+	+			+									+
GUDCA	+				+	+								+
TUDCA	+				+		+							+

Tabelle 2: Die Tabelle gibt einen Überblick über die berechneten Parameter, welche im Ergebnisteil verwendet werden.

Zum Vergleich der einzelnen Diagnosen werden nicht nur die absoluten Konzentrationen der GS, sondern auch die relativen Konzentrationen herangezogen. Der Störgröße UDCA-Medikation wird bei der Angabe des relativen Anteils Rechnung getragen, indem man diese im Nenner berücksichtigt und die Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten berechnet. Exemplarisch für die Cholsäure und deren Konjugate werden folgende Variablen definiert (Tabelle 3).

GS	Absolute Konzentration der GS	Relativer Anteil der GS an der Gesamtkonzentration der GS	Berechnung des Quotienten	Relativer Anteil der GS an der Gesamtkonzentration ohne UDCA-Metabolite	Berechnung des Quotienten
Cholsäure	CA	relCA	$\frac{CA}{\text{Summe GS}} \times 1000$	relCA _{ou}	$\frac{CA}{(\text{Summe GS} - \text{UDCA-Metaboliten})} \times 1000$
Glyocholsäure	GCA	relGCA	$\frac{GCA}{\text{Summe GS}} \times 1000$	relGCA _{ou}	$\frac{GCA}{(\text{Summe GS} - \text{UDCA-Metaboliten})} \times 1000$
Taurocholsäure	TCA	relTCA	$\frac{TCA}{\text{Summe GS}} \times 1000$	relTCA _{ou}	$\frac{TCA}{(\text{Summe GS} - \text{UDCA-Metaboliten})} \times 1000$

Tabelle 3: Berechnung der relativen GS-Konzentrationen exemplarisch für die primäre Gallensäure Cholsäure (CA)

Des Weiteren werden folgende Quotienten berechnet (Tabelle 4).

Abkürzung	Quotient CA- zu CDCA-Metaboliten	Quotient Glycin- zu Taurin konj. GS (ohne UDCA)	Quotient freie zu konj. GS (ohne UDCA)	Quotient primäre zu sekundäre GS (ohne UDCA)
Berechnung	$\frac{\text{Summe CA-Metaboliten}}{\text{Summe CDCA-Metaboliten}}$	$\frac{\text{Summe Glycinkonj. ohne UDCA}}{\text{Summe Taurinkonj. ohne UDCA}}$	$\frac{\text{Summe freie GS ohne UDCA}}{\text{Summe konj. GS ohne UDCA}}$	$\frac{\text{Summe primäre GS ohne UDCA}}{\text{Summe sekundäre GS ohne UDCA}}$

Tabelle 4: Berechnung einzelner GS-Quotienten. Die Tabelle weist die Quotienten aus, welche im Ergebnisteil analysiert werden.

3.5 Analyse des Gallensäure-Profiles

Zur Veranschaulichung, welche Vorgehensweise bei der Analyse des GS-Profiles angewendet wird, folgt an dieser Stelle eine kurze Erläuterung. Als erstes wird die Gesamtkonzentration der GS betrachtet. Im Anschluss folgt eine Überprüfung hinsichtlich der Verteilung primäre zu sekundäre GS und UDCA. Im nächsten Schritt werden die Konzentrationen an unkonjugierten und Aminosäure-konjugierten GS beurteilt. Hierbei dienen sowohl die absoluten als auch die relativen Konzentrationen der GS. Außerdem werden die berechneten GS-Summen und Quotienten miteinbezogen.

3.6 Ethische Belange

Da es sich um eine prospektive Studie am Patienten mit der Erhebung von personenbezogenen Daten handelt, erfolgte ein Antrag an die Ethikkommission. Eine Genehmigung der Ethikkommission des Uniklinikums Regensburg zur Durchführung der Studie unter der Nr. 10-101-0069 liegt vor.

4 Ergebnisse

4.1 Basisdaten der Studienpopulation

Zu Beginn wird das Studienkollektiv in Bezug auf die Verteilung von Geschlecht, Alter und Erkrankung betrachtet. Ergebnisse zum Z-Score für den Parameter Body-Mass-Index (BMI), das Auftreten von sekundären Leberzeichen und Pruritus finden sich im Anhang.

4.1.1 Geschlechterverteilung der Patienten

In der Zeit von Juni 2009 bis Oktober 2014 haben 156 Patienten die Einschlusskriterien der Studie erfüllt, dabei überwiegen in Bezug auf das Gesamtkollektiv (n=156) die männlichen Patienten mit 56% (n=87) im Verhältnis zu den weiblichen Patienten mit 44% (n=69).

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung im untersuchten Kollektiv erkrankten weibliche Patienten vor allem an GGA und AIH, männliche Patienten an PSC, NAFLD, Alagille-Syndrom und CF (siehe Tabelle 5).

	Geschlecht		Gesamt
	weiblich	männlich	
Gallengangatresie	13	7	20
Unklare Hepatopathie	8	8	16
Alagille-Syndrom	5	10	15
Autoimmunhepatitis	9	6	15
NAFLD	4	10	14
Cholangiodysplasie	6	5	11
Mukoviszidose	4	5	9
Andere Hepatopathie	5	3	8
Kontrollgruppe	3	4	7
Virushepatitis	2	5	7
PFIC	3	3	6
PSC	0	6	6
Vaskuläre Malformation	2	3	5
M. Meulengracht	2	2	4
M. Wilson	2	2	4
α 1-AT-Mangel	0	4	4
Mitochondriopathie	1	2	3
Glykogenose	0	2	2
Gesamt	69	87	156

Tabelle 5: Verteilung des Geschlechts innerhalb der Diagnosen.

4.1.2 Altersverteilung der Patienten

Der Altersmedian im untersuchten Kollektiv beträgt 7,8 Jahre (w=6,8 Jahre, m=7,9 Jahre).

Bezogen auf das Gesamtkollektiv der Patienten (n=156) treten die Erkrankungen GGA mit 31% (n=17) und Alagille-Syndrom mit 11% (n=6) häufig im Alter < 5 Jahren (n=55) auf. Bei Jugendlichen (Alter > 14 Jahre, n=29) überwiegt deutlich die Diagnose Autoimmunhepatitis mit 31% (n=9), was sich auch im Median widerspiegelt (Median 15 Jahre). Ein ebenfalls hoher Altersmedian liegt bei den Diagnosen Morbus Wilson (Median 15 Jahre) und PSC (Median 15 Jahre), gefolgt von Morbus Meulengracht (Median 14 Jahre) und NAFLD (Median 11 Jahre).

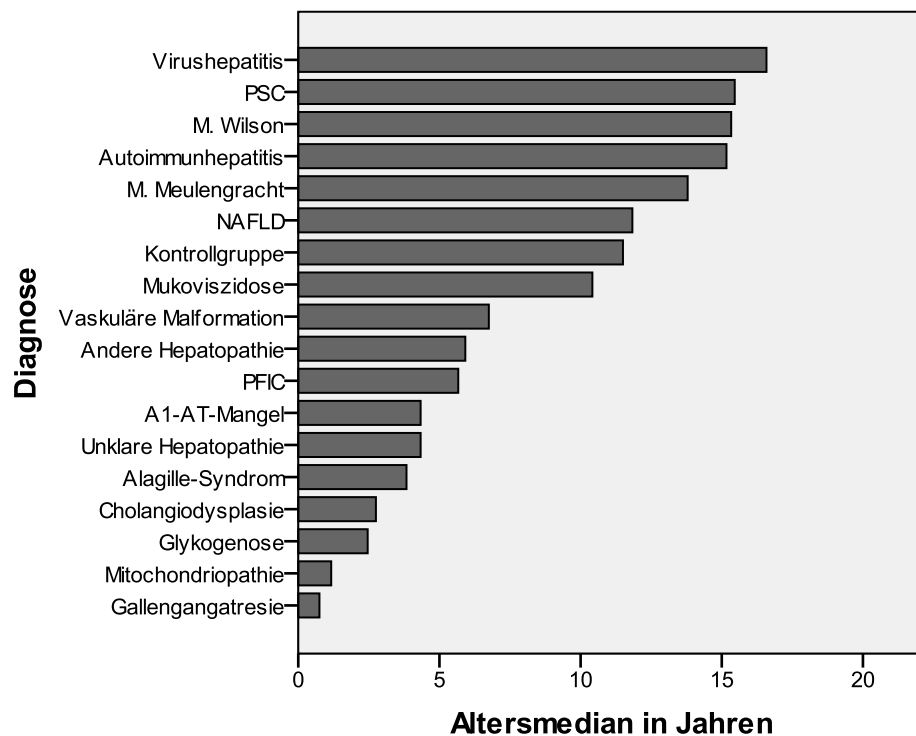


Abbildung 8: Mediane Altersverteilung der Diagnosen. Die Abbildung zeigt in absteigender Reihenfolge die Altersmediane der einzelnen Diagnosen.

4.1.3 Häufigkeitsverteilung der Diagnosen

Im Untersuchungszeitraum stellt sich das Patientenkollektiv mit einer hohen Anzahl an verschiedenen Erkrankungen dar. Um einen ersten Überblick über die Verteilung der Diagnosen zu bekommen, werden die zusammengefassten Diagnosegruppen dargestellt, siehe Abbildung 9.

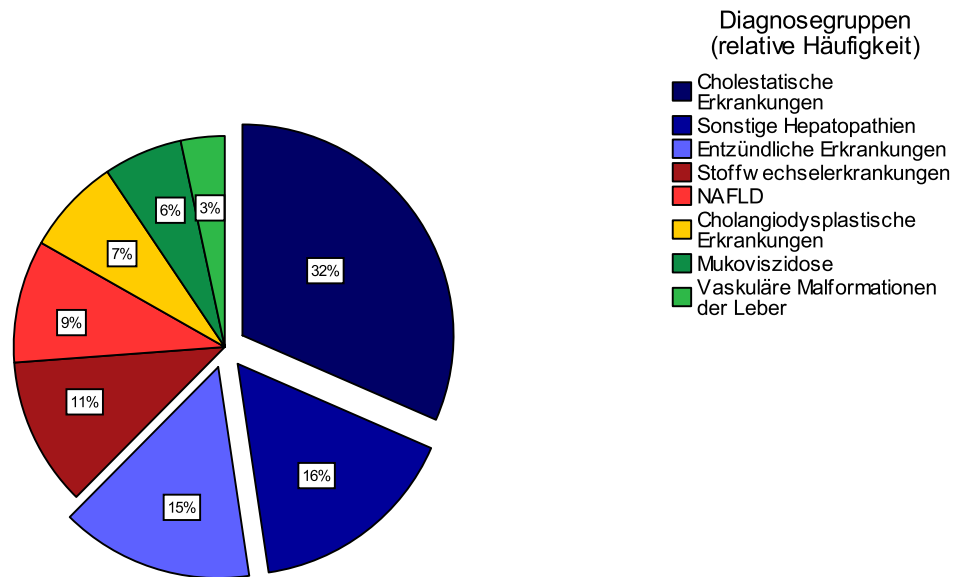


Abbildung 9: Relative Häufigkeitsverteilung der Diagnosegruppen.

Mit 32% (n=47) stellen Erkrankungen mit cholestatischer Komponente die häufigsten Diagnosen dar. Die zweitgrößte Diagnosegruppe Hepatopathien 16% (n=24) umfasst unklare Hepatopathien und andere Hepatopathien. Bei einigen Patienten (n=16) konnte bis Studienende keine sichere Diagnose gestellt werden, diese werden unter der Diagnosegruppe -Unklare Hepatopathie- geführt. Bei wenigen Patienten traten Erkrankungen (u. a. kongenitale Pfortaderthrombose, Langerhans-Zell-Histiozytose, systemvenöse Stauungshepatopathie) auf, die keiner, der in der Tabelle aufgeführten Diagnosegruppe, zugeordnet werden können. Diese finden sich in der Diagnosegruppe -Andere Hepatopathie-.

Ein Großteil der Patienten erkrankt an entzündlichen Erkrankungen 15% (n=22) und Stoffwechselerkrankungen 11% (n=17). In der Studie wurden 14 Patienten mit der Diagnose NAFLD inkludiert, dies entspricht einem Anteil von 9%. Einen relativ kleinen Anteil nehmen die Diagnosen Cholangiopathie 7% (n=11), Mukoviszidose 6% (n=9) und vaskuläre Malformationen der Leber 3% (n=5) ein. Im Verlauf der Studie konnte bei wenigen Patienten eine hepatobiliäre Erkrankung ausgeschlossen werden, so dass diese der Gruppe -Kontrollgruppe- ebenfalls mit einem niedrigen prozentualen Wert von 4% (n=7) zugeordnet werden.

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Diagnosegruppen und die einzelnen Diagnosen. Den größten Anteil unter den Diagnosen mit obstruktiv-cholestatischer Erkrankung machen die Patienten mit GGA (n=20) aus, gefolgt von den Patienten mit Alagille-Syndrom (n=15). Eher seltener werden Patienten mit PSC (n=6) aufgenommen. Zu den nicht-obstruktiven cholestatischen Erkrankungen werden 6 Patienten mit PFIC gezählt. Bei den entzündlichen Erkrankungen bildet die Diagnose Autoimmunhepatitis mit 15 Patienten die größte Gruppe, davon weisen 5 Patienten zusätzlich eine Autoimmunchoolangitis auf. Virushepatitiden werden im Vergleich zur Autoimmunhepatitis seltener erfasst. Innerhalb der Diagnosegruppe Cholangiopathie werden die Patienten in kongenitale Leberfibrose (n=7) und zystische Erkrankung (u. a. Choledochuszyste) (n=4) differenziert. Die Stoffwechselerkrankungen unterteilen sich in Morbus Meulengracht (n=4), Morbus Wilson (n=4), α 1-Antitrypsin-Mangel (n=4), Mitochondriopathie (n=3) und Glykogenose (n=2). Diese nehmen einen eher niedrigen Anteil im Studienkollektiv ein.

Diagnose und Diagnosegruppe	Absolute Häufigkeit (n)	Relative Häufigkeit (%)
Cholestatische Erkrankungen	47	30,1
<i>biliär-obstruktiv</i>		
Gallengangatresie	20	12,8
Alagille-Syndrom	15	9,6
PSC	6	3,8
<i>nicht-obstruktiv</i>		
PFIC	6	3,8
Cholangiodysplastische Erkrankungen	11	7,1
Zystische Erkrankung	4	2,6
Kongenitale Leberfibrose	7	4,5
Entzündliche Erkrankungen	22	14,1
Autoimmunhepatitis mit Autoimmuncholangitis	5	3,2
Autoimmunhepatitis ohne Autoimmuncholangitis	10	6,4
Hepatitis B	6	3,8
Hepatitis C	1	0,6
Mukoviszidose	9	5,8
NAFLD	14	9,0
Stoffwechselerkrankungen	17	10,9
Morbus Wilson	4	2,6
Morbus Meulengracht	4	2,6
α 1-Antitrypsin-Mangel	4	2,6
Mitochondriopathie	3	1,9
Glykogenose	2	1,3
Vaskuläre Malformationen der Leber	5	3,2
Sonstige Hepatopathien	24	15,4
Andere Hepatopathie	8	5,1
Unklare Hepatopathie	16	10,3
Kontrollgruppe	7	4,5
Gesamt	156	100,0

Tabelle 6: Absolute und relative Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diagnosen und Diagnosegruppen.

4.2 Gallensäure-Profil der Kontrollgruppe

Vom Institut Klinische Chemie können GS-Profile von 82 gesunden erwachsenen Probanden ausgewertet werden, welche in die Gruppe -Keine Erkrankung- aufgenommen und als nicht-erkrankte Kontrollgruppe verwandt werden. Aufgrund der schwierigen Umsetzbarkeit einer gesunden Kontrollgruppe von Kindern und Jugendlichen werden die GS-Profile von Erwachsenen herangezogen. Dennoch konnten von sieben Kindern, die sich ambulant vorstellten und bei denen sich im Verlauf keine hepatobiliäre Erkrankung nachweisen ließ, die GS ausgewertet werden. Diese werden ebenfalls in die gesunde Kontrollgruppe aufgenommen und als Lebergesunde geführt.

Die Tabelle 7 zeigt das GS-Profil der Kontrollgruppe. Die Gesamtkonzentration an GS der Kontrollgruppe reicht von 0,4 bis 14,0 $\mu\text{mol/l}$ (Median 1,8 $\mu\text{mol/l}$). Betrachtet man die Verteilung der einzelnen GS im Profil, zeigt sich, dass im GS-Pool die primären GS (Median 1,1 $\mu\text{mol/l}$) gegenüber den sekundären GS (Median 0,5 $\mu\text{mol/l}$) und den UDCA-Metaboliten (Median 0,2 $\mu\text{mol/l}$) deutlich überwiegen. Der Anteil an primären im Verhältnis zu sekundären GS ist im Median um das 1,8 fache höher, wobei bei den primären GS CDCA-Metaboliten (Median 0,7 $\mu\text{mol/l}$) im Gegensatz zu CA-Metaboliten (Median 0,3 $\mu\text{mol/l}$) dominieren. Der Quotient CA- zu CDCA-Metaboliten beträgt im Median 0,4 $\mu\text{mol/l}$.

Betrachtet man die sekundären GS, sind DCA-Metaboliten (Median 0,5 $\mu\text{mol/l}$) in einer höheren Konzentration als LCA-Metaboliten (Median 0,04 $\mu\text{mol/l}$) vorhanden. Es fällt auf, dass DCA-Metaboliten im GS-Profil um den Faktor 10 höher vertreten sind als LCA-Metaboliten, wobei erstere einen annähernd so hohen Anteil wie CDCA-Metaboliten im GS-Profil aufweisen. Die Konzentration an UDCA-Metaboliten beträgt im Median 0,2 $\mu\text{mol/l}$.

Hinsichtlich der Konjugation wird deutlich, dass Glycin-Konjugate (Median 1,0 $\mu\text{mol/l}$) gegenüber den Taurin-Konjugaten (Median 0,2 $\mu\text{mol/l}$) und den unkonjugierten GS (Median 0,6 $\mu\text{mol/l}$) überwiegen. In Bezug auf die Gesamtkonzentration der GS nehmen Glycin-Konjugate mit 44% den höchsten prozentualen Anteil, gefolgt von den unkonjugierten GS mit 43%, ein. Der relative Anteil der Taurin-konjugierten GS beläuft sich im Median auf 11%.

Bei den freien GS dominiert die GS DCA mit dem höchsten Median in Höhe von 0,3 $\mu\text{mol/l}$. In abnehmender Reihenfolge werden folgende Konzentrationen ausgewiesen: DCA Median 0,3 $\mu\text{mol/l}$ > CDCA Median 0,2 $\mu\text{mol/l}$ > UDCA Median 0,07 $\mu\text{mol/l}$ > CA Median 0,04 $\mu\text{mol/l}$ > LCA Median 0,01 $\mu\text{mol/l}$. In abnehmender Konzentration verhält es sich bei den Glycin-konjugierten GS: GCDCA Median 0,4 $\mu\text{mol/l}$ > GDCA Median 0,2 $\mu\text{mol/l}$ > GCA Median 0,1 $\mu\text{mol/l}$ > GUDCA Median 0,07 $\mu\text{mol/l}$ > GLCA Median 0,02 $\mu\text{mol/l}$. Die Taurin-konjugierten GS zeigen folgende Konstellation: TCDCA 0,1 $\mu\text{mol/l}$ > TCA Median 0,03 $\mu\text{mol/l}$ > TDCA 0,03 $\mu\text{mol/l}$ > TLCA 0,005 $\mu\text{mol/l}$ > TUDCA 0,004 $\mu\text{mol/l}$.

Die Mediane der absoluten und relativen Konzentrationen der GS sind in Tabelle 7 dargestellt.

	Kontrollgruppe	
	Median	
	Absolute Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Relative Konzentration (%)
Summe CA-Metaboliten	0,3	13,6
Summe CDCA-Metaboliten	0,7	40,2
Summe primäre GS	1,1	59,7
Summe DCA-Metaboliten	0,5	28,9
Summe LCA-Metaboliten	0,0	2,4
Summe sekundäre GS ohne UDCA	0,5	36,5
Summe UDCA-Metaboliten	0,2	7,8
Summe freie GS	0,6	42,7
Summe Glycin conj. GS	1,0	43,5
Summe Taurin conj. GS	0,2	11,3
Gesamtkonzentration der GS	1,8	

Tabelle 7: Absolute und relative GS-Konzentrationen bei Probanden mit unauffälligem GS-Profil (n=89).

Die Abbildung 10 dient zur Veranschaulichung der Verteilung der einzelnen GS im Profil.

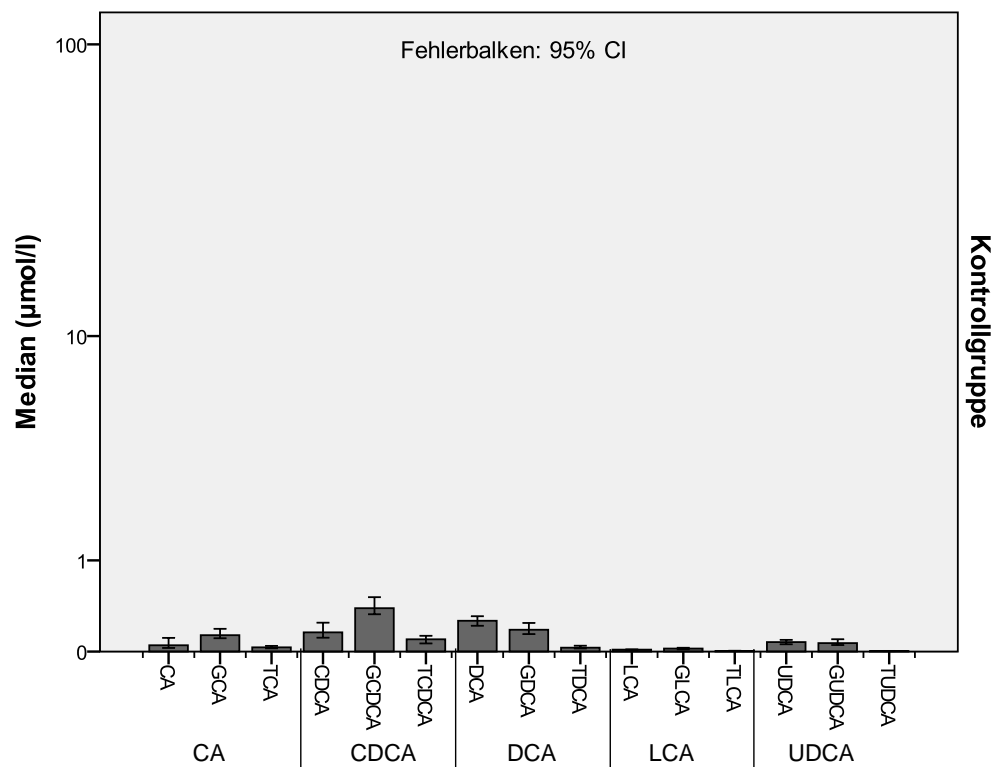


Abbildung 10: GS-Profil der Kontrollgruppe (n=89, Klinische Chemie, UKR Regensburg). Auf der x-Achse sind die verschiedenen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse). Der Fehlerbalken bildet graphisch den Bereich ab, in dem mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit der wahre Median liegt.

4.3 Gallensäure-Profil bei cholestatischen Erkrankungen

Als erstes wird die GS-Pool-Zusammensetzung bei GGA, der häufigsten obstruktiv-cholestatischen Erkrankung im Kindesalter, analysiert. Ohne UDCA-Substitution werden UDCA-Metaboliten kaum im GS-Profil nachgewiesen, siehe vorheriges Kapitel. Bei Patienten mit GGA wird aufgrund der oralen Zufuhr von UDCA ein Teil des GS-Pools durch UDCA-Metaboliten ersetzt ohne generell die Zusammensetzung der GS im GS-Profil zu verändern. Deshalb werden im Folgenden zur besseren Vergleichbarkeit die GS-Profile ohne UDCA-Metaboliten dargestellt.

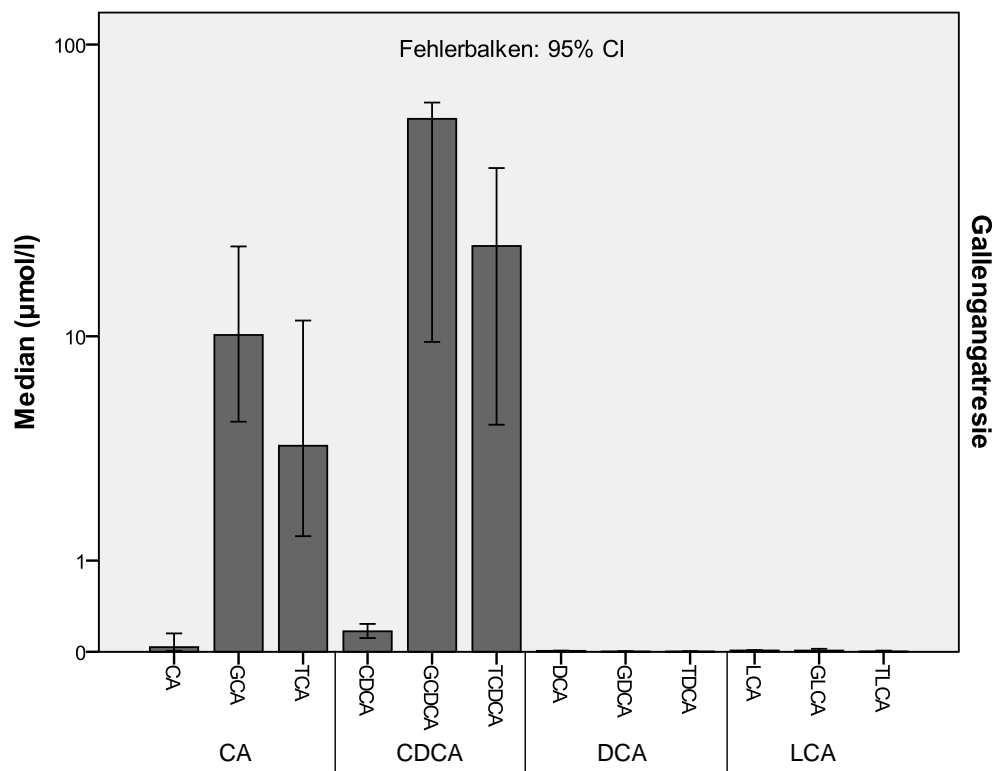


Abbildung 11: GS-Profil bei Patienten mit GGA (n=20). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Die Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten (mit der Einschränkung, dass UDCA aufgrund oraler Medikation abgezogen wurde) variiert von 22,4 bis 561,3 µmol/l (Median 272,6 µmol/l). Die Patienten mit GGA verfügen über einen hohen Anteil an konjugierten primären GS (Median 271 µmol/l) (Abbildung 11). Ebenso lässt sich nahezu ein Fehlen von sekundären GS feststellen (Median 2,0 µmol/l). Innerhalb der konjugierten primären GS wird deutlich, dass CDCA-Metaboliten höhere Konzentrationen im Vergleich zu den CA-Metaboliten einnehmen. In Bezug auf die

Konjugation sind kaum unkonjugierte GS (unter Berücksichtigung, dass die Gallensäure UDCA aufgrund oraler Zufuhr abgezogen wurde) in der GS-Zusammensetzung zu finden (Median 0,2 $\mu\text{mol/l}$). Die Glycin-Konjugate (Median 65,1 $\mu\text{mol/l}$) überwiegen deutlich im Vergleich zu den Taurin-Konjugaten (Median 26,1 $\mu\text{mol/l}$).

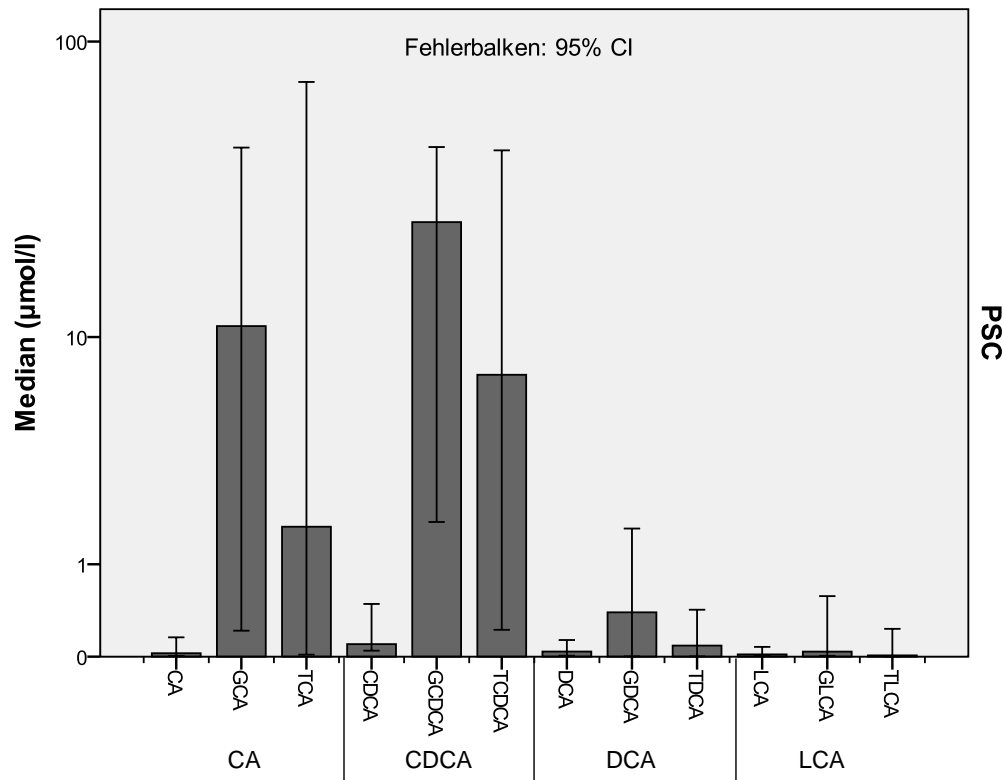


Abbildung 12: GS-Profil bei Patienten mit PSC (n=6). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Die Patienten mit PSC kennzeichnen sich ebenfalls durch deutlich erhöhte Konzentrationen der konjugierten primären GS aus (Abbildung 12). Sekundäre GS sowie unkonjugierte GS lassen sich in Spuren im GS-Profil nachweisen.

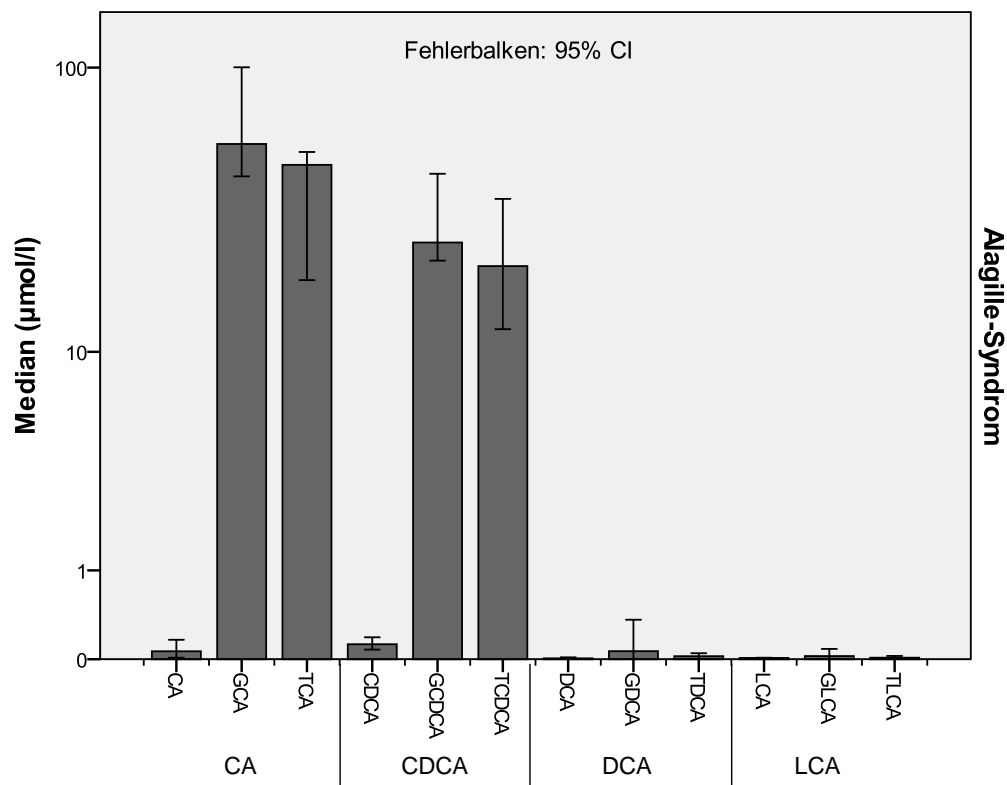


Abbildung 13: GS-Profil bei Patienten mit Alagille-Syndrom (n=15). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Bei Patienten mit AGS zeigt sich eine deutlich erhöhte Gesamtkonzentration der GS von 23,6 bis 499,0 µmol/l (Median 145,7 µmol/l) (Abbildung 13). Wiederum imponieren die deutliche Dominanz der konjugierten primären GS und ein Mangel an sekundären GS und unkonjugierten GS. Im Vergleich zu den GGA-Patienten findet sich ein höherer Anteil an CA-Metaboliten im Gegensatz zu CDCA-Metaboliten. Diese Zusammensetzung an GS im GS-Pool findet sich in ähnlicher Konstellation bei PFIC (Abbildung 14).

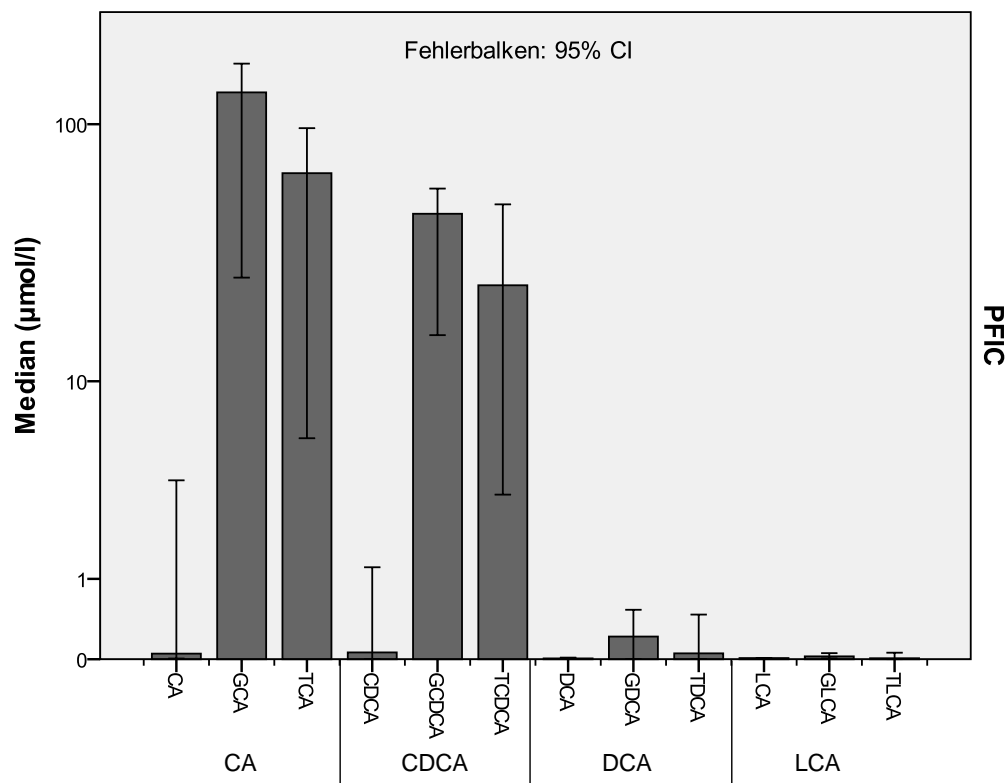


Abbildung 14: GS-Profil bei Patienten mit PFIC (n=6). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Die GS-Pool-Zusammensetzung bei Patienten mit PFIC stellt sich mit einem Überhang an konjugierten primären GS und einem deutlichen Fehlen von sekundären GS dar (Abbildung 14).

Nachdem nun die GS-Profile der cholestatischen Erkrankungen einzeln betrachtet wurden, wird nun untersucht, ob sich diese signifikant voneinander und zum Gesamtkollektiv unterscheiden. Durch die Abbildungen 11-14 und Tabelle 8 wird deutlich, dass Patienten mit AGS und PFIC eine ähnliche Verteilung im Hinblick auf die primären GS aufweisen, nämlich einen höheren Anteil an CA-Metaboliten im Vergleich zu CDCA-Metaboliten.

	GGA	PSC	AGS	PFIC
	Median			
	Absolute Konzentration (µmol/l)			
Summe CA-Metaboliten	12,8	12,7	83,9	199,9
Summe CDCA-Metaboliten	85,1	37,1	50,9	68,3
Summe primäre GS	110,0	55,9	144,1	268,2
Summe DCA-Metaboliten	0,0	0,5	0,2	0,1
Summe LCA-Metaboliten	0,0	0,1	0,1	0,0
Summe sekundäre GS ohne UDCA	0,0	0,6	0,3	0,1
Summe UDCA-Metaboliten	153,7	17,6	84,3	40,2
Summe freie GS	4,0	1,8	4,9	1,3
Summe Glycin conj. GS	182,5	93,7	157,9	185,4
Summe Taurin conj. GS	44,7	21,5	59,5	105,7
Gesamtkonzentration der GS	272,6	108,7	225,9	324,9
	Relative Konzentration (%)			
Relativer Anteil der CA-Metaboliten	10,6	13,8	48,3	57,9
Relativer Anteil der CDCA-Metaboliten	28,9	21,0	23,3	24,3
Relativer Anteil der DCA-Metaboliten	0,0	1,4	0,1	0,0
Relativer Anteil der LCA-Metaboliten	0,0	0,2	0,0	0,0
Relativer Anteil der UDCA-Metaboliten	56,8	64,1	27,5	15,8

Tabelle 8: Median der absoluten (in µmol/l) und relativen GS-Konzentrationen (in %) bei den cholestatischen Erkrankungen GGA (n=20), PSC (n=6), AGS (n=15) und PFIC (n=6).

In der univariaten Analyse wird die Verteilung dieser GS bezüglich Signifikanz geprüft. Bei Patienten mit AGS und PFIC finden sich signifikant höhere Konzentrationen von CA-Metaboliten im Verhältnis zu CDCA-Metaboliten im GS-Profil ($p < 0,001$). Die Diagnosen AGS und PFIC nehmen somit im untersuchten Gesamtkollektiv eine Sonderrolle ein: Wie die Abbildung 15 aufzeigt, weisen sie als einzige einen positiven Quotienten von CA- zu CDCA-Metaboliten auf.

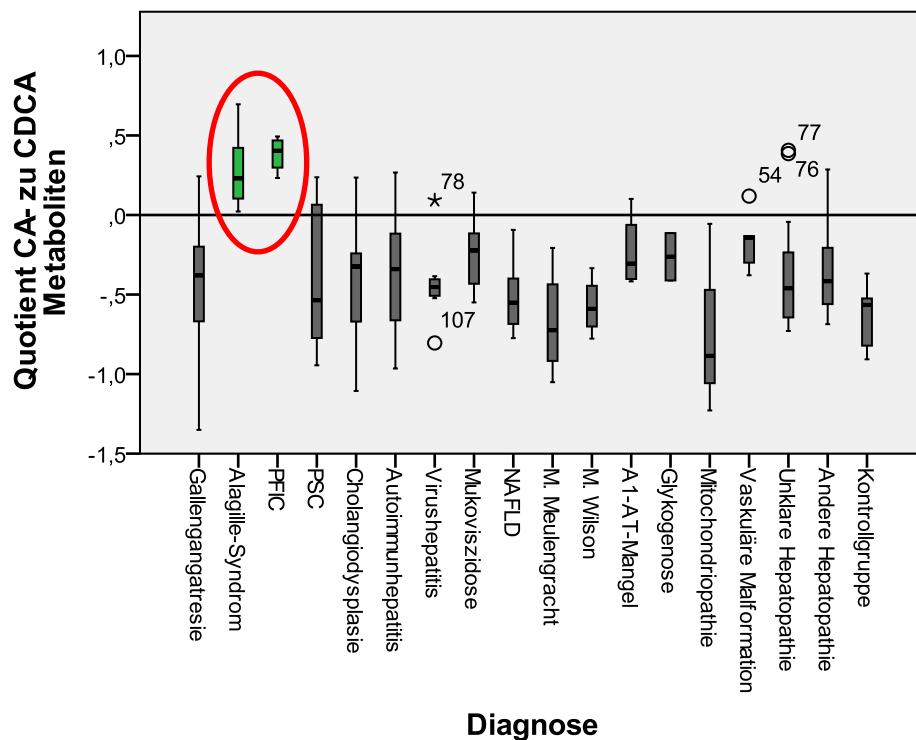


Abbildung 15: Box-and-Whiskers-Plots Quotient CA-Metaboliten zu CDCA-Metaboliten (logarithmiert) im Vergleich der einzelnen Diagnosen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Diagnosen aufgetragen. Auf der y-Achse die Box-and-Whiskers Plot des Quotienten CA-Metaboliten zu CDCA-Metaboliten (logarithmiert). Es fällt auf, dass die Diagnosen AGS und PFIC einen positiven Quotienten CA- zu CDCA-Metaboliten aufweisen (als roter Kreis markiert). Mögliche Ausreißer sind als Sterne und Punkte angegeben.

Um zu überprüfen, ob der Quotient von CA- zu CDCA-Metaboliten zur Trennung der Diagnosen herangezogen werden kann, findet die ROC-Analyse hier Anwendung.

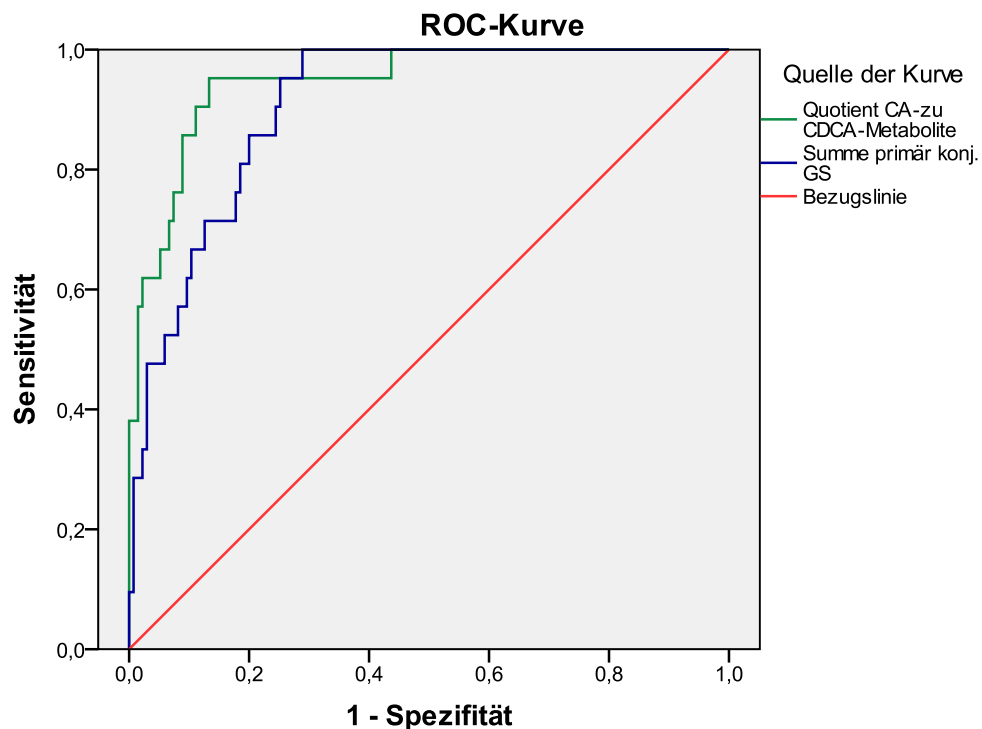


Abbildung 16: ROC-Analyse bei AGS und PFIC. Die ROC-Kurve wird für die Variablen Summe primär konj. GS und Quotient CA- zu CDCA-Metaboliten berechnet. Auf der x-Achse ist die (1-Spezifität), auf der y-Achse die Sensitivität für unterschiedliche Schwellenwerte eingezeichnet.

Variable(n) für Testergebnis	Fläche unter der Kurve				
	Fläche	Standardfehler	Asymptotische Signifikanz	Asymptotisches 95%	
				Untergrenze	Obergrenze
Quotient CA- zu CDCA-Metaboliten	0,95	0,02	0,00	0,90	0,99
Summe primär konj. GS	0,91	0,03	0,00	0,86	0,96

Tabelle 9: ROC-Analyse für die Variablen Summe primär konj. GS und Quotient CA- zu CDCA-Metaboliten. Entsprechend der Spalte Fläche zeigt sich, dass der Quotient CA- zu CDCA-Metaboliten (Fläche 0,95) zur Trennung AGS und PFIC von den anderen Diagnosen herangezogen werden kann.

Da der Flächenanteil der Diagnosetestvariable Quotient von CA- zu CDCA-Metaboliten nahe bei 1 liegt, gilt dies als sehr valides Ergebnis und bestätigt, dass dieser zur Trennung der Diagnosen sehr gut geeignet ist.

Die Patienten mit vorwiegend intrahepatischer Cholestase, wie PFIC und AGS lassen sich aufgrund des positiven Quotienten von CA- zu CDCA-Metaboliten von den anderen cholestatischen Erkrankungen und vom Gesamtkollektiv signifikant abgrenzen.

4.3.1 Besonderheiten bei den cholestatischen Erkrankungen

Innerhalb der Diagnosegruppe GGA werden nun die einzelnen GS-Profile der Patienten mit GGA (n=20) (Abbildung 17) betrachtet.

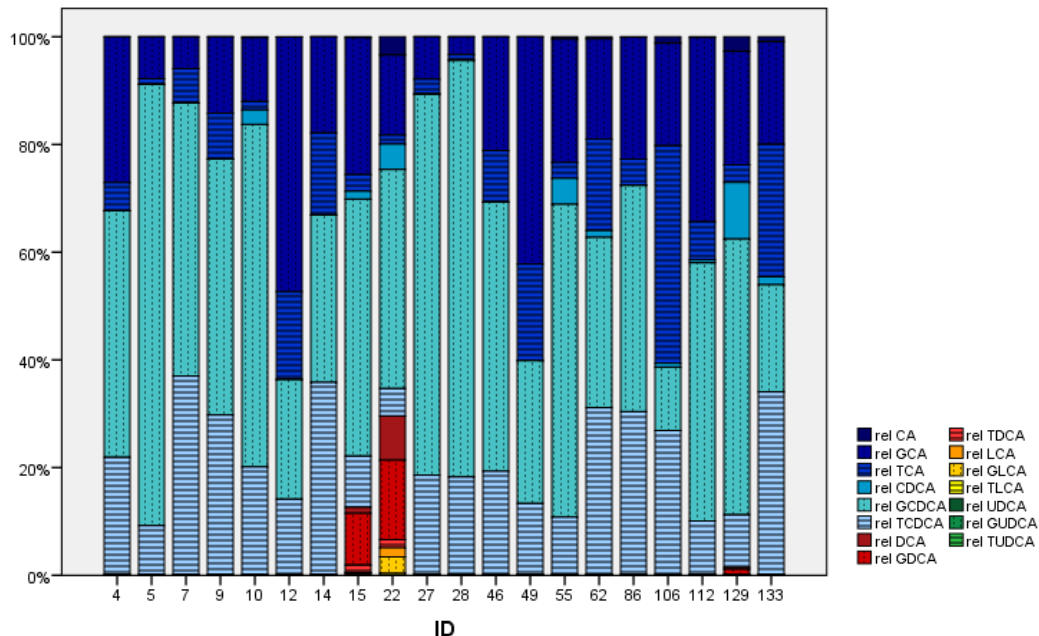


Abbildung 17: GS-Profil der GGA-Patienten (n=20). Auf der x-Achse sind die einzelnen Patienten mit GGA aufgetragen. Die y-Achse bildet die relativen GS-Konzentrationen in % ab.

Im GS-Profil imponiert eine deutliche Cholestase (Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten $> 100 \mu\text{mol/l}$) mit Erhöhung der konjugierten primären GS, Supprimierung der unkonjugierten primären GS und nahezu ein Fehlen an sekundären GS. Die Mehrzahl der Patienten (ID 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 27, 28, 46, 86, 106) zeigte klinisch, laborchemisch und histologisch eine deutliche Krankheitsprogression, die letztlich zur Lebertransplantation geführt hat (Abbildung 17).

Betrachtet man die GS-Profile der Patienten mit GGA fallen darüber hinaus zwei Besonderheiten auf.

Nach „erfolgreicher“ Kasai-Operation im Säuglingsalter (ID 15 und ID 22) entspricht die GS-Zusammensetzung von zwei Patienten nahezu dem der nicht-erkrankten Kontrollgruppe. Die Gesamtkonzentration der GS (ohne UDCA-Metaboliten) ist im Normbereich und es finden sich sowohl Metaboliten der primären als auch der sekundären GS.

Des Weiteren zeichnet sich eine Gruppe von Patienten mit GGA (ID 62, 112, 129, 133) bereits vor Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS $< 20 \mu\text{mol/l}$ (ohne UDCA-Metaboliten) mit den charakteristischen Veränderungen im GS-Profil und zwar mit einer Verschiebung zugunsten der konjugierten primären GS aus. Im Unterschied zu den anderen Patienten mit GGA sind im GS-Pool noch unkonjugierte primäre GS in Spuren nachweisbar.

Exemplarisch wird nun an einem Patient mit GGA die GS-Pool-Zusammensetzung im klinischen Verlauf zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten beurteilt (Abbildung 18).

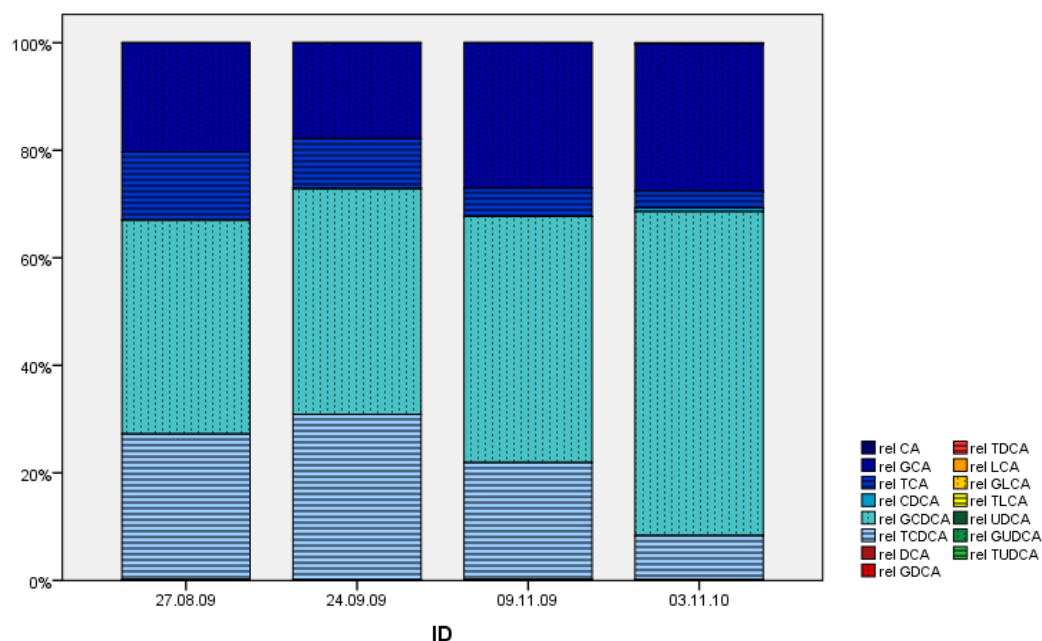


Abbildung 18: GS-Profil im zeitlichen Verlauf bei einem männlichen GGA-Patienten. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte angegeben. Die y-Achse bildet die relativen GS-Konzentrationen ab (in %). Eine erste Analyse der GS-Konzentrationen erfolgte im Alter von vier Monaten, Z. n. Kasai im Alter von 10 Wochen. Zeitnah nach Abnahme der GS am vierten Untersuchungstermin erfolgte die pädiatrische Lebertransplantation.

Innerhalb von mehreren Wochen findet sich im GS-Profil annähernd die gleiche Verteilung der GS-Metaboliten. Man erkennt eine deutliche Dominanz der konjugierten primären GS und nahezu ein absolutes Fehlen an unkonjugierten und sekundären GS.

4.3.2 Beziehung zwischen Cholestase-Parametern und Gallensäuren

Die Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS bei GS-Retention ist ausschließlich auf die erhöhten konjugierten primären GS zurückzuführen. Korreliert man diese beiden Variablen nach Spearman Rho, ergibt sich ein Korrelationskoeffizient in Höhe von $r = 0,99$ ($p < 0,001$), Abbildung 19.

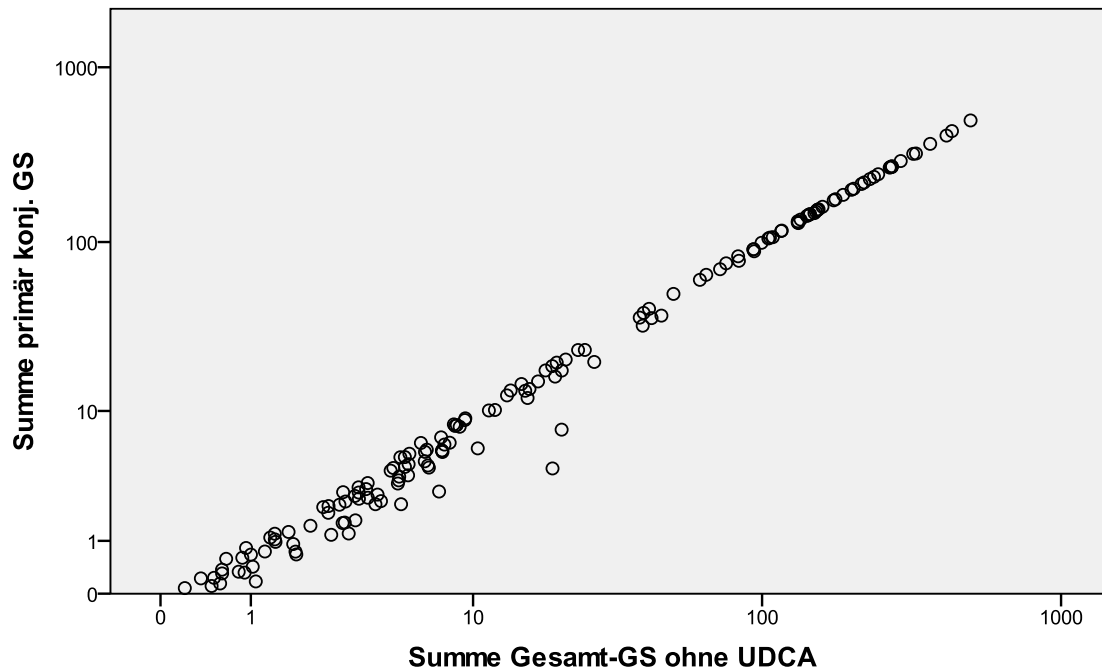


Abbildung 19: Streu-Punkt-Diagramm Summe primär konj. GS zu Gesamt-GS ohne UDCA-Metaboliten im Gesamtkollektiv (n=156). Auf der x-Achse ist die Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten (logarithmiert) aufgetragen. Auf der y-Achse die Summe der primär konjugierten GS (logarithmiert) aufgetragen.

In der Abbildung 19 wird deutlich, dass mit Zunahme der Gesamtkonzentration der GS die Streuung der Gesamtkonzentration der primär konjugierten GS abnimmt und fast linear verläuft.

In der klinischen Praxis werden zur Einschätzung einer Cholestase die Parameter Gamma-GT, AP, Gesamt-Bilirubin, direktes Bilirubin, Cholesterin und die Lipoproteine herangezogen. Da die Bestimmung von Gesamt-Cholesterin im Falle einer Hyperbilirubinämie gestört sein kann, wurde die Analyse um den Laborparameter LDL erweitert. Als Diagnosegruppe wähle ich die Patienten mit Gallengangatresie (n=20), der häufigsten pädiatrischen obstruktiv-cholestatischen Erkrankung, aus.

Korrelationen									
			Gamma-GT	AP	Gesamt-Bilirubin	Direktes Bilirubin	Cholesterin	LDL	Summe Gesamt-GS ohne UDCA
Spearman-Rho	Summe primär konj. GS	Korrelationskoeffizient	0,46	0,80	0,70	0,07	0,60	0,09	0,99
		Sig. (2-seitig)	0,05	0,00	0,00	0,83	0,01	0,77	0,00
		n	19,00	19,00	20,00	13,00	20,00	12,00	20,00

Tabelle 10: Korrelation der Cholestase-Parameter zu den GS.

Korreliert man den Parameter Cholesterin mit den konjugierten primären GS errechnet sich ein Korrelationskoeffizient nach Spearman Rho von $r=0,60$ ($p < 0,01$). Eine signifikant hohe Korrelation errechnet sich für AP $r=0,80$ ($p < 0,0001$) und Gesamt-Bilirubin $r=0,70$ ($p < 0,001$), wie Tabelle 10 verdeutlicht. Für LDL wird ein Koeffizient von $r=-0,09$ ($p < 0,77$) ausgewiesen.

Die Patienten mit Alagille-Syndrom nehmen aufgrund deutlich erhöhter Cholesterin-Konzentrationen eine besondere Rolle im untersuchten Patientenkollektiv ein. In einem Streu-/Punktdiagramm wird die Gesamtkonzentration der konjugierten primären GS gegen die Cholesterin-Konzentration aufgetragen (Abbildung 20).

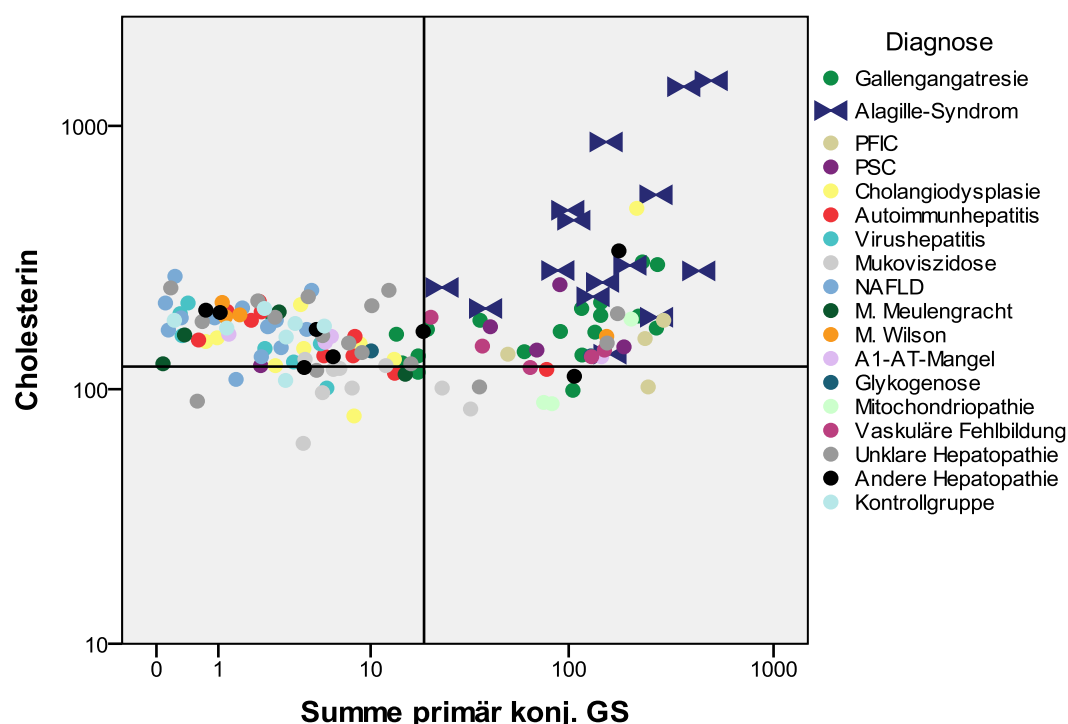


Abbildung 20: Streu-Punkt-Diagramm Cholesterin zu konj. primäre GS. Auf der x-Achse ist die Summe primär konj. GS ($\mu\text{mol/l}$, logarithmiert) der einzelnen Patienten entsprechend der jeweiligen Diagnose aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Konzentration an Cholesterin aufgetragen (mg/dl , logarithmiert).

Im untersuchten Patientenkollektiv zeigen Patienten mit AGS parallel eine Erhöhung der konjugierten primären GS und eine deutliche Erhöhung der Konzentrationen an Cholesterin.

4.4 Gallensäure-Profil bei hepatischen Stoffwechselerkrankungen

4.4.1 Zystische Fibrose

Nun wird untersucht, ob sich bei CF-Patienten mit Hepatopathie hinsichtlich der GS-Pool-Zusammensetzung charakteristische Veränderungen zeigen. Dazu werden die CF-Patienten (n=9) gegen die Patienten mit anderen Lebererkrankungen (n=149) und die nicht-erkrankte Kontrollgruppe (n=89) verglichen (Tabelle 11, Abbildung 21). Eine UDCA-Medikation erhalten alle CF-Patienten. Im Anhang finden sich die GS-Profile von drei CF-Patienten nach Durchführung einer pädiatrischen Lebertransplantation.

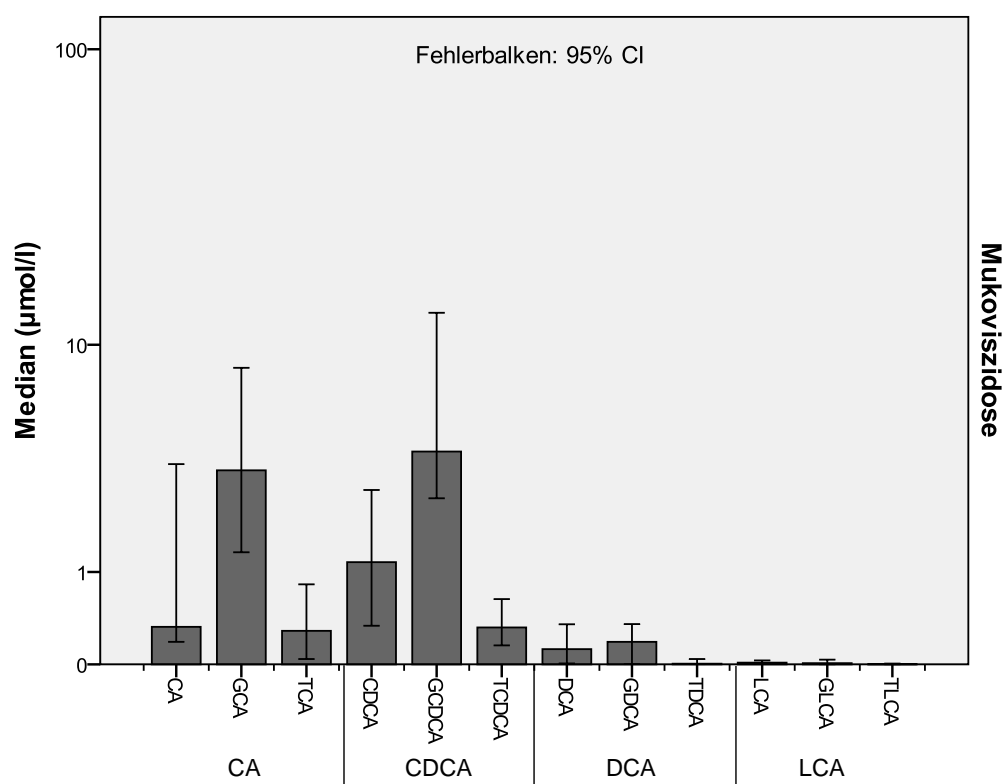


Abbildung 21: GS-Profil bei Patienten mit CF (n=9). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Die Gesamtkonzentration an GS variiert bei Patienten mit cystischer Fibrose von 12 bis 128 µmol/l (Median 36,5 µmol/l), davon entfallen auf die UDCA-Metaboliten Konzentrationen in Höhe von 6,7 bis 103 µmol/l (Median 27,5 µmol/l). Ohne UDCA-Metaboliten beträgt die Gesamtkonzentration der GS im Median 8,9 µmol/l. Somit ist die GS-Konzentration der GS gegenüber der nicht-erkrankten Kontrollgruppe (Median 1,8 µmol/l) erhöht ($p < 0,025$).

	Mukoviszidose	Cholestatische Erkrankungen	Entzündliche Erkrankungen	Hepatische Stoffwechselerkrankungen	Vaskuläre Malformationen der Leber	Cholangio-dysplastische Erkrankungen	NAFLD	Kontrollgruppe
	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median
Summe (CA+CDCA) (µmol/l)	1,5	0,2	0,3	0,2	1,2	0,2	0,3	0,1
Quotient primäre zu sekundäre GS ohne UDCA-Metaboliten (µmol/l)	70,4	1029,9	3,4	25,2	262,1	16,3	3,1	4,2
Quotient unkonj. zu konj. GS ohne UDCA-Metaboliten (µmol/l)	0,3	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1	0,5	0,1
Summe Glycinkonj. ohne UDCA-Metaboliten (µmol/l)	6,3	70,7	3,7	4,3	32,9	3,0	2,2	2,6
Summe Taurinkonj. ohne UDCA-Metaboliten (µmol/l)	0,4	32,2	0,5	1,6	42,3	0,4	0,2	0,5
Quotient Glycin- zu Taurinkonj. ohne UDCA-Metaboliten (µmol/l)	18,5	2,7	5,0	3,1	1,5	5,9	6,5	3,4
Gesamtkonzentration der GS (µmol/l)	36,5	187,4	8,3	12,1	132,6	19,3	3,7	4,5

Tabelle 11: Unterschiede der Diagnosegruppen hinsichtlich ausgewählter GS-Parameter. Die Tabelle verdeutlicht, dass die Patienten mit CF sich durch die Summe (CA+CDCA) und den Quotienten Glycin- zu Taurinkonj. (ohne UDCA) deutlich von den anderen Diagnosegruppen abgrenzen lassen.

Im Anschluss wurde die GS-Zusammensetzung hinsichtlich der Verteilung primärer zu sekundärer GS untersucht. Bei allen CF-Patienten lassen sich sekundäre GS nur in sehr niedrigen Konzentrationen von 0,02 bis 0,67 µmol/l (Median 0,16 µmol/l) nachweisen. Vier der CF-Patienten haben Konzentrationen unter der Nachweisgrenze und zwar unter 0,03 µmol/l. Der Mangel an sekundären GS bei CF-Patienten ist signifikant unterschiedlich zur nicht-erkrankten Kontrollgruppe (Median 0,57 µmol/l) ($p < 0,002$). Im untersuchten Kollektiv zeigen nur Patienten mit vorwiegend cholestatischer Komponente ebenfalls einen Mangel an sekundären GS (Median 0,08 µmol/l) und unterscheiden sich nicht signifikant von den CF-Patienten ($p < 0,83$).

Interpretiert man die GS-Zusammensetzung bei CF-Patienten bezüglich des Anteils unkonjugierter und konjugierter GS ergeben sich folgende Auffälligkeiten. Bei Betrachtung der absoluten Konzentrationen an unkonj. GS wird deutlich, dass die primären unkonjugierten GS den höchsten Anteil an unkonjugierten GS einnehmen (siehe Tabelle 11). Dies trifft im untersuchten Kollektiv nur für Patienten mit CF zu.

Die Gesamtkonzentration der primären unkonj. GS reicht von 0,96 bis 15 $\mu\text{mol/l}$ (Median 1,5 $\mu\text{mol/l}$), dabei nimmt die GS CDCA einen deutlich höheren Anteil als CA ein. Bei nicht-erkrankten Patienten dominiert unter den unkonj. GS die sekundäre GS DCA, welche bei CF kaum nachweisbar ist (Median 0,05 $\mu\text{mol/l}$).

Bei Patienten mit CF zeigt sich im GS-Pool eine Verminderung der Konzentration an Taurin-Konjugaten in der GS-Zusammensetzung. Sekundäre Taurin-konjugierte GS fehlen nahezu vollständig im GS-Pool und die relativen Anteile an TCA und TCDCA sind im Vergleich zu allen anderen Diagnosen und der nicht-erkrankten Kontrollgruppe auf einem höchst signifikant niedrigeren Niveau ($p < 0,001$).

Zur Verdeutlichung der bisher festgestellten Unterschiede wird ein Streu-Punkt-Diagramm (Abbildung 22) herangezogen.

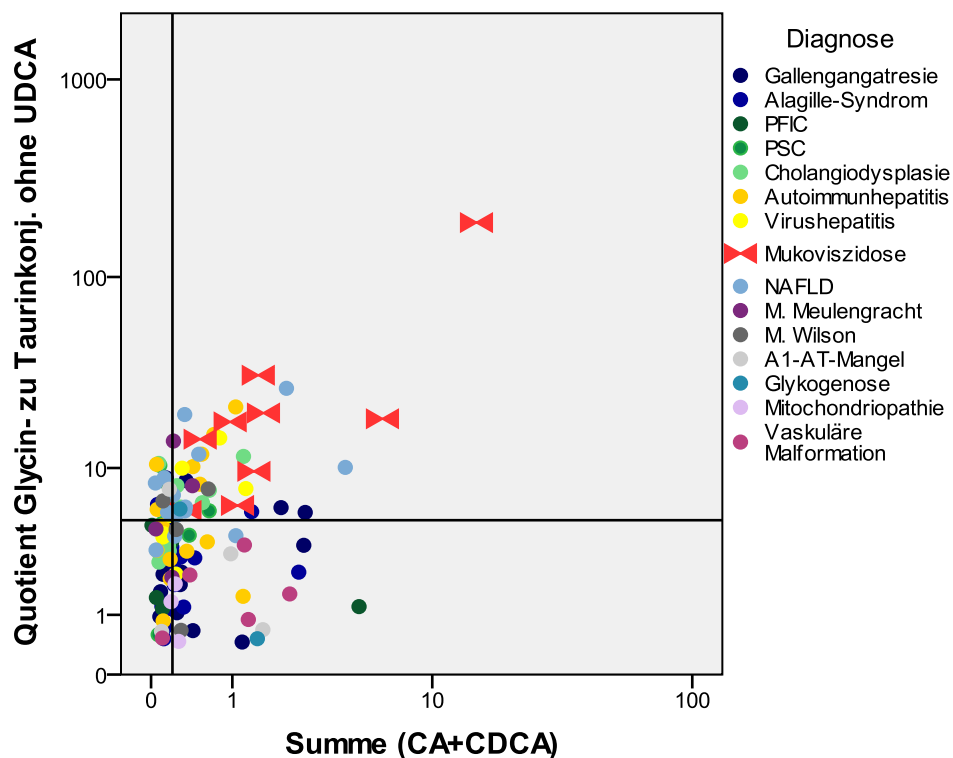


Abbildung 22: Streu-Punkt-Diagramm Summe (CA+CDCA) zu Quotient Glycin-/Taurin conj. GS. Auf der x-Achse ist die Summe (CA+CDCA) ($\mu\text{mol/l}$, logarithmiert) entsprechend der jeweiligen Diagnose aufgetragen. Auf der y-Achse ist der Quotient Glycin-/Taurin conj. GS ($\mu\text{mol/l}$, logarithmiert) aufgetragen.

Die Patienten mit CF können im untersuchten Kollektiv durch zwei Aussagen eindeutig klassifiziert werden:

Zum einen zeigen sie einen hohen Anteil an unkonjugierten primären GS (CA, CDCA), zum anderen weisen sie einen deutlichen Mangel an Taurin-konjugierten GS auf, was sich wiederum in einem deutlich erhöhten Quotienten von Glycin zu Taurin konjugierten GS (ohne UDCA-Metaboliten) widerspiegelt.

Die ROC-Analyse verdeutlicht, welche Parameter einen hohen Beitrag zur Unterscheidung der CF-Patienten von den anderen Patientengruppen leisten. In der Abbildung 23 ist die ROC-Kurvendarstellung zu sehen. Die Kurve des Quotienten Glycin-zu Taurinkonj. GS (ohne UDCA) beginnt weit oben und strebt nach rechts, was ein Zeichen für eine sehr gute Testgenauigkeit ist. Die Tabelle 12 bestätigt diese Aussage, der Parameter Quotient Glycin-zu Taurinkonj. GS (ohne UDCA) nimmt mit 0,94 den größten Flächenanteil ein.

Fläche unter der Kurve					
Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Standardfehler	Asymptotische Signifikanz	Asymptotisches 95%	
				Untergrenze	Obergrenze
Quotient Glycin- zu Taurinkonj. GS ohne UDCA	0,94	0,04	0,00	0,87	1,00
Summe (CA+CDCA)	0,92	0,03	0,00	0,87	0,98
Summe freie GS ohne UDCA	0,90	0,04	0,00	0,83	0,97
Quotient freie zu konj. GS ohne UDCA	0,76	0,06	0,02	0,64	0,87
Quotient primäre zu sekundäre GS ohne UDCA	0,58	0,06	0,46	0,46	0,71

Tabelle 12: ROC-Analyse für die Variablen Quotient Glycin- zu Taurinkonj. ohne UDCA, Summe (CA+CDCA), Summe unkonjugierte GS ohne UDCA, Quotient freie zu konj. GS ohne UDCA, Quotient primäre zu sek. GS ohne UDCA. Entsprechend der Spalte Fläche zeigt sich, dass die Parameter Quotient Glycin- zu Taurinkonj. ohne UDCA sowie Summe (CA+CDCA) zur Unterscheidung CF von den anderen Diagnosen herangezogen werden kann.

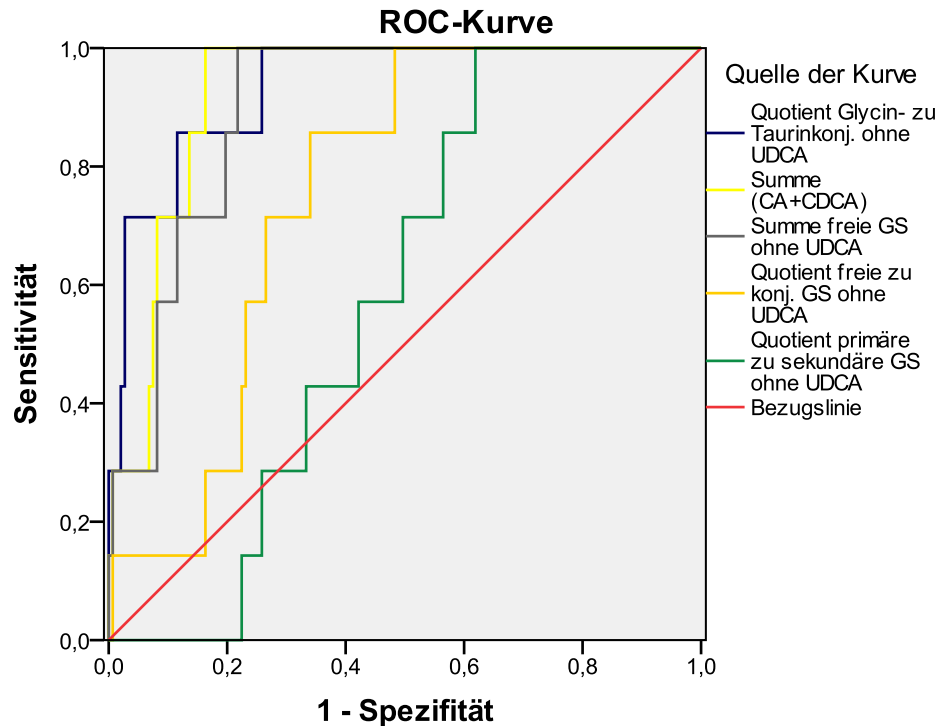


Abbildung 23: ROC-Analyse bei CF. Die ROC-Kurve wird für die Variablen Quotient Glycin- zu Taurinkonj. ohne UDCA, Summe (CA+CDCA), Summe unkonjugierte GS ohne UDCA, Quotient freie zu konj. GS ohne UDCA, Quotient primäre zu sek. GS ohne UDCA berechnet. Auf der x-Achse ist die (1-Spezifität), auf der y-Achse die Sensitivität für unterschiedliche Schwellenwerte eingezeichnet.

Neben den Auffälligkeiten in der GS-Pool-Zusammensetzung werden nun auch andere biochemische Parameter betrachtet.

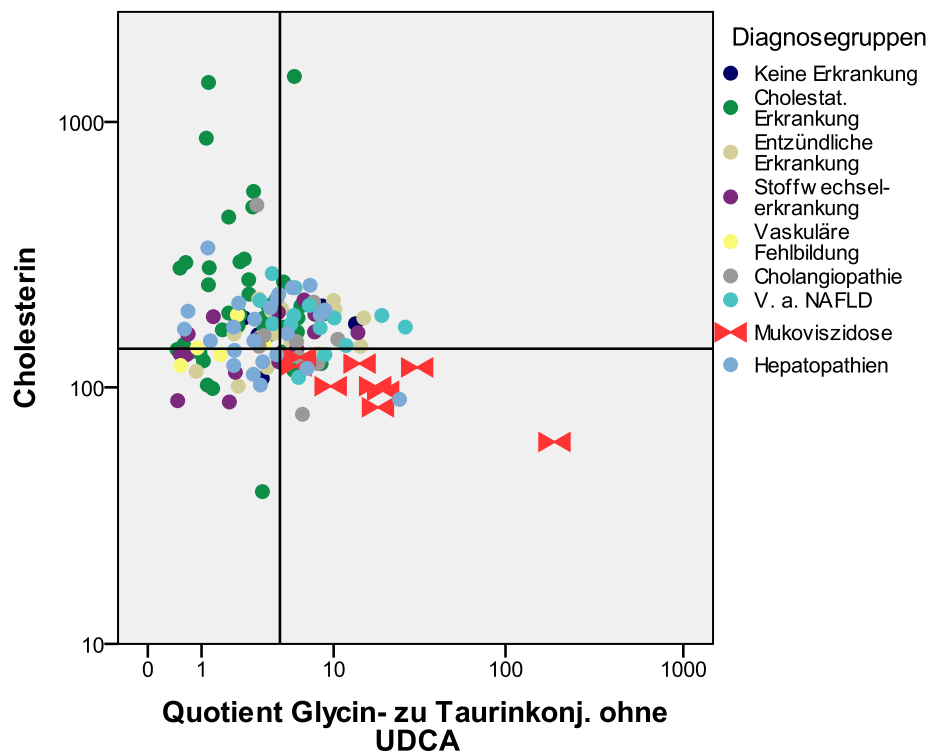


Abbildung 24: Streu-/Punktdiagramm Cholesterin zu Quotient Glycin-/Taurinkonj. Auf der x-Achse ist der Quotient Glycin-/Taurin konj. GS ($\mu\text{mol/l}$, logarithmiert) aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Konzentration an Cholesterin (mg/dl, logarithmiert) der einzelnen Patienten entsprechend der jeweiligen Diagnose aufgetragen.

Die CF-Patienten klassifizieren sich durch sehr niedrige Cholesterin-Werte und können deutlich von den anderen Diagnosegruppen abgegrenzt werden (Abbildung 24).

4.4.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

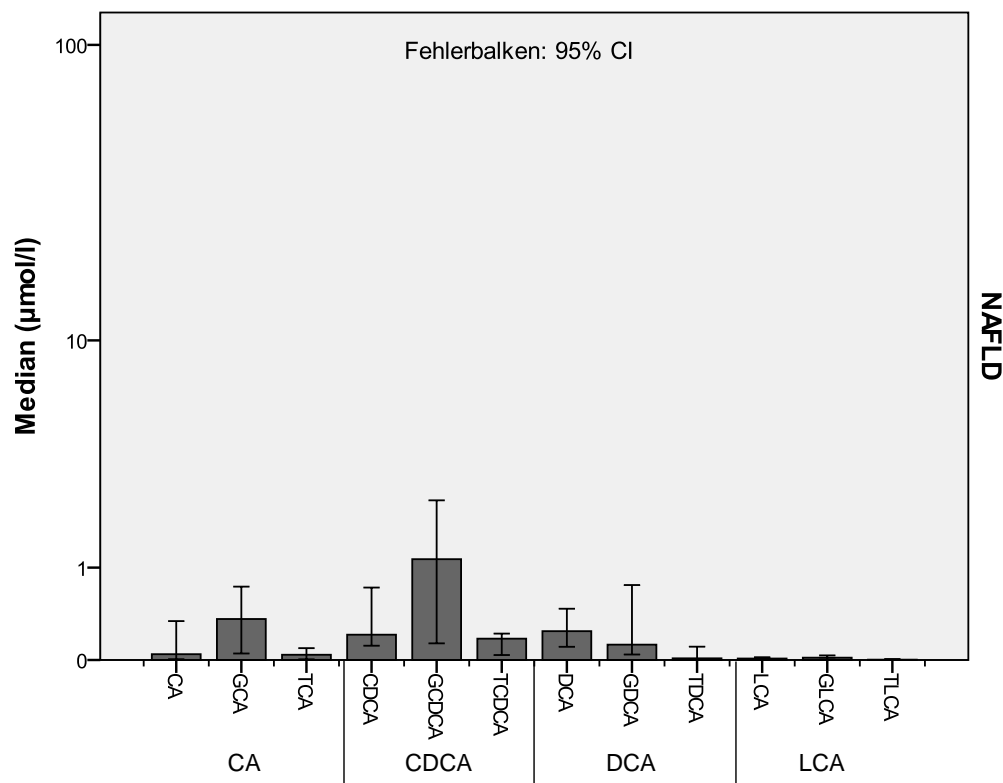


Abbildung 25: GS-Profil bei Patienten mit NAFLD (n=14). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Die Gesamtkonzentration an GS beträgt 0,51 bis 7,8 µmol/l, wobei nur ein einzelner Patient eine Gesamtkonzentration > 6 µmol/l aufweist. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führt die Erkrankung im untersuchten Kollektiv (n=14) nicht zu einer relevanten Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS (p = 0,30).

In Bezug auf die Verteilung primäre zu sekundäre GS im GS-Profil nehmen CDCA- und DCA-Metaboliten bereits die Hälfte der GS in der GS-Pool-Zusammensetzung ein, während sich der Rest auf CA-, LCA- und UDCA-Metaboliten verteilt, wobei die primären im Vergleich zu den sekundären GS überwiegen. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen NAFLD und Leber-Gesunden sowohl bei den absoluten als auch bei den relativen Konzentrationen der einzelnen GS. Stellt man Patienten mit nicht-alkoholischer Steatose bezüglich der Konjugation der Kontrollgruppe gegenüber, finden sich ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Werte bei den absoluten und relativen Konzentrationen der unkonjugierten sowie Glycin- und Taurin-konjugierten GS.

4.5 Gallensäure-Profil bei entzündlichen Erkrankungen der Leber

Die Diagnosen Hepatitis B (n=1) und C (n=6) werden unter der Gruppe Virushepatitis zusammengefasst (Abbildung 26).

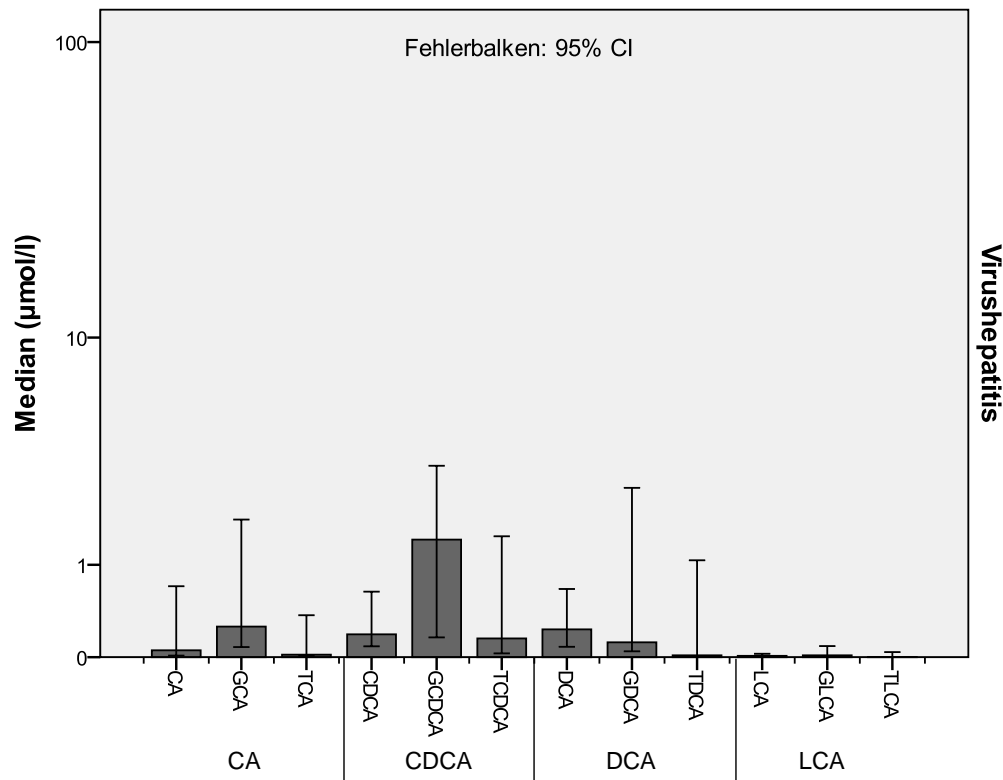


Abbildung 26: GS-Profil bei Patienten mit Virushepatitis (n=7). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Die Gesamtkonzentration der GS beträgt im Median 5,4 µmol/l, was im Vergleich zur Kontrollgruppe diskret erhöht ist (Median 1,8 µmol/l). Bei Betrachtung der Verteilung der GS zeigen sich gering erhöhte Konzentrationen bei den konjugierten GS und zwar den CA-, CDCA- und DCA-Metaboliten. Es stellen sich in der GS-Zusammensetzung im Vergleich zur nicht-erkrankten Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede heraus.

Die Diagnosegruppe Autoimmunhepatitis umfasst 15 Patienten (Abbildung 27). Bei sechs Patienten wird eine Therapie mit UDCA durchgeführt.

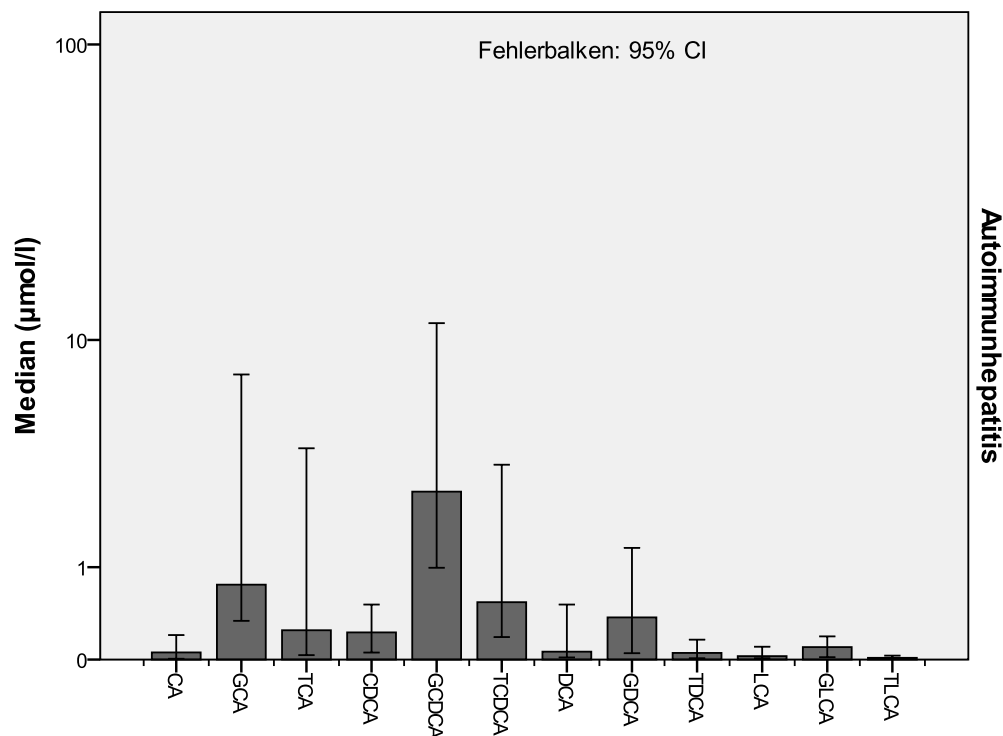


Abbildung 27: GS-Profil bei Patienten mit Autoimmunhepatitis (n=15). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

In der Betrachtung der einzelnen GS-Profile der Patienten ergibt sich ein inhomogenes Bild.

Sechs Patienten (ID 2, 11, 100, 103, 113, 135) haben keine erhöhten GS und keine Veränderungen in der GS-Pool-Zusammensetzung. Die GS-Profile dieser Patienten entsprechen GS-Konzentrationen von Leber-Gesunden. Drei Patienten (ID 74, 124, 136) zeigen eine erhöhte Gesamtkonzentration der GS $> 80 \mu\text{mol/l}$ und eine Erhöhung der konjugierten primären GS. Bei zwei Patienten (ID 74, 124) lassen sich trotz erhöhter Gesamtkonzentration der GS noch Konzentrationen von sekundären GS ($\sim 6 \mu\text{mol/l}$) nachweisen. Ohne Erhöhung der Gesamtkonzentration fällt bei drei Patienten (ID 18, 97, 123) eine GS-Verteilung zugunsten der konjugierten primären GS mit nahezu einem Fehlen an sekundären GS auf. Hinsichtlich der Krankheitsaktivität gemessen an erhöhten Transaminasen (GOT $> 50 \text{ U/l}$, GPT $> 50 \text{ U/l}$) (ID 2, 97, 136) lässt sich kein Zusammenhang mit der Erhöhung bestimmter (toxischer) GS nachweisen.

4.6 Gallensäure-Profil bei vaskulären Malformationen der Leber

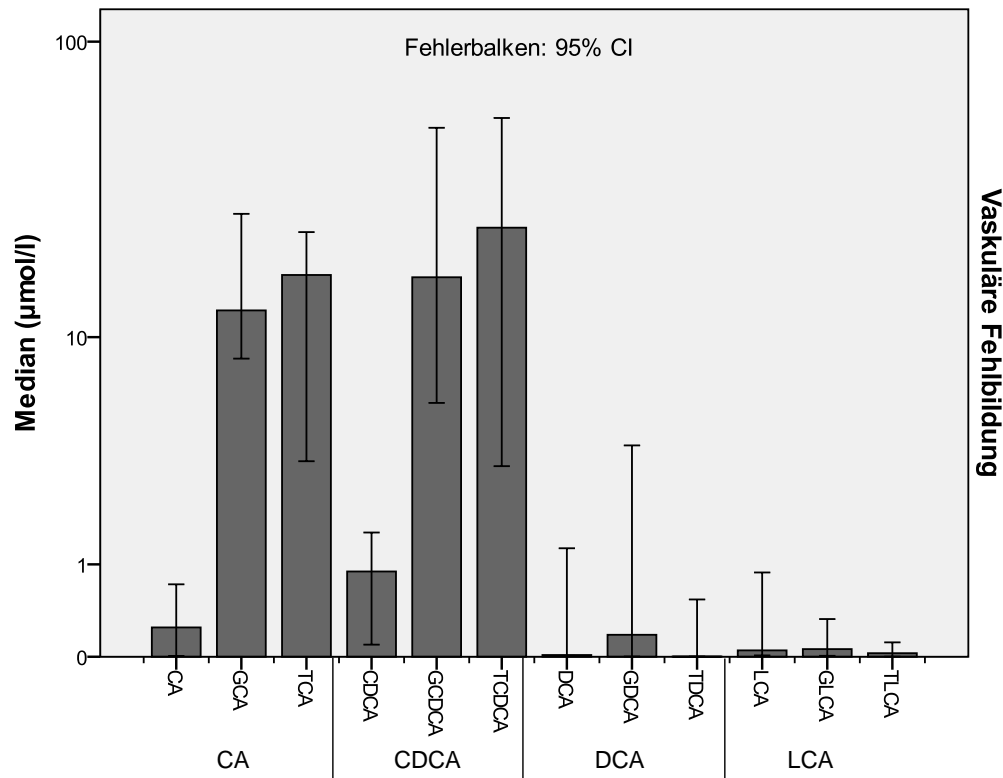


Abbildung 28: GS-Profil bei Patienten mit vaskulärer Malformation der Leber (n=5). Auf der x-Achse sind die einzelnen GS aufgetragen. Die Höhe der Balken entspricht den logarithmierten Medianen der GS (y-Achse).

Fünf Patienten haben eine vaskuläre Malformation der Leber mit portosystemischem Shunt (sog. Abernethy-Syndrom, Abbildung 28). Bei der Analyse der GS-Profile weisen die Erkrankten eine GS-Gesamtkonzentration in Höhe von 21,6 µmol/l bis 174,3 µmol/l aus (Median 132,6 µmol/l). Hinsichtlich der Verteilung von primären zu sekundären GS stellt sich eine Dominanz der primären GS dar (Median 64,8 µmol/l). Die Erhöhung der primären GS ist vor allem auf die Zunahme der konjugierten primären GS zurückzuführen. Sekundäre GS lassen sich nur in geringen Konzentrationen nachweisen. Ein Patient (ID 84) nimmt im Vergleich zu den anderen Patienten eine Sonderrolle ein. Er weist im Vergleich zu allen anderen Diagnosen die höchste Konzentration an sekundären GS auf (7,0 µmol/l).

4.7 Einfluss der Nüchternheit auf das Gallensäure-Profil

Da der Metabolismus der GS von der Einnahme von Mahlzeiten abhängig ist, ist die Einhaltung einer Nüchternzeit angeraten. Im Hinblick auf das sehr junge Patientenalter im untersuchten Patientenkollektiv war dies in der Praxis schwierig umzusetzen. Exemplarisch werden die GS-Profile von zwei Patienten an verschiedenen Untersuchungszeitpunkten mit unterschiedlicher Einhaltung einer Nüchternphase bewertet.

Der Patient mit AGS war an zwei von fünf Untersuchungszeitpunkten mit acht bzw. neun Stunden nüchtern (Abbildung 29). Bei Einhaltung der Nüchternzeit liegt die Gesamtkonzentrationen der GS jeweils bei 157 $\mu\text{mol/l}$ und 106 $\mu\text{mol/l}$ ohne UDCA-Metaboliten. An den drei nicht-nüchtern Terminen weist der Patient hinsichtlich der Gesamtkonzentration der GS einen Median von 148,8 $\mu\text{mol/l}$ auf. Unabhängig von der Nüchternzeit fällt an jedem Untersuchungszeitpunkt deutlich ein Überhang an konjugierten primären GS und ein Fehlen von sekundären GS auf. Die einzelnen absoluten und relativen Konzentrationen der GS variieren gering.

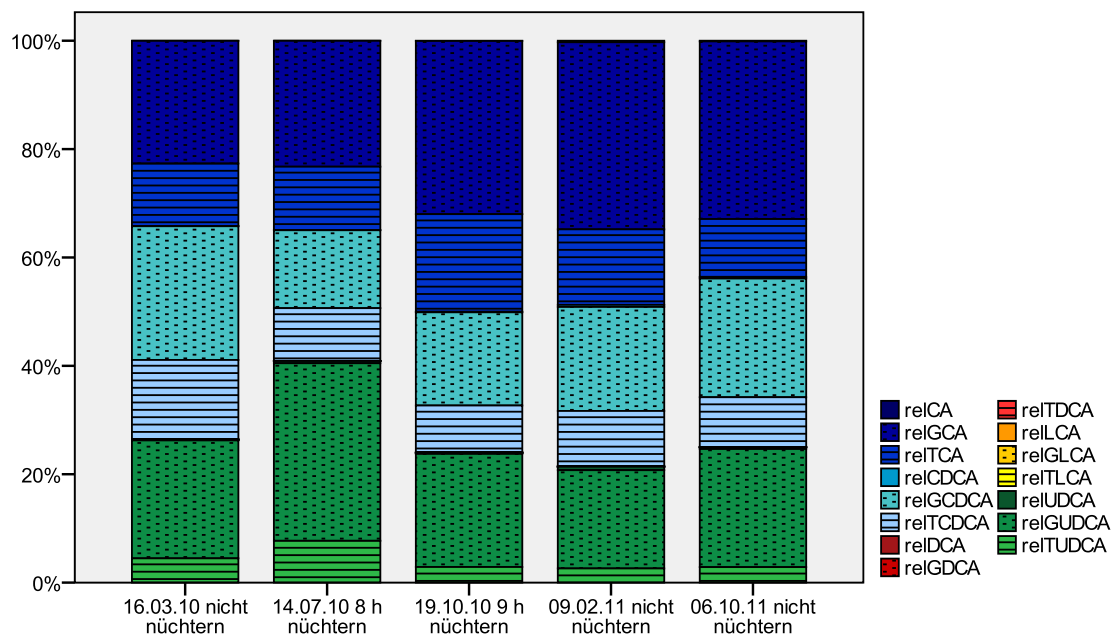


Abbildung 29: Die Abbildung zeigt die GS-Profile eines Patienten mit AGS, bei dem eine Abnahme der GS an fünf Untersuchungszeitpunkten (siehe x-Achse) erfolgte. An zwei Terminen wurde eine Nüchternzeit von acht bzw. neun Stunden eingehalten. Auf der y-Achse sind die relativen GS-Konzentrationen aufgetragen.

Der Patient mit NAFLD erschien zu zwei Terminen in der pädiatrischen hepatologischen Ambulanz (Abbildung 30). Bei der zweiten ambulanten Vorstellung wurde der Patient darauf hingewiesen, eine Zeit von acht Stunden Nüchternheit einzuhalten. Bei der Analyse der GS-Profile ergeben sich im Vergleich der Untersuchungszeitpunkte geringe Unterschiede der GS-Konzentrationen. Die Konzentrationen der GS liegen an beiden Untersuchungszeitpunkten im Normbereich.

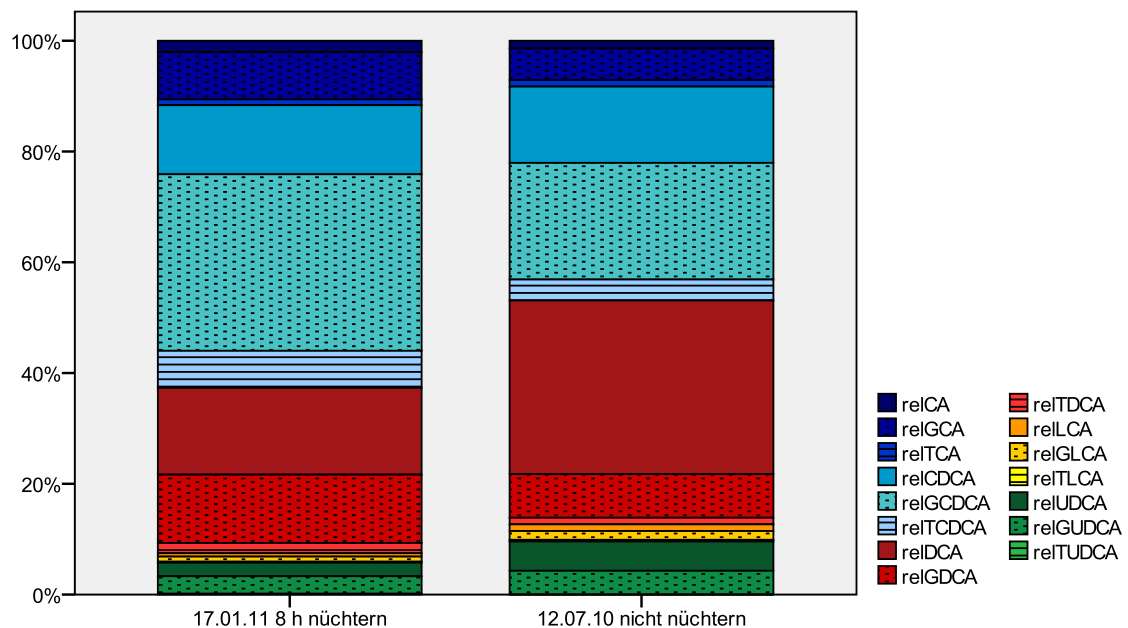


Abbildung 30: Die Abbildung zeigt die GS-Profile eines Patienten mit NAFLD ohne/mit Einhaltung einer Nüchternzeit von acht Stunden. Auf der y-Achse sind die relativen GS-Konzentrationen aufgetragen.

4.8 Veränderungen im Gallensäure-Profil unter der Therapie mit Ursodeoxycholsäure

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden 68 Patienten mit UDCA therapiert. Die mittlere Tagesdosis betrug $20,6 \pm 4,7$ mg/kg KG.

Die Medikation mit UDCA kam bei folgenden Erkrankungen zum Einsatz: GA (n=18), Alagille-Syndrom (n=11), CF (n=9), Cholangiodysplastische Erkrankungen (n=8), AIH (n=6), PSC (n=4), Sonstige Hepatopathien (n=4), PFIC (n=4), α 1-AT-Mangel (n=2), Vaskuläre Malformationen der Leber (n=1) und Mitochondriopathie (n= 1).

Die Tabelle 13 und Abbildung 31 weisen die deskriptiven Parameter der UDCA-Medikation aus.

UDCA-Dosis (mg/kgKG/d)	
Mittelwert	20,6
Median	21,1
Standardabweichung	4,7
Minimum	11,2
Maximum	33,3

Tabelle 13: Deskriptive Parameter UDCA-Medikation

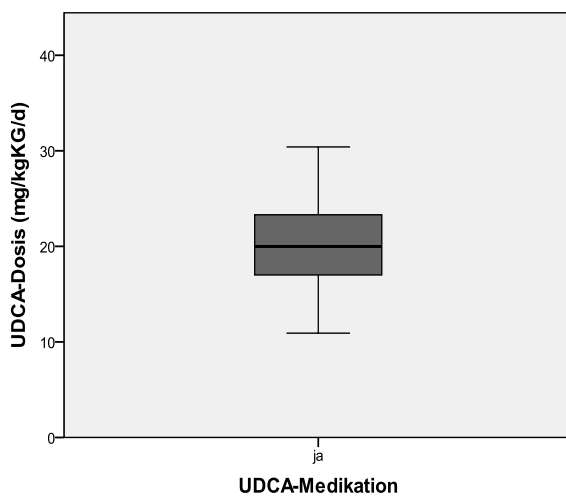


Abbildung 31: Box-and Whisker-Plot UDCA-Medikation. Anhand der Abbildung lässt sich der Median sowie die 25. und 75. Perzentile ablesen. Die Whisker geben die 10. und 90. Perzentile an.

Der Großteil der Patienten war bei Studieneinschluss bereits mit UDCA therapiert, so dass nur bei einem männlichen Patienten mit Alagille-Syndrom (Alter bei Therapiebeginn: 57 Monate) ein Vergleich der GS-Pool-Zusammensetzung vor und nach oraler Einnahme mit Ursodeoxycholsäure vorgenommen werden konnte (Abbildung 32, Tabelle 14). Die Therapie wurde am 06.09.2010 begonnen, die Abnahme des GS-Profiles fand am 31.01.2011 statt. Der Patient erhielt eine gewichtsbezogene UDCA-Tagesdosis von 30,0 mg/kg KG.

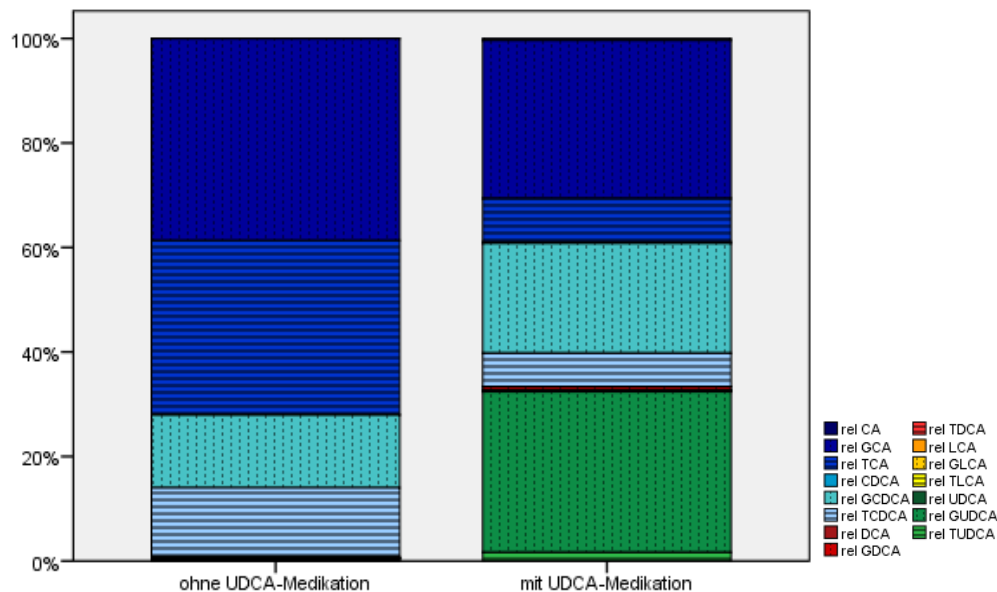


Abbildung 32: GS-Profil eines Patienten mit AGS vor und nach Gabe von UDCA. Auf der y-Achse sind die relativen GS-Konzentrationen (in %) aufgetragen. Unter der Einnahme von UDCA kommt es zu einer deutlichen Zunahme der UDCA-Metaboliten im GS-Profil.

Vor Therapiebeginn mit UDCA beträgt die Gesamtkonzentration der GS 153,8 $\mu\text{mol/l}$. Im GS-Profil dominieren die konjugierten primären GS, wohingegen sekundäre GS und UDCA-Metaboliten nur einen sehr geringen Anteil einnehmen.

	UDCA-Medikation		UDCA-Medikation	
	nein	ja	nein	ja
	Absolute Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)		Relative Konzentration (%)	
Summe CA-Metaboliten	110,8	61,9	72,0	38,9
Summe CDCA-Metaboliten	41,9	44,1	27,3	27,7
Summe DCA-Metaboliten	0,3	1,1	0,2	0,7
Summe LCA-Metaboliten	0,0	0,0	0,0	0,0
Summe UDCA-Metaboliten	0,8	51,9	0,5	32,6
Gesamtkonzentration der GS	153,8	159,0		

Tabelle 14: Absolute und relative Konzentrationen der GS vor und nach UDCA-Medikation bei einem Patienten mit AGS (n=1)

Unter der Behandlung mit UDCA kommt es zu einer deutlichen Zunahme des relativen UDCA-Anteils auf 32,6% ohne kompensatorische Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS, da sich die absolute Konzentration der primären GS in Höhe von 152,7 auf 106 $\mu\text{mol/l}$ reduziert hat. Hinsichtlich der Konzentrationsveränderungen von sekundären GS im Serum lassen sich nur geringe Unterschiede nachweisen.

Für die Diagnose Gallengangatresie (n=20) wird nun exemplarisch aufgeführt, wie sich eine Behandlung mit Ursodeoxycholsäure (n=18) im GS-Profil darstellen lässt. Zwei Patienten (ID 7 und 105) erhielten keine UDCA-Medikation (Tabelle 15, Abbildung 33).

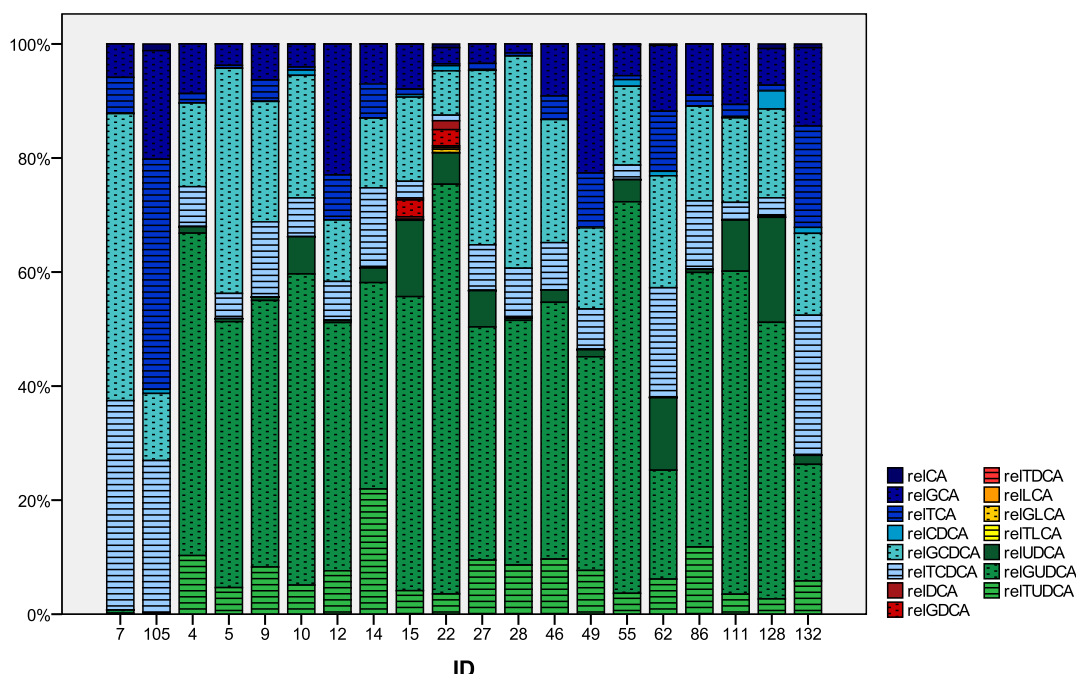


Abbildung 33: Patienten mit GGA (n=20); Zwei Patienten erhalten keine UDCA-Medikation (ID 7 und 105). Die Abbildung veranschaulicht die Anreicherung der UDCA-Metaboliten im GS-Profil unter oraler Gabe von UDCA (n=18). Auf der x-Achse sind die einzelnen Patienten aufgetragen. Die y-Achse zeigt die relativen Konzentrationen der einzelnen GS.

Auch hier präsentiert sich im Vergleich zu den nicht UDCA-therapierten Patienten eine deutliche Anreicherung von UDCA-Metaboliten im GS-Profil.

	UDCA - Medikation		UDCA - Medikation	
	nein	ja	nein	ja
	Absolute Konzentration Median ($\mu\text{mol/l}$)		Relative Konzentration Median (%)	
Summe CA-Metaboliten	25,1	12,5	36,3	10,2
Summe CDCA-Metaboliten	58,2	85,1	63,2	27,5
Summe DCA-Metaboliten	0,0	0,0	0,0	0,0
Summe LCA-Metaboliten	0,0	0,0	0,0	0,0
Summe UDCA-Metaboliten	0,4	161,9	0,4	58,6
Gesamtkonzentration der GS	83,7	286,7		

Tabelle 15: Patienten mit GGA (n=20), mit und ohne UDCA-Medikation

Wie aus den bisherigen Ergebnissen deutlich wurde, geht die Medikation mit UDCA mit einer deutlichen UDCA-Anreicherung im Blut-GS-Profil einher. Korreliert man die

UDCA-Tagesdosis mit der absoluten Konzentration der UDCA-Metaboliten, errechnet sich eine sehr geringe Korrelation in Höhe von $r = 0,05$ nach Spearman Rho ($p < 0,7$). Es lässt sich schlussfolgern, dass eine höhere Dosis der verabreichten UDCA-Medikation nicht zwingend mit einer Zunahme der Konzentrationen an UDCA-Metaboliten in der GS-Zusammensetzung verbunden ist (Abbildung 34).

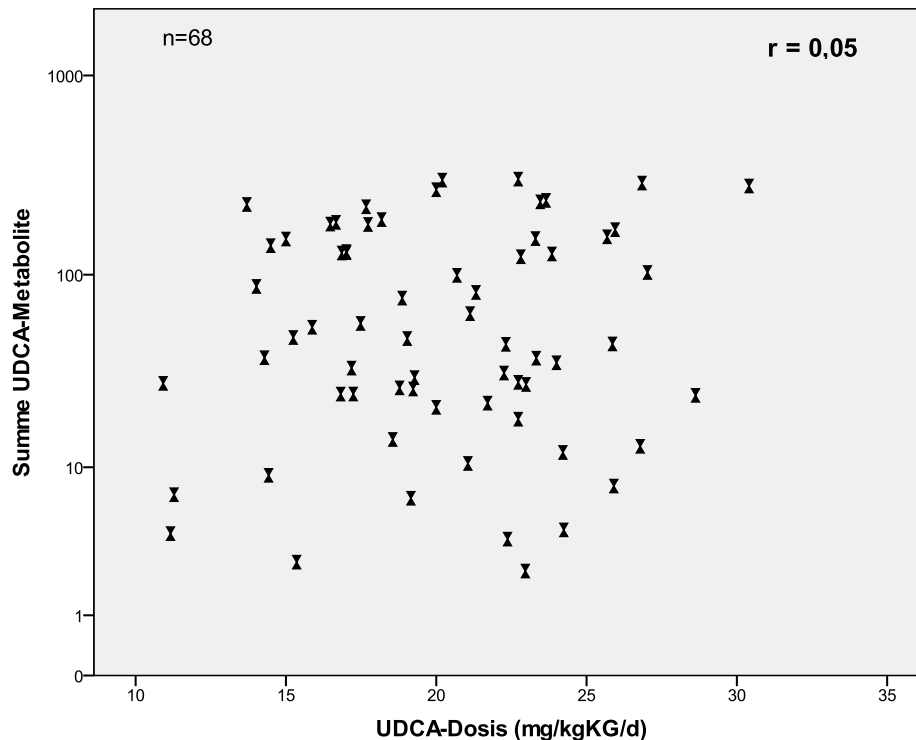


Abbildung 34: Streu-Punkt-Diagramm gewichtsbezogene Tagesdosis von UDCA im Verhältnis zur Summe der UDCA-Metaboliten. Auf der x-Achse ist die gewichtsbezogene UDCA-Dosis aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Summe der UDCA-Metaboliten ($\mu\text{mol/l}$) logarithmiert aufgetragen.

Kann es im Rahmen der oralen Zufuhr von Ursodeoxycholsäure zu Umwandlungsprodukten im Sinne von erhöhten Konzentrationen an hydrophoben GS kommen? Im untersuchten Patientenkollektiv zeigt sich, dass eine UDCA-Anreicherung im GS-Profil nicht in einer signifikanten Verschiebung zugunsten toxischer hydrophober GS (Abbildung 35) resultiert. Auch bei sehr hohen Dosierungen ($> 25\text{mg/kg KG/d}$) und einer deutlichen Anreicherung der UDCA-Metaboliten im GS-Pool erhöhen sich die toxischen GS wie LCA, GLCA und TLCA nicht. Der sehr geringe Korrelationskoeffizient nach Spearman Rho in Höhe von $r = 0,04$ ($p < 0,7$) untermauert diese Aussage.

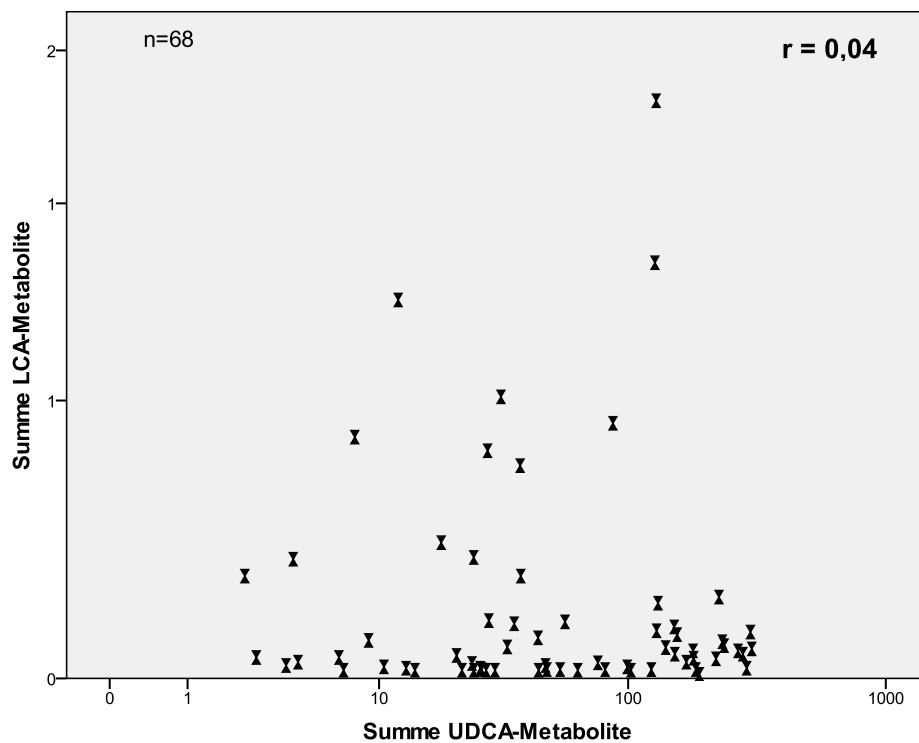


Abbildung 35: Streu-Punkt-Diagramm Summe UDCA-Metaboliten im Verhältnis zur Summe LCA-Metaboliten. Auf der x-Achse ist die Summe UDCA-Metaboliten ($\mu\text{mol/l}$, logarithmiert) aufgetragen. Auf der y-Achse findet sich die Summe der LCA-Metaboliten ($\mu\text{mol/l}$, logarithmiert).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die GS-Profile im Blut bei (cholestatischen) Lebererkrankungen mit der Frage analysiert, ob sich distinktive Gallensäure-Muster identifizieren lassen.

5.1 Gallensäure-Profil bei cholestatischen Erkrankungen

Ob sich Unterschiede im GS-Profil ergeben, je nachdem welche Ätiologie der Cholestase zugrunde liegt, war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Folgende Ergebnisse ergaben sich.

Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS

In unserer Analyse zeigte sich übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Arbeiten eine Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS sowohl bei den biliär-obstruktiven (z. B. GGA) (Fischer et al. 1996) als auch bei den nicht-obstruktiven cholestatischen Erkrankungen (z. B. PFIC) (Jacquemin et al. 1994). Die Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS ist auf eine Erhöhung der konjugierten primären GS zurückzuführen. Im Rahmen unserer Auswertungen fiel weiterhin auf, dass unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung mit zunehmender Cholestase (Gesamtkonzentration der Gallensäuren $> 50 \mu\text{mol/l}$) vier Gallensäuremetaboliten, und zwar die Glycin- und Taurinkonjugate der beiden primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure, dominieren. Konjugierte GS werden als weniger toxisch eingestuft und sind im Vergleich zu den unkonjugierten GS aufgrund ihrer geringeren detergentenartigen Wirkung nicht direkt zellmembranschädigend. Insbesondere bei Patienten mit Gallengangatresie findet sich bereits vor Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS (Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten $< 20 \mu\text{mol/l}$) eine Verschiebung zugunsten der konjugierten primären GS im GS-Profil. Insofern können unsere Ergebnisse als eine Art „Schutzfunktion der Leber“ bei cholestatischer Erkrankung verstanden werden.

Durch die dieser Arbeit zugrunde liegenden Studien konnte schlussendlich gezeigt werden, dass sich die im Rahmen von cholestatischen Erkrankungen resultierende GS-Retention durch eine typische Konstellation mit Erhöhung der konjugierten primären GS auszeichnet.

Verminderung der Konzentration an sekundären Gallensäuren

In unseren Analysen fiel auf, dass bei cholestatischen Erkrankungen sekundäre GS deutlich vermindert oder unter der Nachweisgrenze gemessen werden. Insbesondere fehlen sekundäre GS-Metaboliten sehr früh im GS-Profil, selbst wenn die GS-Retention im Sinne einer Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS (Gesamtkonzentration der GS ohne UDCA-Metaboliten $< 20 \mu\text{mol/l}$) noch nicht quantitativ messbar ist. In einer Untersuchung von Trottier und Mitarbeitern an Patienten mit PSC ließen sich ebenfalls deutlich verminderte sekundäre GS in der GS-Pool-Zusammensetzung nachweisen (Trottier et al. 2012). Nach Auswertung der GS-Profile gehen wir davon aus, dass bei den Erkrankungen AGS, PFIC und PSC die Sekretion von GS in den Darm aufgrund der Galleabflussstörung quantitativ deutlich reduziert ist, jedoch noch eine Restsekretion in den Darm vorhanden ist, was sich durch den Nachweis von sekundären GS in sehr niedrigen Konzentrationen zeigt. Unsere Vermutung wird durch Analysen des Gallesekrets von PFIC-Patienten, welches während einer externen Gallediversions-Operation gewonnen wurde, untermauert, da darin sekundäre GS in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Somit scheint eine Erhöhung der GS-Gesamtkonzentration die GS-Rückresorption im Darm zu hemmen, um dadurch die Leber vor einer weiteren Akkumulation von GS zu schützen. Dem gegenüber fehlen bei Patienten mit Gallengangatresie sekundäre GS nahezu vollständig in der GS-Pool-Zusammensetzung. Aufgrund der biliären Obstruktion resultiert eine mangelnde Sekretion von GS in den Darm, was klinisch auch zu acholischen Stühlen führt.

Zusammenfassend postulieren wir, dass das Fehlen von sekundären GS im Serum als frühzeitiger Indikator in der Differentialdiagnostik der Detektion einer Cholestase herangezogen werden kann.

Verhältnis von CA- zu CDCA Metaboliten

In unserer Arbeit wurde deutlich, dass bei GS-Retention eine typische Konstellation mit Erhöhung der konjugierten primären GS im GS-Profil imponiert. In der Verteilung der primären GS fällt eine Besonderheit auf. Es zeigt sich ein ähnliches charakteristisches Muster bei den Erkrankungen AGS und PFIC. Sie weisen als einzige Patientengruppe signifikant höhere Konzentrationen an CA-Metaboliten im Vergleich zu den CDCA-Metaboliten auf ($p < 0,001$). Pathophysiologisch liegt beim

Alagille-Syndrom und bei den progressiven familiären intrahepatischen Cholestase-Syndromen eine intrahepatische Störung vor. Das Alagille-Syndrom ist mit einem Mangel an intrahepatischen Gallenwegen assoziiert, die PFIC beruht auf einem Transporterdefekt auf hepatozellulärer Ebene. Folglich resultiert bei beiden Erkrankungen eine intrahepatische Cholestase, wodurch sie sich mit dem distinktiven Parameter eines Quotienten von CA/CDCA-Metaboliten > 1 identifizieren lassen (AUC 0,95).

Unsere Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass bei den Erkrankungen mit vorwiegend intrahepatischer Cholestase wie AGS und PFIC eine Hepatoprotektion im Sinne einer Erhöhung der geringeren zytotoxischen Cholsäure-Metaboliten erfolgt, unabhängig davon, ob sie mehr obstruktiv (AGS) oder nicht-obstruktiv (PFIC) verursacht ist.

Cholestase-Parameter in Korrelation zu den Gallensäuren

Neben der Bestimmung der Konzentration einzelner GS dient auch die Messung von laborchemischen Parametern im Blut zur Evaluation einer Cholestase. In unserer Arbeit wurde bewusst die Diagnose Gallengangatresie als häufigste obstruktiv-cholestatiche Erkrankung ausgewählt und in Bezug auf eine Korrelation der Cholestase-Parameter zu den GS analysiert.

Unsere Daten zeigen eine signifikant hohe Korrelation der sogenannten Cholestase-Parameter (Cholesterin, Gesamt-Bilirubin, AP) zur Gesamtkonzentration der GS bzw. zur Gesamtkonzentration der konjugierten primären GS. Cholesterin wird zum einen für die Gallensäuresynthese verwendet, andererseits über die Galle ausgeschieden. Im Rahmen einer Cholestase fällt neben der Erhöhung der konjugierten primären GS auch ein Anstieg der Cholesterin-Werte auf. Die erhöhten Cholesterin-Werte können durch die hepatobiliäre Abflussstörung oder die Supprimierung der GS-Synthese im Rahmen der Cholestase bedingt sein. Zudem waren die AP und die Gallensäuren signifikant positiv miteinander korreliert. Für die γ -GT konnte dies jedoch nicht beobachtet werden. Eine Erhöhung der AP wird durch eine Schädigung der Hepatozyten oder aber durch eine Cholestase hervorgerufen. Da die Cholestase nicht selten mit einem Vitaminmangel einhergeht, kann die Erhöhung der AP auch als Ausdruck des Vitamin D Mangels und somit als Parameter des Knochenstoffwechsels gewertet werden. Aufgrund der signifikanten Korrelation der

AP zu den konjugierten primären GS scheint letztere ein zusätzlicher valider Cholestase-Parameter im Vergleich zur γ -GT zu sein.

Zusammenfassend können die GS, insbesondere die konjugierten primären GS, als sensitive Marker zur Differenzierung einer Cholestase verwendet werden.

5.2 Gallensäure-Profil bei Stoffwechselerkrankungen der Leber

5.2.1 Zystische Fibrose

Erste Studien wurden bereits vor 40 Jahren veröffentlicht und eine veränderte GS-Zusammensetzung im GS-Pool bei Patienten mit CF dargelegt (Weber et al. 1973). In unserer Auswertung wurden die GS-Profile von Patienten mit CF-assoziiierter Hepatopathie analysiert. Eine hepatobiliäre Beteiligung bei CF bedarf einer frühzeitigen Erkennung und Einleitung therapeutischer Schritte, so dass sensitive Marker wie das Monitoring der GS-Konzentrationen bei CF-Patienten einen (entscheidenden) Beitrag leisten könnten.

Gesamtkonzentration der GS

Bei den von uns untersuchten Patienten mit CF wurde hinsichtlich der Gesamtkonzentration der GS mit erhöhten Gesamt-Gallensäuren ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt ($p < 0,025$). Setchell und Mitarbeiter beobachteten nicht signifikant erniedrigte Konzentrationen der GS, was sie auf den erhöhten fäkalen Verlust von GS bei CF zurückführten (Setchell et al. 1985). Bei den Autoren Smith und Strandvik werden diskret erhöhte Konzentrationen bei CF ausgewiesen (Strandvik und Samuelson 1985; Smith et al. 2004). Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Studien müssen jedoch aufgrund der Studienpopulation (Untersuchung von CF-Patienten ohne Differenzierung bezüglich des Vorliegens einer hepatobiliären Beteiligung) Einschränkungen gemacht werden. In unserem Kollektiv wurden nur Patienten mit CF und nachgewiesener Hepatopathie analysiert, so dass von einer Einschränkung des enterohepatischen Kreislaufes mit konsekutiver Erhöhung von Gallensäuren auszugehen ist.

Verminderung der Konzentration an sekundären GS

Bei den CF-Patienten fand sich in unseren Ergebnissen eine erniedrigte Konzentration an sekundären GS, was sich in Übereinstimmung mit vorhergehenden

Arbeiten bringen lässt (Lefebvre et al. 1977; Setchell et al. 1985; Smith et al. 2004). Den Mangel an sekundären GS erklären wir aufgrund des veränderten bakteriellen intestinalen Milieus mit konsekutiver Malabsorption von GS. Auch die häufige Einnahme von Antibiotika bei CF könnte zu Veränderungen und Einschränkungen des intestinalen Milieus führen. In Untersuchungen zur fäkalen GS-Sekretion ergaben sich erhöhte GS-Konzentrationen im Stuhl, was wiederum den hohen fäkalen Verlust von GS bei CF bestätigt (Weber et al. 1973; O'Brien et al. 1993). In dem von uns untersuchten Kollektiv wurde bei keinem Patienten eine Darmresektion durchgeführt. Neben dem Mangel an sekundären GS finden sich bei CF auch erniedrigte Konzentrationen für Cholesterin, was wir ebenfalls auf die eingeschränkte enterale Absorptionskapazität zurückführen.

Hoher Anteil an unkonjugierten GS

Bei CF-Patienten fällt als einzige Diagnosegruppe ein hoher Anteil an unkonjugierten GS im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den anderen hepatobiliären Erkrankungen auf (AUC 0,90). Den hohen Anteil an unkonjugierten primären GS werten wir im Sinne einer kompensatorischen GS-Neosynthese von unkonjugierten GS aufgrund des erhöhten enteralen Gallensäureverlustes, was auch in anderen Arbeiten vermutet wurde (O'Brien et al. 1993; Gnewuch et al. 2009).

Verminderung der Konzentration an Taurinkonjugaten

Seit langem ist bekannt, dass bei CF Glycin- im Vergleich zu Taurinkonjugaten überwiegen. Dieser ausgeprägte Mangel an Taurin ist in Untersuchungen von Weber und Mitarbeitern dokumentiert (Weber et al. 1973). Unsere Ergebnisse sind mit denen bereits veröffentlichter Arbeiten in Einklang (Roy et al. 1977; Thompson 1988; Smith et al. 2004). Es zeigte sich eine signifikant deutliche Verminderung der Konzentration an Taurin-konjugierten GS und somit ein erhöhter Quotient von Glycin- im Verhältnis zu Taurinkonjugaten ($p < 0,001$). Ein Mangel an der essentiellen Aminosäure Taurin – resultierend aus Malabsorption und erhöhtem enteralen Verlust – führt dazu, dass vermehrt Glycin-Metaboliten im GS-Pool vorliegen. Bei CF-Patienten liegt aufgrund der verminderten Bikarbonatsekretion ein saures Milieu im Darm vor, was zur Folge hat, dass die Glycinkonjugate mit deutlich höherem pKa-Wert schlechter wasserlöslich sind und somit die Fettemulgierung aufgrund verminderter Mizellenbildung deutlich reduziert ist. Aus diesem Grund wird eine orale

Supplementierung mit Taurin bei CF empfohlen (Colombo et al. 1994), was in Studien teilweise zu normwertigen Glycin- und Taurin-Konzentrationen geführt hat und unsere These einer verminderten Konzentration an Taurin-Metaboliten bei CF-Patienten unterstützt (Darling et al. 1985).

Schlussendlich zeigten unsere Ergebnisse bei den CF-Patienten ein charakteristisches GS-Profil, dessen pathophysiologische Bedeutung noch unklar ist.

5.2.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

In dieser Studie wurden Kinder und Jugendliche aufgrund der körperlichen Untersuchung, klinischer Symptome, laborchemischer Parameter mit Erhöhung der Transaminasen und sonographischer Beurteilung der Diagnose NAFLD zugeteilt. Über den Schweregrad der Erkrankung, insbesondere das Ausmaß pathologischer histologischer Veränderungen, bestand bei den Patienten keine Kenntnis, eine histologische Untersuchung im Sinne einer Leberbiopsie wurde nur bei einem Patienten durchgeführt.

Eine von Aranha und Mitarbeitern veröffentlichte Studie verweist auf die Erhöhung der DCA-Metaboliten der Probandengruppen mit alkoholischer Steatose und nicht-alkoholischer Steatose zur Kontrollgruppe (Aranha et al. 2008). Die Patienten mit alkoholischer Steatose zeigten erhöhte Konzentrationen an DCA-Metaboliten und eine Zunahme der Gesamtkonzentration der GS. Als Erklärung wurde von den Autoren die Akkumulation der GS durch eine verminderte Sekretionsfähigkeit der Leber und ein erhöhtes Angebot an Lipiden angegeben. Ferner postulieren sie einen Zusammenhang zwischen Krankheitsprogression und GS-induzierter Zytotoxizität. Die Autoren Dasarathy und Mitarbeiter verglichen zwischen nicht-alkoholischer Fettleberhepatitis und einer gesunden Kontrollgruppe und wiesen ebenfalls erhöhte GS-Konzentrationen bei Patienten mit NASH nach (Dasarathy et al. 2011). Die Arbeit von Jahnel und Mitarbeitern wies eine Veränderung der GS-Pool-Zusammensetzung im Rahmen der Krankheitsprogredienz auf. Diese These wird von einer Untersuchung von Ferslew unterstützt, welche eine Erhöhung von GS, insbesondere zytotoxischer sekundärer GS fanden (Ferslew et al. 2015), (Jahnel et al. 2015).

Im Hinblick auf die Assoziation potentiell toxischer hydrophober GS mit der Pathogenese der Erkrankung zeigten sich im Ergebnisteil keine signifikanten

Unterschiede der absoluten und relativen GS-Konzentrationen zwischen Lebergesunden und NAFLD-erkrankten Patienten. Die GS-Profile wurden einzeln, insbesondere hinsichtlich erhöhter Konzentrationen der GS DCA und deren Konjugate, analysiert. Nur ein Patient zeigte diskret erhöhte Werte des relativen Anteils der DCA-Metaboliten.

Die Veränderungen im GS-Profil, welche von den Autoren (Aranha et al. 2008; Dasarathy et al. 2011) dargelegt wurden, sprechen für eine Dysregulation auf Ebene der hepatozellulären Ausschleusung von Substraten. Da die GS auch ein weites Spektrum an Signalwegen induzieren, wird eine Veränderung in der GS-Komposition Effekte auf diese haben, was insbesondere auch von einigen Autoren für die Pathogenese von NAFLD verantwortlich gemacht wird (Trauner et al. 2010a; Martin et al. 2010). GS steuern als Liganden für nukleäre Rezeptoren wie FXR und membrangebundene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren den Lipid- und Glucosemetabolismus (Cariou 2008).

Die GS-Zusammensetzung und deren Beeinflussung der verschiedenen Signalwege werden weiter im Fokus stehen, um therapeutische Angriffspunkte in der Behandlung von NAFLD zu finden (Trauner et al. 2010a).

5.2.3 Weitere Stoffwechselerkrankungen der Leber: α 1-AT-Mangel, Morbus Meulengracht, Morbus Wilson, Glykogenose, Mitochondriopathie

Die hepatischen Stoffwechselerkrankungen sind innerhalb des erkrankten Kollektivs in der Auswertung der GS-Pool-Zusammensetzung inhomogen. In dieser Arbeit wurden die Blut-GS-Konzentrationen von vier Patienten mit Morbus-Wilson untersucht. Drei Patienten zeigten eine physiologische GS-Profil-Zusammensetzung. Bei einem Patienten fiel eine deutliche Erhöhung der Gesamt-Konzentration der GS bedingt durch erhöhte konjugierte primäre GS auf. Zum Abnahmezeitpunkt lag eine akute hepatische Dekompensation mit Ikterus und Gerinnungsstörung vor. In der Auswertung der Patienten mit Glykogenose finden sich bei einem Patienten, der laborchemisch eine regelrechte Lebersyntheseleistung ohne klinisch apparenten Ikterus aufwies, normwertige Serum-GS-Konzentrationen. Bei Abnahme der Blut-GS-Konzentrationen lag bei dem weiteren an Glykogenose erkrankten Patienten eine

Leberzirrhose mit konsekutiv deutlich eingeschränkter Lebersynthesfunktion vor, im GS-Profil dominierten die konjugierten primären GS ohne Nachweis von sekundären GS. Bei diesem Patienten wurde im weiteren Verlauf eine Lebertransplantation durchgeführt. Patienten mit α 1-AT-Mangel können zum Teil unauffällige GS-Konzentrationen aufweisen. Jedoch in Abhängigkeit der hepatobiliären Manifestation der Grunderkrankung mit Entwicklung einer sekundären Zirrhose resultieren Beeinträchtigungen des GS-Stoffwechsels im Sinne von erhöhten GS-Konzentrationen der konjugierten primären GS. So fielen zwei Patienten, welche sonographisch deutliche Umbauzeichen der Leber vorwiesen, mit einer diskreten Erhöhung der konjugierten primären GS auf. Ein weiterer Patient mit α 1-AT-Mangel und sekundärer Zirrhose präsentierte sich mit massiv erhöhten konjugierten primären GS und deutlicher Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS. Die GS können somit als erste Indikatoren für eine Dysfunktion im GS-Metabolismus dienen, was von den Autoren Nemeth und Mitarbeitern ebenfalls dargelegt wurde (Nemeth et al. 1982). Drei Patienten mit Mitochondriopathie wurden in diese Arbeit eingeschlossen. Hinsichtlich der GS-Profil-Zusammensetzung präsentierten sie sich mit einer Erhöhung der Gesamt-Konzentration der GS aufgrund erhöhter konjugierter primärer GS. Histologisch lag bei der untersuchten Patientengruppe eine Leberzirrhose mit Einschränkung der Lebersynthesfunktion und Ikterus vor. Die Analyse der GS-Zusammensetzung bei Morbus Meulengracht ergab physiologische GS-Konzentrationen.

Aufgrund dieser Ergebnisse stufen wir die Analyse der GS-Profil-Zusammensetzung als sensitiven und nicht-invasiven Indikator zur möglichen Detektion einer hepatobiliären Manifestation zumindest bei den hier untersuchten hepatischen Stoffwechselerkrankungen ein. Es zeigt sich darüber hinaus, dass auch trotz eingeschränkter Leberfunktion und selbst bei Leberzirrhose die Konjugation als „Schutzmechanismus“ noch erhalten ist. Das ist in Analogie zur Hyperbilirubinämie.

5.3 Gallensäure-Profil bei entzündlichen Lebererkrankungen

In der Literatur findet sich nur eine beschränkte Anzahl an Untersuchungen zu GS bei Infektionen durch hepatotrope Viren unterschiedlichen Erregertyps. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit Hepatitis viraler Genese in dieser Studie ist die

Aussagekraft bezüglich relevanter Unterschiede im GS-Profil limitiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit viraler Hepatitis eine erhöhte Serumkonzentration der Gesamt-GS zeigen (Pennington et al. 1978). Vergleicht man die akute und chronische Hepatitis, finden sich laut Studienergebnissen bei der akuten Form erhöhte CA-Konzentrationen (Jones et al. 1981). Es ließen sich bei den untersuchten Patienten mit Virushepatitis keine Auffälligkeiten im GS-Profil nachweisen. Die Bestimmung der GS kann bei Verdacht auf eine Hepatitis viraler Genese eine Ergänzung in der Diagnostik zur differentialdiagnostischen Abgrenzung zu anderen hepatobiliären Erkrankungen sein. In der Diagnostik viraler Lebererkrankungen hat sie jedoch keinen eigenen Stellenwert.

Im Ergebnisteil wurde die GS-Pool-Zusammensetzung bei Patienten mit Autoimmunhepatitis untersucht. Distinktive Muster konnten bei dieser Patientengruppe nicht gefunden werden, da sich innerhalb des Kollektivs ein inhomogenes Bild darstellte.

Im Rahmen unserer Auswertung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Krankheitsaktivität oder dem zusätzlichen Vorliegen einer Autoimmunchoolangitis.

5.4 Gallensäure-Profil bei vaskulären Malformationen der Leber

Gallensäuren durchlaufen physiologischerweise den enterohepatischen Kreislauf, wobei durch die Leber ein First-Pass-Effekt der GS von bis zu 80% erfolgt (Meier 1995). Bei Vorliegen einer venösen Malformation mit portosystemischem Shunt ist bekannt, dass aufgrund der fehlenden Extraktion des portalen Ammoniaks durch die Leber eine Hyperammoniämie resultiert. Es ist davon auszugehen, dass sich hinsichtlich der GS eine ähnliche Konstellation mit Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS darstellen wird. Sekundäre GS werden im terminalen Ileum gebildet sowie resorbiert und erreichen über das portalvenöse Blut die Leber. Unser Patientenkollektiv zeigte bei Vorliegen einer portosystemischen Shuntverbindung neben der Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS eine Erhöhung der sekundären GS im Blut, was auf die fehlende hepatische Clearance zurückzuführen ist und damit die pathomechanistischen Überlegungen bestätigt.

5.5 Einfluss der Nüchternheit auf das Gallensäure-Profil

Der Metabolismus der GS unterliegt aufgrund des enterohepatischen Kreislaufs einer Vielzahl von Einflüssen. Verschiedene Autoren verweisen darauf, nüchtern gemessene GS-Konzentrationen bei der Analyse von GS zu verwenden, um valide Vergleiche und Aussagen treffen zu können (Angelin et al. 1982; Mannes et al. 1987). Als Auswirkung einer Mahlzeit ist ein Anstieg der GS beschrieben (Angelin et al. 1982). Der postprandiale Anstieg ist intraindividuell sehr variabel und abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Kontraktion der Gallenblase, der Phase der Magenentleerung und der intestinalen Motilität sowie der Ausschüttung von Hormonen und Enzymen (Mannes et al. 1987).

Aufgrund des Studienkollektives von Kindern und Jugendlichen war eine strikte Einhaltung einer Nüchternzeit von acht Stunden nicht konsequent bei allen Studienteilnehmern einzuhalten. Bei Leber- und Darm-Gesunden erwarten wir postprandial einen Anstieg der Gesamt-Konzentration der GS insbesondere der sekundären GS, welcher intraindividuell sehr unterschiedlich ist. Wir konnten zeigen, dass sich unabhängig von der Einhaltung einer Nüchternzeit hinsichtlich der GS-Konzentrationen nur geringe intraindividuelle Konzentrationsschwankungen ergeben, was an der Analyse des GS-Profiles bei den Patienten mit NAFLD und AGS gezeigt werden konnte. Bei Vorliegen einer deutlich pathologischen GS-Pool-Zusammensetzung ist dies auch bei fehlender Nüchternheit erkenn- und bewertbar.

Mit dieser Studie konnten wir zeigen, dass auch nicht nüchtern gemessene GS-Konzentrationen bezüglich des Vorliegens einer pathologischen GS-Pool-Zusammensetzung bewertet werden können.

5.6 Gallensäure-Profil unter der Therapie mit Ursodeoxycholsäure

Ursodeoxycholsäure wird in der Therapie von verschiedenen (cholestatischen) Lebererkrankungen eingesetzt. Zahlreiche Studien untersuchten die Wirkung des Therapeutikums vor allem bei erwachsenen Patienten mit primärer biliärer Zirrhose u. a. hinsichtlich der Veränderungen in der GS-Pool-Zusammensetzung (Batta et al. 1989; Poupon et al. 1993). Der genaue Wirkmechanismus und die klinischen Effekte von UDCA bei (cholestatischen) Lebererkrankungen stehen bis heute im Fokus vieler

Analysen. Die bisherigen Untersuchungen variieren in Bezug auf die Veränderung der Gesamtkonzentration der GS, die Höhe der UDCA-Anreicherung im GS-Pool bei unterschiedlicher tagesbezogener Dosis und die Veränderung der endogenen GS-Konzentrationen.

Exemplarisch analysierten wir den Einfluss der UDCA-Medikation vor und nach Therapiebeginn bei einem Patienten mit Alagille-Syndrom. Die Therapie mit UDCA führte zu einer deutlichen Anreicherung der UDCA-Metaboliten bei deutlicher Reduktion der endogenen GS ohne relevante Veränderung der Gesamtkonzentrationen der GS. Die Auswertung verdeutlicht, dass die Therapie mit UDCA eine Verschiebung zugunsten hydrophileren GS im GS-Profil bewirkt, währenddessen die Konzentration potentiell toxischer GS wie der konjugierten primären GS abnimmt.

Im Vergleich der Analyse des GS-Profils von GGA-Patienten mit und ohne UDCA-Therapie konnten wir zeigen, dass erstere eine Erhöhung der hydrophilen UDCA-Metaboliten im Austausch gegen endogene potentiell toxische GS aufweisen. Bei den nicht-therapierten GGA-Patienten findet sich im Vergleich dazu ein Überhang an hydrophoben konjugierten primären GS in der Zusammensetzung der GS. Somit stehen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu veröffentlichten Arbeiten, in denen unter der Therapie mit Ursodeoxycholsäure bei Patienten mit cholestatischen Erkrankungen wie PBC und PSC keine Veränderungen in der GS-Zusammensetzung der primären und sekundären GS gefunden wurden (Beuers et al. 1992; Rudolph et al. 1993). Ausgehend von unseren Studienergebnissen fanden wir bei Patienten mit hepatobiliärer Erkrankung und UDCA-Medikation eine deutliche UDCA-Anreicherung von bis zu 70% im GS-Profil im Vergleich zu GS-Profilen ohne UDCA-Medikation, welche einen relativen UDCA-Anteil von ~ 4% aufwiesen.

In einer Arbeit von Sauer und Mitarbeitern wird auf eine eingeschränkte UDCA-Absorption im Rahmen der Cholestase verwiesen (Sauer et al. 1999). Im Gegensatz dazu konnten wir belegen, dass auch unter cholestatischen Bedingungen (Gesamt-GS ohne UDCA-Metaboliten > 100 µmol/l) eine deutliche Zunahme der Konzentration an UDCA-Metaboliten nachzuweisen ist. Die von uns beschriebene Wirkung von UDCA besteht in einer deutlichen Anreicherung von UDCA-Metaboliten im GS-Profil,

was im Einklang mit anderen Arbeiten ist (van de Meeberg et al. 1996; Iwaki et al. 2007).

Eine große Anzahl an Untersuchungen beschäftigte sich mit der Therapie von UDCA bei PSC. Bei PSC wird zum Teil auch eine Medikation mit UDCA durchgeführt. Dabei zeigen sich bei Standarddosierungen (13-15 mg/kg/d) deutliche Verbesserungen gemessen an den chemischen Laborparametern wie Bilirubin, Albumin, AP und GOT (Lindor 1997). Um aber einen langfristigen Einfluss auf die Krankheitsprogression beurteilen zu können, wurden verschiedene UDCA-Dosierungen bei PSC angewendet. Die Autoren stimmen überein, dass eine höhere UDCA-Dosis (25-30 mg/kg/d) im Vergleich zu Standarddosierungen Vorteile mit sich bringt, was durch die histologischen Befunde, die laborchemischen Parameter und eine verlängerte Dauer des transplantatfreien Überlebens verdeutlicht wurde (Harnois et al. 2001; Cullen et al. 2008). Unsere Analysen ergaben jedoch, dass eine höhere UDCA-Dosierung nicht zwingend zu einer deutlichen Erhöhung der UDCA-Metaboliten führte. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist eine Steuerung der UDCA-Dosierung anhand des individuellen GS-Profiles zu diskutieren.

Sinakos und Mitarbeiter zeigten bei PSC-Patienten unter UDCA-Therapie eine Anreicherung der LCA-Metaboliten parallel zur Erhöhung der UDCA-Metaboliten (Sinakos et al. 2010). Ursächlich sei die bakterielle Formation von UDCA zu LCA im Kolon. Dieses wurde auch von anderen Autoren bestätigt (Crosignani et al. 1991; Poupon et al. 1993; Lazaridis et al. 2001). Eine signifikante Erhöhung der LCA-Metaboliten im Rahmen der oralen UDCA-Verabreichung ließ sich im Ergebnisteil nicht nachweisen. Die Analyse der GS-Profile ergab keinen Nachweis von LCA-Metaboliten im GS-Pool. Aufgrund unserer Ergebnisse ist nicht davon auszugehen, dass es unter UDCA-Medikation zu einer Erhöhung der LCA-Metaboliten kommt.

Zusammenfassend kann mit Hilfe des GS-Profiles eindeutig differenziert werden, ob die Erhöhung der Gesamt-Konzentration der GS die Folge der Zufuhr von oraler Ursodeoxycholsäure oder primär eine Erhöhung der endogenen GS als Ausdruck einer Cholestase ist.

5.7 Einschränkungen der Auswertung und Ausblick

Ein Vergleich publizierter Ergebnisse mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist aufgrund der unterschiedlichen Studienkollektive von Kindern und Erwachsenen nur mit Einschränkungen möglich. Außerdem stammen einige Untersuchungen zu GS-Profilen aus Analysen des Gallesekrets, den Hepatozyten oder im Urin. Demgegenüber wurden in dieser Arbeit die Blut-GS-Konzentrationen untersucht. Die Konzentration einer GS im Serum entspricht der Konzentration im Systemkreislauf und stimmt nicht mit der GS-Konzentration in der Galle oder im Urin überein, so dass ein Vergleich der Studienergebnisse nur bedingt möglich ist (Akashi et al. 1983; Abukawa et al. 1998). Im Hinblick auf die Diagnosestellung muss beachtet werden, dass eine histologische Untersuchung mittels Leberbiopsie bei GGA, PSC, PFIC und AIH erfolgte. Eine molekulargenetische Untersuchung wurde bei den Diagnosen alpha 1-Antitrypsin-Mangel, AGS, PFIC und CF durchgeführt. Die Zuordnung zu den Diagnosen NAFLD und Erkrankungen mit vaskulärer Fehlbildung der Leber wurde mittels sonographischer Untersuchung und von Laborparametern gestellt. Die statistische Auswertung der GS-Profile war aufgrund der hohen Anzahl an Diagnosen und insbesondere der zum Teil geringen Patientenanzahl bei den einzelnen Erkrankungen nur eingeschränkt möglich. Bei der Analyse signifikanter Unterschiede der GS-Profile in Bezug auf verschiedenen Lebererkrankungen konnte daher das Alter der Patienten, die jeweilige Krankheitsdauer, das Erkrankungsstadium und die Progression der Hepatopathie sowie die Art und Dauer der individuellen Therapie nicht berücksichtigt werden. Des Weiteren wurde bei der Analyse nicht berücksichtigt, ob eine Beeinträchtigung des Intestinaltraktes und der Darmflora aufgrund antibiotischer Therapie, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) oder chirurgischer Interventionen vorlag, was wiederum die intestinale Absorption und die bakterielle Modifikation der GS, insbesondere die Synthese der sekundären GS, beeinflussen könnte. Aufgrund des unterschiedlichen Medikamentenmetabolismus von Kindern und Jugendlichen und dem Abstand des Zeitpunktes der Medikamenteneinnahme zur Blutabnahme kann es zu intraindividuellen Verschiebungen hinsichtlich der GS-Pool-Zusammensetzung kommen, die in der GS-Analyse bei der Auswertung des Einflusses der UDCA-Therapie nicht berücksichtigt wurde. Um einen Hinweis auf eine mögliche

Feedbackinhibition bei Cholestase zu erhalten, könnten zukünftig die Messungen von Vorstufen (4-Cholesten-7 α -ol-3-one) oder Zwischenprodukten der GS-Synthese, insbesondere von 7-alpha-Hydroxycholestenon, einen interessanten Aspekt darstellen. Somit könnte auch evaluiert werden, inwieweit bei Gallestauung über das Enzym 7-Alpha-Hydroxylase eine Hemmung der Gallensäuresynthese stattfindet. In Bezug auf die Progression der Erkrankung könnte man GS-Profile im zeitlichen Verlauf analysieren, um einen Zusammenhang zwischen der Höhe der einzelnen GS-Konzentrationen und der Progression der Erkrankung zu erhalten. Hierzu wäre die Einbeziehung von leberspezifischen laborchemischen und histologischen Befunden erforderlich. In einer früheren Arbeit wurde versucht, eine Korrelation zwischen dem Grad der Leberparenchymveränderung (Fibrose, Zirrhose) und den GS darzustellen (Alm et al. 1982). Ausgehend von dieser Arbeit fand sich eine Korrelation zwischen der Erhöhung der Gesamt-Gallensäuren und dem Ausmaß der Entzündung, jedoch unabhängig davon, welcher Genese die Hepatopathie ist (alkoholisch/nicht alkoholisch bedingt) (Alm et al. 1982).

6 Zusammenfassung

Hepatobiliäre Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter stellen ein breites Spektrum und damit eine differentialdiagnostische Herausforderung dar. Die Arbeit hatte zum Ziel, quantitative und qualitative Veränderungen in der Zusammensetzung des Gallensäurepools bei cholestatischen pädiatrischen Hepatopathien zu analysieren, um insbesondere distinktive Gallensäure-Profilmuster nachzuweisen.

Wir konnten zeigen, dass sich anhand der GS-Profil-Zusammensetzung eindeutig zwischen einer cholestatischen und nicht-cholestatischen Erkrankung differenzieren lässt. Bei cholestatischen Erkrankungen dominieren mit zunehmender Cholestase (Gesamtgallensäuren > 50 $\mu\text{mol/l}$) vier Gallensäuremetabolite, und zwar die Glycin- und Taurinkonjugate der beiden primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure bei nahezu absolutem Fehlen der sekundären GS. Bereits ohne Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS (Gesamtgallensäuren < 20 $\mu\text{mol/l}$) zeichnet sich bei Patienten mit cholestatischer Erkrankung ein Fehlen von sekundären GS ab. Darüber hinaus findet sich bei diesen eine Erhöhung der konjugierten Cholsäure- und Chenodeoxycholsäure-Metaboliten im GS-Pool. Das

Fehlen von sekundären GS hat sich als äußerst sensibler Parameter zur Abgrenzung einer cholestatischen von einer hepatischen Erkrankung anderer Ätiologie gezeigt.

Des Weiteren lässt sich eine Subgruppe der hepatobiliären Erkrankungen, nämlich das Alagille-Syndrom und die progressiv familiären intrahepatischen Cholestase-Syndrome, aufgrund signifikant deutlich erhöhter Cholsäure-Konjugate charakterisieren und ermöglicht somit eine sensitive Abgrenzung dieser „intrahepatischen“ Cholestase-Erkrankungen zu anderen Hepatopathien.

Bei Patienten mit cystischer Fibrose findet sich eine charakteristische GS-Pool-Zusammensetzung. Sie präsentieren sich als Einzige mit einem erhöhten Anteil an unkonjugierten primären GS und einer erniedrigten Konzentration an Taurin-konjugierten GS sowie sekundären GS. Dieses GS-Profil-Muster legt die Vermutung nahe, dass die Hepatopathie mit einer möglichen Toxizität dieser GS-Pool-Zusammensetzung in Zusammenhang stehen könnte.

Aufgrund unserer Ergebnisse ließ sich zeigen, dass Erkrankungen mit portosystemischem Shunt eine Erhöhung der sekundären GS aufgrund fehlender hepatischer Clearance aufweisen.

Nach Aufnahme einer Mahlzeit ist von einem postprandialen Anstieg der GS insbesondere der sekundären GS auszugehen. Wir konnten allerdings zeigen, dass bei Vorliegen einer cholestatischen GS-Pool-Zusammensetzung unabhängig der Einhaltung einer Nüchternzeit ein Fehlen von sekundären GS imponiert. Somit ist die Aussagekraft zumindest bei pädiatrischen Patienten bei Nichteinhaltung der Nüchternzeit nicht beeinträchtigt.

Die hydrophile Gallensäure Ursodeoxycholsäure gilt als Therapeutikum der Wahl bei cholestatischen Erkrankungen und zeichnet sich durch eine deutliche Anreicherung von UDCA-Metaboliten im GS-Profil in unserem Patientenkollektiv aus. Anhand des GS-Profils lässt sich mit unserem Vorgehen identifizieren, ob die Erhöhung der Gesamt-Konzentration der GS auf die orale Zufuhr von UDCA oder auf eine Erhöhung der endogenen GS als Ausdruck einer Cholestase zurückzuführen ist.

Aufgrund unserer Ergebnisse lässt sich folgern, dass die analytische Differenzierung der GS-Konzentrationen im Serum einen zusätzlichen sensiblen diagnostischen

Baustein in der Differentialdiagnostik pädiatrischer (cholestatischer) Lebererkrankungen darstellt. Darüber hinaus erscheint die GS-Differenzierung als innovative Methode der Steuerung einer individualisierten UDCA-Therapie. Gleiches gilt ggf. auch für andere Therapeutika.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Molekülstruktur der GS, modifiziert nach (Thomas et al. 2008)....	3
Abbildung 2: Synthese der Gallensäuren modifiziert nach (Russell 2003) und (Thomas et al. 2008).....	4
Abbildung 3: Transportersystem der GS modifiziert nach (Trauner und Boyer 2003; Thomas et al. 2008).....	9
Abbildung 4: Regulationsmechanismen bei Cholestase modifiziert nach (Alrefai und Gill 2007)	12
Abbildung 5: Defekte am hepatobiliären Transportersystem modifiziert nach Trauner und Boyer 2003.....	17
Abbildung 6: Histogramm der Cholsäure (CA)..	34
Abbildung 7: Histogramm der logarithmierten Cholsäure (logCA).....	35
Abbildung 8: Mediane Altersverteilung der Diagnosen..	40
Abbildung 9: Relative Häufigkeitsverteilung der Diagnosegruppen.....	41
Abbildung 10: GS-Profil der Kontrollgruppe (n=89, Klinische Chemie, UKR Regensburg).....	45
Abbildung 11: GS-Profil bei Patienten mit GGA (n=20).....	46
Abbildung 12: GS-Profil bei Patienten mit PSC (n=6).....	47
Abbildung 13: GS-Profil bei Patienten mit Alagille-Syndrom (n=15).....	48
Abbildung 14: GS-Profil bei Patienten mit PFIC (n=6)...	49
Abbildung 15: Box-and-Whiskers-Plots Quotient CA-Metaboliten zu CDCA-Metaboliten (logarithmiert) im Vergleich der einzelnen Diagnosen	51
Abbildung 16: ROC-Analyse bei AGS und PFIC	52
Abbildung 17: GS-Profil der GGA-Patienten (n=20).....	53
Abbildung 18: GS-Profil im zeitlichen Verlauf bei einem männlichen GGA-Patienten	54
Abbildung 19: Streu-Punkt-Diagramm Summe primär konj. GS zu Gesamt-GS ohne UDCA-Metaboliten im Gesamtkollektiv (n=156).....	55
Abbildung 20: Streu-Punkt-Diagramm Cholesterin zu konj. primäre GS	56
Abbildung 21: GS-Profil bei Patienten mit CF (n=9)	57
Abbildung 22: Streu-Punkt-Diagramm Summe (CA+CDCA) zu Quotient Glycin-/Taurin konj. GS.	59
Abbildung 23: ROC-Analyse bei CF.	61

Abbildung 24: Streu-/Punktdiagramm Cholesterin zu Quotient Glycin-/Taurinkonj...	62
Abbildung 25: GS-Profil bei Patienten mit NAFLD (n=14)	63
Abbildung 26: GS-Profil bei Patienten mit Virushepatitis (n=7).....	64
Abbildung 27: GS-Profil bei Patienten mit Autoimmunhepatitis (n=15).....	65
Abbildung 28: GS-Profil bei Patienten mit vaskulärer Malformation der Leber (n=5).....	66
Abbildung 29: Die Abbildung zeigt die GS-Profile eines Patienten mit AGS, bei dem eine Abnahme der GS an fünf Untersuchungszeitpunkten (siehe x-Achse) erfolgte...	67
Abbildung 30: Die Abbildung zeigt die GS-Profile eines Patienten mit NAFLD ohne/mit Einhaltung einer Nüchternzeit von acht Stunden	68
Abbildung 31: Box-and Whisker-Plot UDCA-Medikation	69
Abbildung 32: GS-Profil eines Patienten mit AGS vor und nach Gabe von UDCA.	70
Abbildung 33: Patienten mit GGA (n=20); Zwei Patienten erhalten keine UDCA-Medikation (ID 7 und 105)	71
Abbildung 34: Streu-Punkt-Diagramm gewichtsbezogene Tagesdosis von UDCA im Verhältnis zur Summe der UDCA-Metaboliten	72
Abbildung 35: Streu-Punkt-Diagramm Summe UDCA-Metaboliten im Verhältnis zur Summe LCA-Metaboliten	73
Abbildung 36: Box- and Whiskers-Plots des Z-Scores	112
Abbildung 37: Sekundäre Leberhautzeichen, Spider Naevi	113
Abbildung 38: Sekundäre Leberhautzeichen, Palmarerythem	113
Abbildung 39: Pruritus Score.....	114
Abbildung 40: GS-Profil bei Cholangiopathie	115
Abbildung 44: GS-Profil bei Morbus Meulengracht	116
Abbildung 45: GS-Profil bei Morbus Wilson.....	117
Abbildung 46: GS-Profil bei Glykogenosen.....	118
Abbildung 47: GS-Profil bei Mitochondriopathien	119
Abbildung 48: GS-Profil bei α 1-AT-Mangel.....	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Test auf Normalverteilung der GS exemplarisch anhand CA, GCA und TCA bei den Patienten mit GGA (n=20).....	33
Tabelle 2: Die Tabelle gibt einen Überblick über die berechneten Parameter, welche im Ergebnisteil verwendet werden.....	36
Tabelle 3: Berechnung der relativen GS-Konzentrationen exemplarisch für die primäre Gallensäure Cholsäure (CA)	36
Tabelle 4: Berechnung einzelner GS-Quotienten... ..	37
Tabelle 5: Verteilung des Geschlechts innerhalb der Diagnosen	39
Tabelle 6: Absolute und relative Häufigkeitsverteilung der einzelnen Diagnosen und Diagnosegruppen	43
Tabelle 7: Absolute und relative GS-Konzentrationen bei Probanden mit unauffälligem GS-Profil (n=89)	45
Tabelle 8: Median der absoluten (in $\mu\text{mol/l}$) und relativen GS-Konzentrationen (in %) bei den cholestatischen Erkrankungen GGA (n=20), PSC (n=6), AGS (n=15) und PFIC (n=6).	50
Tabelle 9: ROC-Analyse für die Variablen Summe primär konj. GS und Quotient CA- zu CDCA-Metabolite.....	52
Tabelle 10: Korrelation der Cholestase-Parameter zu den GS	56
Tabelle 11: Unterschiede der Diagnosegruppen hinsichtlich ausgewählter GS-Parameter.....	58
Tabelle 12: ROC-Analyse für die Variablen Quotient Glycin- zu Taurinkonj. ohne UDCA, Summe (CA+CDCA), Summe unkonjugierte GS ohne UDCA, Quotient freie zu konj. GS ohne UDCA, Quotient primäre zu sek. GS ohne UDCA... ..	60
Tabelle 13: Deskriptive Parameter UDCA-Medikation	69
Tabelle 14: Absolute und relative Konzentrationen der GS vor und nach UDCA-Medikation bei einem Patienten mit AGS (n=1)	70
Tabelle 15: Patienten mit GGA (n=20), mit und ohne UDCA-Medikation	71

Literaturverzeichnis

- Abukawa D, Nakagawa M, Iinuma K, Nio M, Ohi R, Goto J. Hepatic and serum bile acid compositions in patients with biliary atresia: a microanalysis using gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization detection. *Tohoku J. Exp. Med* 1998;185(4):227–37.
- Agellon LB, Torchia EC. Intracellular transport of bile acids. *Biochim. Biophys. Acta* 2000;1486(1):198–209.
- Akashi Y, Miyazaki H, Nakayama F. Correlation of bile acid composition between liver tissue and bile. *Clin. Chim. Acta* 1983;133(2):125–32.
- Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odièvre M, Dommergues JP. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J. Pediatr* 1987;110(2):195–200.
- Alm R, Carlson J, Eriksson S. Fasting serum bile acids in liver disease. A comparison with histological features. *Scand. J. Gastroenterol.* 1982;17(2):213–8.
- Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm. Res* 2007;24(10):1803–23.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem* 2001;276(31):28857–65.
- Angelin B, Björkhem I, Einarsson K, Ewerth S. Hepatic uptake of bile acids in man. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum. *J. Clin. Invest.* 1982;70(4):724–31.
- Angulo P, Dickson ER, Therneau TM, Jorgensen RA, Smith C, DeSotel CK, Lange SM, Anderson ML, Mahoney DW, Lindor KD. Comparison of three doses of ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis: a randomized trial. *J. Hepatol* 1999;30(5):830–5.
- Aranha MM, Cortez-Pinto H, Costa A, da Silva IBM, Camilo ME, Moura MC de, Rodrigues CMP. Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20(6):519–25.
- Axelsson M, Sjövall J. Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J. Steroid Biochem.* 1990;36(6):631–40.
- Bartholomew TC, Summerfield JA, Billing BH, Lawson AM, Setchell KD. Bile acid profiles of human serum and skin interstitial fluid and their relationship to pruritus studied by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Sci.* 1982;63(1):65–73.
- Batta AK, Salen G, Arora R, Shefer S, Tint GS, Abroon J, Eskreis D, Katz S. Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid metabolism in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1989;10(4):414–9.
- Beuers U, Fischer S, Spengler U, Paumgartner G. Formation of iso-ursodeoxycholic acid during administration of ursodeoxycholic acid in man. *J. Hepatol* 1991;13(1):97–103.
- Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Pauletzki J, Fischer S, Paumgartner G. Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of the major hydrophobic bile acids in health and in chronic cholestatic liver disease. *Hepatology* 1992;15(4):603–8.
- Botham KM, Boyd GS. The metabolism of chenodeoxycholic acid to beta-muricholic acid in rat liver. *Eur. J. Biochem* 1983;134(1):191–6.
- Breitmaier E, Jung G. *Organische Chemie, Grundlagen, Verbindungsklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, Naturstoffe ; 133 Tabellen.* 6th ed. Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2009. XVIII, 1041 S. ISBN: 9783135415062.
- Brites D, Rodrigues CM, van-Zeller H, Brito A, Silva R. Relevance of serum bile acid profile in the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy in an high incidence area: Portugal. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1998;80(1):31–8.

- Burdelski M, Wirth S, Laufs R. Virale Hepatitis bei Kindern und Jugendlichen [Viral hepatitis in children and adolescence]. *Z Gastroenterol* 2004;42(8):731–3. ger.
- Cariou B. The farnesoid X receptor (FXR) as a new target in non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab* 2008;34(6 Pt 2):685–91.
- Chen S, Chang M, Du J, Lin C, Chen A, Lee H, Lau B, Yang Y, Wu T, Chu C, Lai M, Chen H. Screening for biliary atresia by infant stool color card in Taiwan. *Pediatrics* 2006;117(4):1147–54.
- Chretien Y, Poupon R, Gherardt MF, Chazouilleres O, Labbe D, Myara A, Trivin F. Bile acid glycine and taurine conjugates in serum of patients with primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic treatment. *Gut* 1989;30(8):1110–5.
- Cohen BI, Hofmann AF, Mosbach EH, Stenger RJ, Rothschild MA, Hagey LR, Yoon YB. Differing effects of nor-ursodeoxycholic or ursodeoxycholic acid on hepatic histology and bile acid metabolism in the rabbit. *Gastroenterology* 1986;91(1):189–97.
- Colombo C, Battezzati PM, Podda M. Hepatobiliary disease in cystic fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 1994;14(3):259–69.
- Colombo C, Crosignani A, Assaisso M, Battezzati PM, Podda M, Giunta A, Zimmer-Nechemias L, Setchell KD. Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis-associated liver disease: a dose-response study. *Hepatology* 1992;16(4):924–30.
- Cotting J, Lentze MJ, Reichen J. Effects of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis. *Gut* 1990;31(8):918–21.
- Crosignani A, Podda M, Battezzati PM, Bertolini E, Zuin M, Watson D, Setchell KD. Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration. *Hepatology* 1991;14(6):1000–7.
- Crosignani A, Del Puppo M, Longo M, Fabiani E de, Caruso D, Zuin M, Podda M, Javitt NB, Kienle MG. Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clin. Chim. Acta* 2007;382(1-2):82–8.
- Cullen SN, Rust C, Fleming K, Edwards C, Beuers U, Chapman RW. High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis is safe and effective. *J. Hepatol* 2008;48(5):792–800.
- D'Apolito O, Pianese P, Salvia G, Campanozzi A, Pettoello-Mantovani M, Dello Russo A, Corso G. Plasma levels of conjugated bile acids in newborns after a short period of parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010;34(5):538–41.
- Darling PB, Lepage G, Leroy C, Masson P, Roy CC. Effect of taurine supplements on fat absorption in cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* 1985;19(6):578–82.
- Dasarathy S, Yang Y, McCullough AJ, Marczewski S, Bennett C, Kalhan SC. Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23(5):382–8.
- Délèze G, Paumgartner G. Bile acids in serum and bile of infants with cholestatic syndromes. *Helv Paediatr Acta* 1977;32(1):29–38.
- Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 2001;121(1):140–7.
- Deutsch J, Huber W-D, Rodeck B. Pathophysiologie der Leberkrankheiten In: Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Hrsg. Rodeck B, Zimmer K., 2nd ed. Berlin: Springer; 2013. Online-Ressource. (SpringerLink: Bücher). ISBN: 978-3-642-24709-5, S. 490-95.
- Eklund A, Norman A, Strandvik B. Excretion of bile acids in healthy children and children with cystic fibrosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1980;40(7):595–608.

- El-Koofy NM, El-Mahdy R, Fahmy ME, El-Hennawy A, Farag MY, El-Karakasy HM. Alagille syndrome: clinical and ocular pathognomonic features. *Eur J Ophthalmol* 2011;21(2):199–206.
- Emerick KM, Elias MS, Melin-Aldana H, Strautnieks S, Thompson RJ, Bull LN, Knisely As, Whittington PF, Green RM. Bile composition in Alagille Syndrome and PFIC patients having Partial External Biliary Diversion. *BMC Gastroenterol* 2008;8:47.
- Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, Brouwer KLR, Sidney Barritt A. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2015;60(11):3318–28.
- Fischer S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Koebe HG. Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clin. Chim. Acta* 1996;251(2):173–86.
- Freedman MR, Holzbach RT, Ferguson DR. Pruritus in cholestasis: no direct causative role for bile acid retention. *Am. J. Med.* 1981;70(5):1011–6.
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(11):1118–29.
- Gnewuch C, Liebsch G, Langmann T, Dieplinger B, Mueller T, Haltmayer M, Dieplinger H, Zahn A, Stremmel W, Rogler G, Schmitz G. Serum bile acid profiling reflects enterohepatic detoxification state and intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol* 2009;15(25):3134–41.
- Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, Manickam K, Kim M, Kim KH, Shneider BL, Picarsic JL, Jacobson TA, Zhang J, He W, Liu P, Knisely As, Finegold MJ, Muzny DM, Boerwinkle E, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA, Eng CM, Yang Y, Washington GC, Porteus MH, Berquist WE, Kambham N, Singh RJ, Xia F, Enns GM, Moore DD. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Comms* 2016;7:10713.
- Grober J, Zaghini I, Fujii H, Jones SA, Kliever SA, Willson TM, Ono T, Besnard P. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J. Biol. Chem* 1999;274(42):29749–54.
- Hagey LR, Crombie DL, Espinosa E, Carey MC, Igimi H, Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J. Lipid Res* 1993;34(11):1911–7.
- Hardison WG. Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine. *Gastroenterology* 1978;75(1):71–5.
- Harnois DM, Angulo P, Jorgensen RA, Larusso NF, Lindor KD. High-dose ursodeoxycholic acid as a therapy for patients with primary sclerosing cholangitis. *Am. J. Gastroenterol* 2001;96(5):1558–62.
- Ho KJ. Circadian distribution of bile acid in the enterohepatic circulatory system in hamsters. *J. Lipid Res* 1976;17(6):600–4.
- Hofmann AF. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1994;204:1–15.
- Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch. Intern. Med.* 1999;159(22):2647–58.
- Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci* 2008;65(16):2461–83.
- Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci* 1999;14:24–9.
- Hruz P, Zimmermann C, Gutmann H, Degen L, Beuers U, Terracciano L, Drewe J, Beglinger C. Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis. *Gut* 2006;55(3):395–402.

- Iwaki T, Ishizaki K, Kinoshita S, Tanaka H, Fukunari A, Tsurufuji M, Imada T. Protective effects of ursodeoxycholic acid on chenodeoxycholic acid-induced liver injury in hamsters. *World J. Gastroenterol* 2007;13(37):5003–8.
- Jacquemin E, Dumont M, Bernard O, Erlinger S, Hadchouel M. Evidence for defective primary bile acid secretion in children with progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease). *Eur. J. Pediatr* 1994;153(6):424–8.
- Jahnel J, Zöhrer E, Alisi A, Ferrari F, Ceccarelli S, Vito R de, Scharnagl H, Stojakovic T, Fauler G, Trauner M, Nobili V. Serum Bile Acid Levels in Children with NAFLD. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2015:1.
- Janssen J, Laatz W. Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows, Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul exakte Tests ; mit 193 Tabellen. 6th ed. Berlin [u.a.]: Springer; 2007. XV, 817 S. ISBN: 978-3-540-72977-8.
- Javitt NB, Keating JP, Grand RJ, Harris RC. Serum bile acid patterns in neonatal hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *J. Pediatr* 1977;90(5):736–9.
- Jones MB, Weinstock S, Koretz RL, Lewin KJ, Higgins J, Gitnick GL. Clinical value of serum bile acid levels in chronic hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 1981;26(11):978–83.
- Jorge A, Findor J, Esley C, Bruch E. Primary sclerosing cholangitis. *Z Gastroenterol* 1988;26(6):322–30.
- Kardorff R, Melter M, Rodeck B, Brodehl J. Langfristige Ursodeoxycholsäurebehandlung cholestatischer Lebererkrankungen des Kindesalters--klinische und biochemische Effekte [Long-term ursodeoxycholic acid treatment of cholestatic liver diseases in childhood--clinical and biochemical effects]. *Klin Padiatr* 1996;208(3):118–22. ger.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem* 2003;278(11):9435–40.
- Kosters A, Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica* 2008;38(7-8):1043–71.
- Kruis W, Kalek HD, Stellaard F, Paumgartner G. Altered fecal bile acid pattern in patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 1986;35(4):189–98.
- Landrier J, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2006;290(3):G476-85.
- Rodeck B, Santer R, Muschol N, Burdelski M, Melter M, Ganschow R, Baumann U. Stoffwechselerkrankungen. In: Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Hrsg. Rodeck B, Zimmer K., 2nd ed. Berlin: Springer; 2013. Online-Ressource. (SpringerLink: Bücher). ISBN: 978-3-642-24709-5, S. 445-57.
- Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J. Hepatol.* 2001;35(1):134–46.
- Lefebvre D, Ratelle S, Chartrand L, Roy CC. Reduced microbial transformation of bile acids in cystic fibrosis. *Experientia* 1977;33(5):616–8.
- Li-Hawkins J, Gåfvels M, Olin M, Lund EG, Andersson U, Schuster G, Björkhem I, Russell DW, Eggertsen G. Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *J. Clin. Invest* 2002;110(8):1191–200.
- Lindor KD. Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group. *N. Engl. J. Med* 1997;336(10):691–5.
- Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VAC, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, Harnois D, Jorgensen R, Petz J, Keach J, Mooney J, Sargeant C, Braaten J, Bernard T, King D, Miceli E, Schmoll J, Hoskin T, Thapa P, Enders F. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2009;50(3):808–14.

- Maillette Buy Wenniger L de, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis* 2010;42(6):409–18.
- Makino I, Shinozaki K, Yoshino K, Nakagawa S. [Dissolution of cholesterol gallstones by long-term administration of ursodeoxycholic acid]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1975;72(6):690–702. jpn.
- Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;296(5571):1313–6.
- Mannes GA, Stellaard F, Paumgartner G. Diagnostic sensitivity of fasting and postprandial serum bile acids determined by different methods. *Clin. Chim. Acta* 1987;162(2):147–54.
- Martin IV, Schmitt J, Minkenberg A, Mertens JC, Stieger B, Mullhaupt B, Geier A. Bile acid retention and activation of endogenous hepatic farnesoid-X-receptor in the pathogenesis of fatty liver disease in ob/ob-mice. *Biol. Chem* 2010;391(12):1441–9.
- McCormick WC, Bell CC, Swell L, Vlahcevic ZR. Cholic acid synthesis as an index of the severity of liver disease in man. *Gut* 1973;14(11):895–902.
- McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am. J. Hum. Genet* 2006;79(1):169–73.
- Meier PJ. Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am. J. Physiol* 1995;269(6 Pt 1):G801–12.
- Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu. Rev. Physiol* 2002;64:635–61.
- Melter M, Petersen C, Sturm E. Neonatale Cholestase. In: *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. Hrsg. Rodeck B, Zimmer K., 2nd ed. Berlin: Springer; 2013. Online-Ressource. (SpringerLink: Bücher). ISBN: 978-3-642-24709-5, S. 427-31.
- Mihas AA, Gibson RG, Levy N, Hirschowitz BI. Serum-bile-acids in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1977;2(8034):405–6.
- Mitchell SA, Bansal DS, Hunt N, Bergmann K v., Fleming KA, Chapman RW. A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2001;121(4):900–7.
- Muntau A. Intensivkurs Pädiatrie, Mit 130 Tabellen. 6th ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2011. ca. 562 S. ISBN: 978-3-437-43393-1.
- Nemeth A, Samuelson K, Strandvik B. Serum bile acids as markers of juvenile liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 1982;1(4):479–83.
- Nijima S. Studies on the conjugating activity of bile acids in children. *Pediatr. Res* 1985;19(3):302–7.
- O'Brien S, Mulcahy H, Fenlon H, O'Broin A, Casey M, Burke A, FitzGerald MX, Hegarty JE. Intestinal bile acid malabsorption in cystic fibrosis. *Gut* 1993;34(8):1137–41.
- Oude Elferink RPJ, Paulusma CC, Groen AK. Hepatocanalicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* 2006;130(3):908–25.
- Pandak WM, Bohdan P, Franklund C, Mallonee DH, Eggertsen G, Björkhem I, Gil G, Vlahcevic ZR, Hylemon PB. Expression of sterol 12alpha-hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology* 2001;120(7):1801–9.
- Pawłowska J, Bogoniowska Z, Szczygielska-Kozak M, Wróblewska Z, Socha J. Value of bile acid determination for the diagnosis of neonatal jaundice. *Mater Med Pol* 1990;22(2):112–7.
- Pennington CR, Ross PE, Bouchier IA. Serum bile acids in patients with viral hepatitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1978;13(1):77–80.
- Perez M, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J. Gastroenterol* 2009;15(14):1677–89.
- Perlmutter DH. The cellular basis for liver injury in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 1991;13(1):172–85.

- Pircher PC, Kitto JL, Petrowski ML, Tangirala RK, Bischoff ED, Schulman IG, Westin SK. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J. Biol. Chem* 2003;278(30):27703–11.
- Poupon RE, Balkau B, Eschwège E, Poupon R. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group. *N. Engl. J. Med* 1991;324(22):1548–54.
- Poupon R, Chretien Y, Parquet M, Ballet F, Rey C, Infante R. Hepatic transport of bile acids in the isolated perfused rat liver. Structure-kinetic relationship. *Biochem. Pharmacol.* 1988;37(2):209–12.
- Poupon R, Chrétien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987;1(8537):834–6.
- Poupon RE, Chrétien Y, Poupon R, Paumgartner G. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology* 1993;17(4):599–604.
- Poupon RY, Poupon RE, Lebrech D, Le Quernec L, Darnis F. Mechanisms for reduced hepatic clearance and elevated plasma levels of bile acids in cirrhosis. A study in patients with an end-to-side portacaval shunt. *Gastroenterology* 1981;80(6):1438–44.
- Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11(1):74–80.
- Rao A, Haywood J, Craddock AL, Belinsky MG, Kruh GD, Dawson PA. The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008;105(10):3891–6.
- Renner EL, Lake JR, Cragoe EJ, van Dyke RW, Scharschmidt BF. Ursodeoxycholic acid choleresis: relationship to biliary HCO₃ and effects of Na⁺-H⁺ exchange inhibitors. *Am. J. Physiol* 1988;254(2 Pt 1):G232–41.
- Robb TA, Davidson GP, Kirubakaran C. Conjugated bile acids in serum and secretions in response to cholecystokinin/secretin stimulation in children with cystic fibrosis. *Gut* 1985;26(11):1246–56.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. Chenodeoxycholate is a potent inducer of the permeability transition pore in rat liver mitochondria. *Biosci. Rep* 2001;21(1):73–80.
- Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin. Sci* 2011;121(12):523–44.
- Rost D, Rudolph G, Kloeters-Plachky P, Stiehl A. Effect of high-dose ursodeoxycholic acid on its biliary enrichment in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004;40(3):693–8.
- Roy CC, Weber AM, Morin CL, Combes JC, Nusslé D, Mégevand A, Lasalle R. Abnormal biliary lipid composition in cystic fibrosis. Effect of pancreatic enzymes. *N. Engl. J. Med* 1977;297(24):1301–5.
- Rubin RA, Kowalski TE, Khandelwal M, Malet PF. Ursodiol for hepatobiliary disorders. *Ann. Intern. Med.* 1994;121(3):207–18.
- Rudman D, Kendall FE. Bile acid content of human serum. II. The binding of cholanic acids by human plasma proteins. *J. Clin. Invest.* 1957;36(4):538–42.
- Rudolph G, Ende R, Senn M, Stiehl A. Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of cholic acid and chenodeoxycholic acid in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1993;17(6):1028–32.
- Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992;31(20):4737–49.
- Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem* 2003;72:137–74.
- Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J. Lipid Res* 2009;50:S120–5.

- Saksena S, Tandon RK. Ursodeoxycholic acid in the treatment of liver diseases. *Postgrad Med J* 1997;73(856):75–80.
- Sambrotta M, Strautnieks S, Papouli E, Rushton P, Clark BE, Parry DA, Logan CV, Newbury LJ, Kamath BM, Ling S, Grammatikopoulos T, Wagner BE, Magee JC, Sokol RJ, Mieli-Vergani G, Smith JD, Johnson CA, McClean P, Simpson MA, Knisely As, Bull LN, Thompson RJ. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet* 2014;46(4):326–8.
- Santos JL, Choquette M, Bezerra JA. Cholestatic liver disease in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12(1):30–9.
- Sauer P, Benz C, Rudolph G, Klöters-Plachky P, Stremmel W, Stiehl A. Influence of cholestasis on absorption of ursodeoxycholic acid. *Dig. Dis. Sci.* 1999;44(4):817–22.
- Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G, Liebisch G. Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 2009;877(30):3920–5.
- Schlattjan JH, Winter C, Greven J. Regulation of renal tubular bile acid transport in the early phase of an obstructive cholestasis in the rat. *Nephron Physiol* 2003;95(3):p49-56.
- Schölmerich J, Becher MS, Schmidt K, Schubert R, Kremer B, Feldhaus S, Gerok W. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology* 1984;4(4):661–6.
- Setchell KD, Smethurst P, Giunta AM, Colombo C. Serum bile acid composition in patients with cystic fibrosis. *Clin. Chim. Acta* 1985;151(2):101–10.
- Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann. Intern. Med* 1997;126(2):137–45.
- Shonsey EM, Sfakianos M, Johnson M, He D, Falany CN, Falany J, Merkler DJ, Barnes S. Bile acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase in the amino acid conjugation of bile acids. *Meth. Enzymol* 2005;400:374–94.
- Silveira MG, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis. *Can. J. Gastroenterol* 2008;22(8):689–98.
- Silveira M, Lindor K. Clinical features and management of primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol.* 2008;14(21):3338–49.
- Sinakos E, Marschall H, Kowdley KV, Befeler A, Keach J, Lindor K. Bile acid changes after high-dose ursodeoxycholic acid treatment in primary sclerosing cholangitis: Relation to disease progression. *Hepatology* 2010;52(1):197–203.
- Smith JL, Lewindon PJ, Hoskins AC, Pereira TN, Setchell KDR, O'Connell NC, Shepherd RW, Ramm GA. Endogenous ursodeoxycholic acid and cholic acid in liver disease due to cystic fibrosis. *Hepatology* 2004;39(6):1673–82.
- Squires RH. Autoimmune hepatitis in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6(3):225–30.
- Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001;98(6):3369–74.
- Strandvik B, Einarsson K, Lindblad A, Angelin B. Bile acid kinetics and biliary lipid composition in cystic fibrosis. *J. Hepatol* 1996;25(1):43–8.
- Strandvik B, Samuelson K. Fasting serum bile acid levels in relation to liver histopathology in cystic fibrosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1985;20(3):381–4.
- Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24(5):555–71.
- Sveger T. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1988;77(6):847–51.
- Takikawa H, Beppu T, Seyama Y. Urinary concentrations of bile acid glucuronides and sulfates in hepatobiliary diseases. *Gastroenterol. Jpn* 1984;19(2):104–9.

- Tazawa Y, Yamada M, Nakagawa M, Konno T, Tada K. Serum bile acid patterns determined by an enzymatic method and high-performance liquid chromatography in young infants with cholestasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 1984;3(3):394–401.
- Tazawa Y, Yamada M, Nakagawa M, Konno T, Tada K. Bile acid profiles in siblings with progressive intrahepatic cholestasis: absence of biliary chenodeoxycholate. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 1985;4(1):32–7.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(8):678–93.
- Thompson GN. Assessment of taurine deficiency in cystic fibrosis. *Clin. Chim. Acta* 1988;171(2-3):233–7.
- Thompson GN, Davidson GP. In vivo bile acid uptake from terminal ileum in cystic fibrosis. *Pediatr. Res*
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev* 2003;83(2):633–71.
- Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis* 2010;28(1):220–4.
- Trauner M, Fickert P, Baghdasaryan A, Claudel T, Halilbasic E, Moustafa T, Wagner M, Zollner G. New insights into autoimmune cholangitis through animal models. *Dig Dis* 2010;28(1):99–104.
- Tribe RM, Dann AT, Kenyon AP, Seed P, Shennan AH, Mallet A. Longitudinal profiles of 15 serum bile acids in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105(3):585–95.
- Trottier J, Bialek A, Caron P, Straka RJ, Heathcote J, Milkiewicz P, Barbier O. Metabolomic profiling of 17 bile acids in serum from patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: a pilot study. *Dig Liver Dis* 2012;44(4):303–10.
- van de Meeberg PC, Wolfhagen FH, van Berge-Henegouwen GP, Salemans JM, Tangerman A, van Buuren HR, van Hattum J, van Erpecum KJ. Single or multiple dose ursodeoxycholic acid for cholestatic liver disease: biliary enrichment and biochemical response. *J. Hepatol* 1996;25(6):887–94.
- Vlahcevic ZR, Buhac I, Bell CC, Swell L. Abnormal metabolism of secondary bile acids in patients with cirrhosis. *Gut* 1970;11(5):420–2.
- Vlahcevic ZR, Prugh MF, Gregory DH, Swell L. Disturbances of bile acid metabolism in parenchymal liver cell disease. *Clin Gastroenterol* 1977;6(1):25–43.
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 1999;3(5):543–53.
- Weber AM, Roy CC, Morin CL, Lasalle R. Malabsorption of bile acids in children with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med* 1973;289(19):1001–5.
- Weiβ C. Basiswissen medizinische Statistik, Mit 14 Tabellen ; [mit Epidemiologie]. 5th ed. Berlin: Springer; 2010. XIV 354 S. ISBN: 978-3-642-11336-9.
- Whittington PF, Freese DK, Alonso EM, Schwarzenberg SJ, Sharp HL. Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 1994;18(2):134–41.
- Whittington PF, Whittington GL. Partial external diversion of bile for the treatment of intractable pruritus associated with intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1988;95(1):130–6.
- Wieland S, Hertkorn A, Dunkel F. Heinrich Wieland, Naturforscher, Nobelpreisträger und Willstätters Uhr. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. viii, 255. ISBN: 978-3527323333.
- Wirth S, Bialek R, Baumann U. Hepatitiden. In: Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. Hrsg. Rodeck B, Zimmer K., 2nd ed. Berlin: Springer; 2013. Online-Ressource. (SpringerLink: Bücher). ISBN: 978-3-642-24709-5, S. 490-95.

- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J. Gastroenterol* 2006;12(22):3553–63.
- Yoshida T, McCormick WC, Swell L, Vlahcevic ZR. Bile acid metabolism in cirrhosis. IV. Characterization of the abnormality in deoxycholic acid metabolism. *Gastroenterology* 1975;68(2):335–41.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Bedeutung
α 1-AT-Mangel	Alpha1-Antitrypsin-Mangel
AGS	Alagille-Syndrom
AIC	Autoimmuncholangitis
AIH	Autoimmunhepatitis
AP	Alkalische Phosphatase
ASBT	Apical sodium dependent bile acid transporter
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under curve
BACS	Bile acid-coenzyme A synthetase
BAT	Bile acid coenzyme A: amino acid N-Acyltransferase
BMI	Body Mass Index
BRIC	Benigne rekurrierende intrahepatische Cholestase
BSEP	Bile salt exportary pump
CA	Cholic acid, Cholsäure
CDCA	Chenodeoxycholic acid, Chenodeoxycholsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CF	Zystische Fibrose
CFLD	CF assoziierte Lebererkrankungen
CFTR	Cystis fibrosis transmembrane conductance regulator
CHE	Cholinesterase
CrP	C-reaktives Protein
DCA	Deoxycholic acid, Deoxycholsäure
EHC	Enterohepatischer Kreislauf
FXR	Nuclear bile-acid-receptor
γ -GT	Gamma-GT
G	Glycin
GCA	Glyco-cholic acid, Glycocholsäure
GCDCA	Glyco-chenocholic acid, Glycochenocholsäure
GDCA	Glyco-deoxycholic acid, Glycodeoxycholsäure
GGA	Gallengangatresie
GK	Gesamtkonzentration

GLCA	Glyco-lithocolic acid, Glyolithocholsäure
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPCR	G-protein-coupled receptor
GS	Gallensäuren
GS-Pool	Gallensäure-Pool
GUDCA	Glyco-ursodeoxycholic acid, Glycoursodeoxycholsäure
HDL	High density lipoprotein, Lipoprotein hoher Dichte
I-BABP	Ileal bile acid binding protein
KG	Körpergewicht
LC	Liquidchromatographie
LCA	Lithocholic acid, Lithocholsäure
LDL	Low density lipoprotein, Lipoprotein niedriger Dichte
Log	Logarithmiert
MDR	Multidrug resistance Glykoprotein
MRP	Multidrug resistance associated protein
MS	Massenspektrometrie
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholisch bedingte Fettleber-Hepatitis
NTCP	Natrium taurocholate co-transporting peptide
OATP	Organic anion transport polypeptides
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
OST	Organic solute transporter
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PC	Phosphatidylcholin
PFIC	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
ROC	Receiver operating characteristic
T	Taurin
TCA	Tauro-cholic acid, Taurocholsäure
TCDCA	Tauro-chenodeoxycholic acid, Taurochenodeoxycholsäure
TDCA	Tauro-deoxycholic acid, Taurodeoxycholsäure
TLCA	Tauro-lithocholic acid, Tauroolithocholsäure

TUDCA	Tauro-ursodeoxycholic acid, Tauroursodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholic acid, Ursodeoxycholsäure
UDP	Uridindiphosphoglukuronat
VLDL	very low density lipoprotein, Lipoprotein sehr niedriger Dichte

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Mithilfe und Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Melter für die Vergabe des interessanten Themas, die Übernahme der Doktorvaterschaft, die engagierte und sehr kompetente Betreuung mit konstruktiven Ratschlägen und die Korrektur des Manuskriptes.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Jan Vermehren für die langjährige umfassende Betreuung bedanken. Er stand mir mit sehr großem fachlichem Wissen zur Seite und gab mir viele Anregungen und hilfreiche Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas einschließlich der Korrektur des Manuskriptes. Er erklärte mir die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens und unterstützte mich mit seiner großen Hilfsbereitschaft insbesondere bei der Vorstellung des Themas auf Kongressen. Neben der Doktorarbeit bestärkte er mich bei der Wahl meines jetzigen Fachgebietes der Pädiatrie, was ich bis heute noch keinen Tag bereut habe.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der pädiatrischen Gastroenterologie und Hepatologie des Uniklinikums Regensburg für die Unterstützung bei der Rekrutierung von Studienteilnehmern. Hinsichtlich statistischer Fragen zur Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Florian Zemann vom Zentrum für klinische Studien in Regensburg.

Als letztes möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinem Freund und Freunden für ihre große Unterstützung und Motivation bedanken.

Anhang

A Patienteninformationen mit Einwilligungserklärungen für die Eltern und pädiatrischen Patienten



Eltern-Information und Einwilligungserklärung zur Durchführung einer klinischen Beobachtungsstudie

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Regensburg,
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg, Tel. 0941 944 2001

Projektleiter: Jan Vermehren
Stellvertreter: Dr. med. Dirk Grothues

Evaluation der massenspektrometrischen Untersuchung von Gallensäureprofilen in der Differentialdiagnostik cholestatischer Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter und zum therapeutischen Drug monitoring der Behandlung mit Ursodeoxycholsäure

Sehr geehrte Mutter, sehr geehrter Vater,

wir möchten Sie fragen, ob Sie als Erziehungsberechtigte Ihres Kindes damit einverstanden sind, dass Ihr Kind an der von uns vorgesehenen klinischen Studie teilnimmt.

Diese klinische Studie wird an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt; sie wurde von der Ethikkommission an der Universität Regensburg zustimmend bewertet.

Die Teilnahme Ihres Kindes an dieser klinischen Studie ist freiwillig. Ihr Kind wird in diese Studie nur dann einbezogen, wenn Sie dazu schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie eine Teilnahme Ihres Kindes nicht wünschen oder Ihre Einwilligung zu einem beliebigen Zeitpunkt zurückziehen möchten, entstehen Ihrem Kind keine Nachteile.

Der nachfolgende Text soll Ihnen die Ziele und den Ablauf erläutern. Für Fragen steht Ihnen der behandelnde Arzt zur Verfügung.

1. Warum wird diese Studie durchgeführt?

Bei Ihrem Kind wurde eine Erkrankung der Leber oder der Gallenwege festgestellt. Für die Prognose und den weiteren Verlauf ist eine rasche Diagnosestellung von entscheidender Bedeutung.

In der Leber werden Gallensäuren produziert und über die Gallenwege in den Darm ausgeschieden. Bei einer Erkrankung, wie sie bei Ihrem Kind vorliegt, kann es durch eine Verminderung der Ausscheidung in den Darm zu einer Erhöhung der Gallensäuren im Blut kommen. Die Messung der Gallensäuren im Blut ist daher ein wichtiger Bestandteil der Laboruntersuchungen. Sie dient der Diagnosefindung und der Verlaufskontrolle.

Die natürlich vorkommende Gallensäure Ursodeoxycholsäure ist eine „gute“ Gallensäure. Sie beeinflusst nicht nur den Juckreiz günstig, sondern verlangsamt zum Teil auch das Fortschreiten der Erkrankung. Die Gabe von Ursodeoxycholsäure ist deshalb ein wichtiger Pfeiler in der medikamentösen Therapie von Erkrankungen der Leber und der Gallenwege.



In unserer Klinik wurde die Methode zur Gallensäuren-Bestimmung umgestellt, um zusätzlich zur Messung der Gesamtgallensäuren die verschiedenen Abbauprodukte der Gallensäuren zu bestimmen, sowie zwischen körpereigenen Gallensäuren und der therapeutisch zugeführten Ursodeoxycholsäure zu unterscheiden. Diese neue Methode ist bereits jetzt schon Teil der Routinediagnostik. Durch die Auswertung der Daten von Patienten mit Erkrankungen der Leber und der Gallenwege, die in unserer Kinderklinik betreut werden, erhoffen wir uns künftig durch die bessere und genauere Interpretation der Gallensäureprofile zusätzliche Informationen zu erhalten, die bei der rationellen Planung der weiteren Diagnostik und der raschen Diagnosestellung hilfreich sein können.

2. Wie ist der Ablauf der Studie und was ist bei der Teilnahme zu beachten?

Es werden keine zusätzlichen ambulanten Maßnahmen, eine stationäre Vorstellung in der Klinik oder weitere Blutentnahmen notwendig sein. Im Rahmen dieser Studie werden lediglich die relevanten Daten unter Berücksichtigung des Datenschutzes erhoben und statistisch ausgewertet.

3. Welchen persönlichen Nutzen habe ich von der Teilnahme an der Studie?

Ihr Kind wird durch die Teilnahme an dieser Studie keinen persönlichen Gesundheitsnutzen haben. Die Ergebnisse der Studie können aber dazu beitragen, Gallensäureprofile in Zukunft besser beurteilen zu können. Dadurch könnte sich eine schnellere Diagnosestellung bei Lebererkrankungen ergeben.

4. Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Es werden im Rahmen dieser Studie keine diagnostischen oder therapeutischen Maßnahmen eingeleitet, die nicht bereits jetzt schon Bestandteil der Routine sind. Zusätzliche Risiken sind daher nicht zu erwarten.

5. Wer darf an dieser klinischen Studie teilnehmen und entstehen Kosten durch die Teilnahme?

In diese Studie werden Kinder und Jugendliche von 0 bis 17 Jahren aufgenommen mit dem Verdacht oder dem Nachweis einer Lebererkrankung. Durch Ihre Teilnahme an dieser klinischen Studie entstehen für Sie keine Kosten.

6. Was geschieht mit den Daten meines Kindes?

Während der klinischen Studie werden persönliche Daten und medizinische Befunde von Ihrem Kind erhoben. Die für diese klinische Studie wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben.

Die Pseudonymisierung bedeutet, dass bei der Speicherung und Auswertung der Daten keine Daten, wie der Name oder das Geburtsdatum Ihres Kindes verwendet werden, die eine Identifizierung ermöglichen. Stattdessen wird ein Nummern- und/oder Buchstabencode verwendet. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert.



Evaluation der massenspektrometrischen Untersuchung von Gallensäureprofilen in der Differentialdiagnostik cholestatischer Lebererkrankungen im Kindes- und Jugendalter und zum therapeutischen Drug monitoring der Behandlung mit Ursodeoxycholsäure

Einwilligungserklärung für Eltern

.....
Name des **Patienten** in Druckbuchstaben

Ich wurde in Vertretung für mein Kind ausführlich über die klinische Studie sowie über ihren Ablauf, ihre Bedeutung und die Vorteile und Risiken aufgeklärt. Ich habe darüber hinaus den Text der Elterninformation sowie den hier nachfolgend abgedruckten Text gelesen und verstanden.

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Laborbefunde über mein Kind erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Ich bin damit einverstanden, dass die einleitend genannten Personen bzw. Mitarbeiter der Kinderklinik Einblick in die Krankenunterlagen nehmen.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass Nachteile in der weiteren ärztlichen Betreuung entstehen. Beim Widerruf meiner Einwilligung in die Studienteilnahme meines Kindes habe ich das Recht, die Löschung aller bis dahin gespeicherten personenbezogenen Daten zu verlangen.

Ich bin damit einverstanden, dass ich keine individuellen Rückinformationen über die Ergebnisse der Studie erhalte.

Ich hatte ausreichend Zeit, um meine Entscheidung zur Teilnahme zu überdenken und frei zu treffen.

Mir wurde eine Kopie der Elterninformation und der Einwilligungserklärung ausgehändigt.



**Ich erkläre mich in Vertretung für mein Kind zur Teilnahme
an der oben genannten klinischen Studie bereit.**

.....
Name des **Patienten** in Druckbuchstaben

.....
Ort und Datum

.....
Name und Unterschrift des/der **Erziehungsberechtigten**

Ich habe die Einwilligung des/der Erziehungsberechtigten eingeholt.

.....
Name des **behandelnden Arztes** in Druckbuchstaben

.....
Ort und Datum

.....
Name und Unterschrift des **behandelnden Arztes**

B Fragebogen für die ambulante Vorstellung bzw. während des stationären Aufenthaltes

Klinische Studie zur Evaluation von Gallensäurenprofilen
in der Differentialdiagnostik cholestatischer Lebererkrankungen

Patientenetikett	Datum:..... Größe:..... Gewicht:.....
Diagnose/Verdachtsdiagnose: <input type="checkbox"/> Gallengangatresie <input type="checkbox"/> Alagille-Syndrom – arteriohepatische Dysplasie <input type="checkbox"/> PFIC - Progressive familiäre intrahepatische Cholestase <input type="checkbox"/> Cholangiodysplasie <input type="checkbox"/> Unklare Hepatopathie <input type="checkbox"/> Andere:.....	
Medikation (Wirkstoff/Dosierung/Handelspräparat): Ursodeoxycholsäure <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Tagesdosierung:..... Supplementierung mit mittelkettigen Triglyceriden <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Nüchternzeit vor der Blutentnahme: Bei Nüchternzeit < 8 h, Art der letzten Mahlzeit	
Cholestasezeichen: Pruritus Score: <input type="checkbox"/> 0: fehlend <input type="checkbox"/> I: vorhanden, aber ohne erkennbare Kratzdefekte der Haut <input type="checkbox"/> II: gelegentliche, zwischendurch abheilende Kratzdefekte <input type="checkbox"/> III: ständig vorhandene, deutliche Kratzspuren <input type="checkbox"/> IV: wie III, mit regelmäßig durch den Juckreiz gestörte Nachtruhe Sekundäre Leberhautzeichen: <input type="checkbox"/> Spider-Naevi <input type="checkbox"/> Uhrglasnägel <input type="checkbox"/> Palmarerythem <input type="checkbox"/> nein	
Operationen am Gastrointestinaltrakt: <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	
Stuhlfarbe: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Entfärbt	

C Z-Score für den Parameter Body Mass Index (BMI)

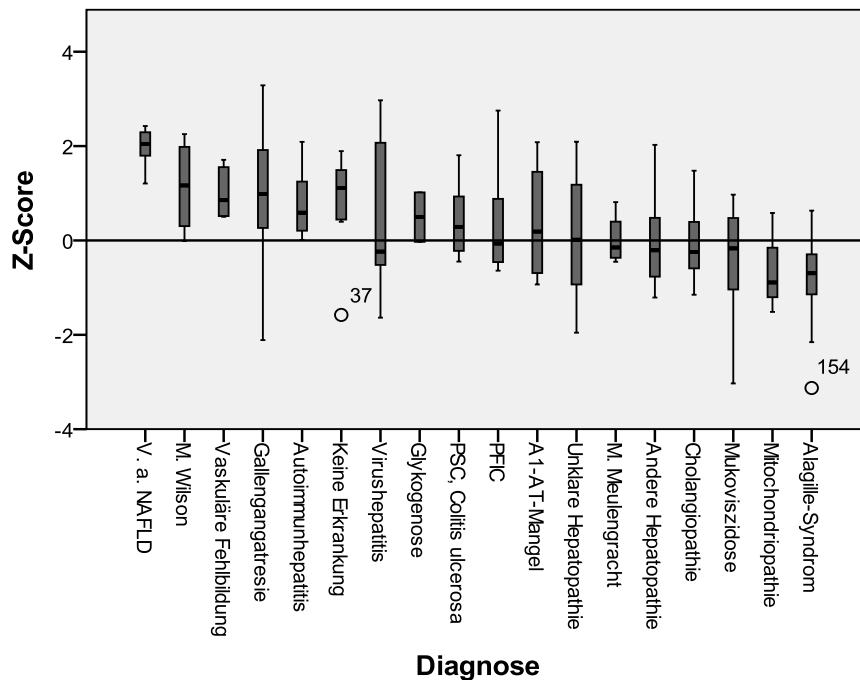


Abbildung 36: Box- and Whiskers-Plots des Z-Scores

Anhand der Abbildung 36 lässt sich erkennen, dass die Patienten mit NAFLD einen hohen Z-Score aufweisen, was auch den klinischen Eindruck bestätigt. Einige Diagnosen zeigen eine große Streubreite wie GGA, PFIC, CF und Virushepatitis. Die Berechnung des Z-Scores berücksichtigte nicht das Auftreten von beispielsweise Aszites und kann somit verfälscht sein. Sehr niedrige Z-Scores finden sich beim Alagille-Syndrom, Mitochondriopathie, CF und Cholangiopathie.

D Sekundäre Leberhautzeichen und Pruritus

Von den sekundären Leberhautzeichen wurden nur Spider-Naevi und Palmarerythem bei den Patienten gefunden. Bei Patienten mit GGA, Unklarer Hepatopathie, PSC und Vaskuläre Malformation wurden Spider-Naevi im Fragebogen erfasst (Abbildung 37).

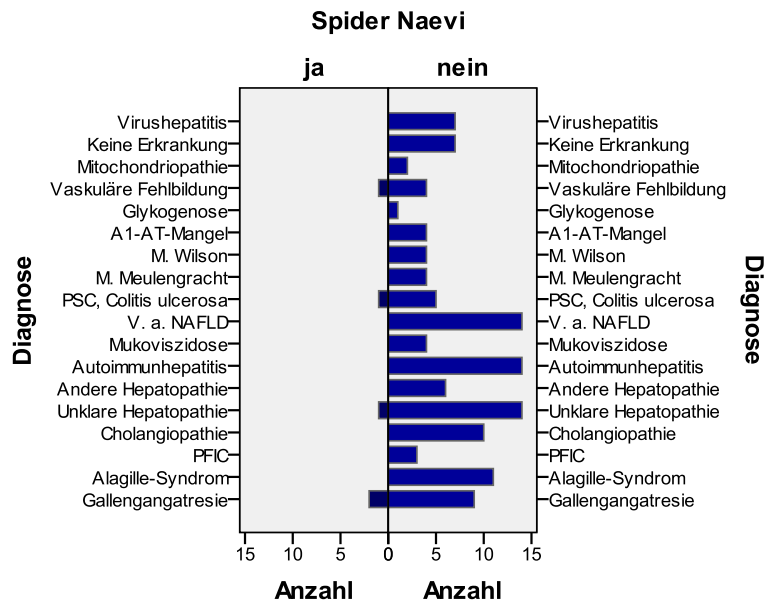


Abbildung 37: Sekundäre Leberhautzeichen, Spider Naevi

Ein Palmarerythem tritt im Patientenkollektiv bei den Erkrankungen GGA, Cholangiopathie, Andere Hepatopathie, PSC, α 1-AT-Mangel und Vaskuläre Malformation auf (Abbildung 38).

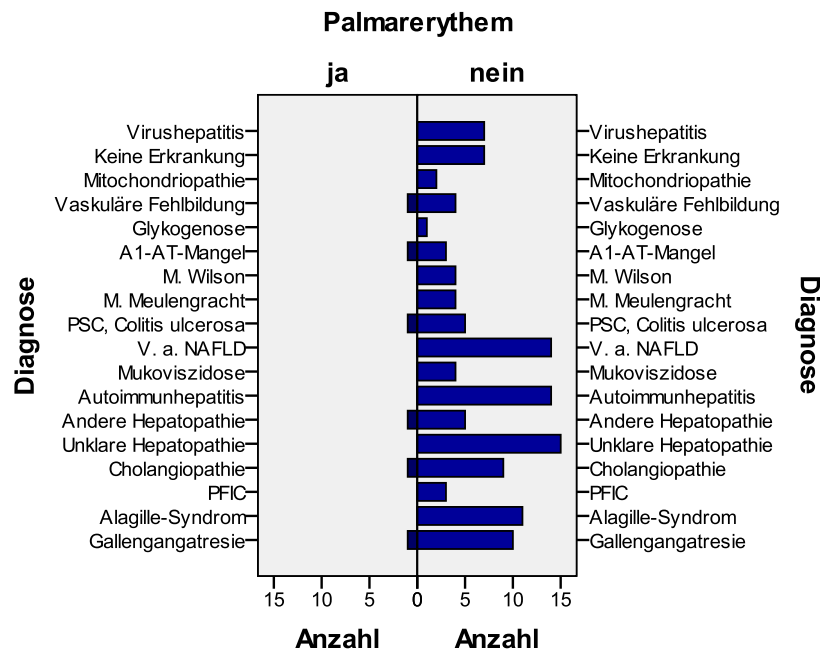


Abbildung 38: Sekundäre Leberhautzeichen, Palmarerythem

Der Juckreiz wird in fünf Kategorien klassifiziert. Ein Pruritus wird bei Patienten mit GGA (n=6), Alagille-Syndrom (n=8), PFIC (n=4), Cholangiopathie (n=1),

Autoimmunhepatitis (n=1) und bei einer Patientin mit Langerhans-Zell-Histiozytose (geführt unter der Kategorie: Andere Hepatopathie) angegeben (Abbildung 39).

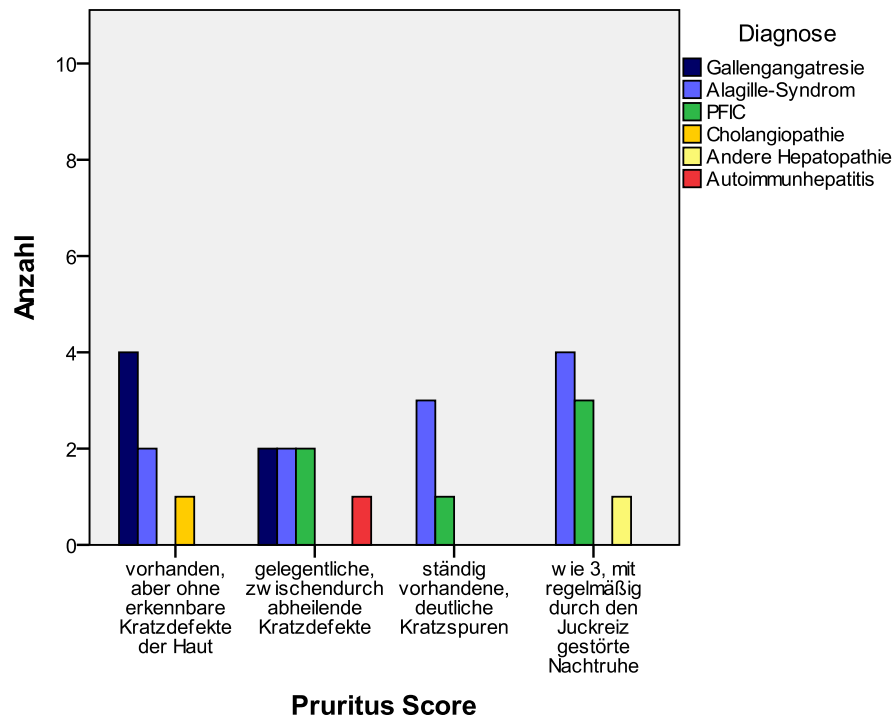


Abbildung 39: Pruritus Score

E GS-Profil bei cholangiodysplastischen Erkrankungen

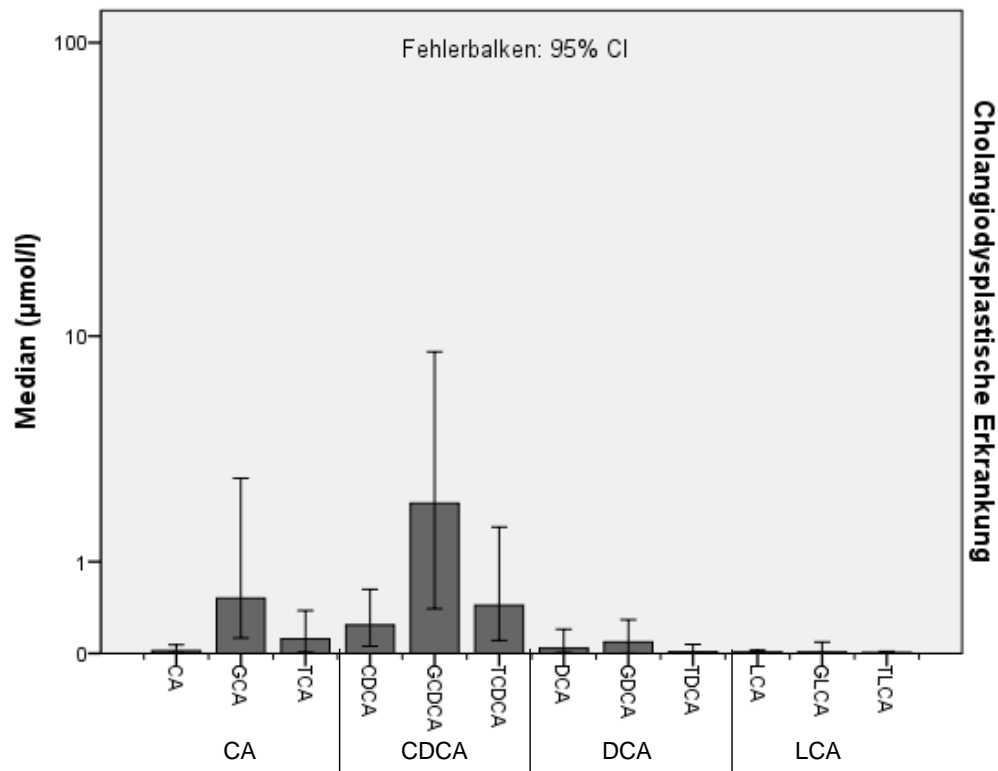


Abbildung 40: GS-Profil bei Cholangiopathie

Die Diagnosegruppe Cholangiopathie besteht aus 11 Patienten. Eine physiologische GS-Zusammensetzung findet sich bei 5 Patienten, davon haben drei eine zystische Erkrankung und zwei eine kongenitale Leberfibrose. Bei den anderen sechs Patienten zeigt sich eine Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS mit Erhöhung der konjugierten primären GS ohne den Nachweis von unkonjugierten und sekundären GS.

G GS-Profil bei hepatischen Stoffwechselerkrankungen

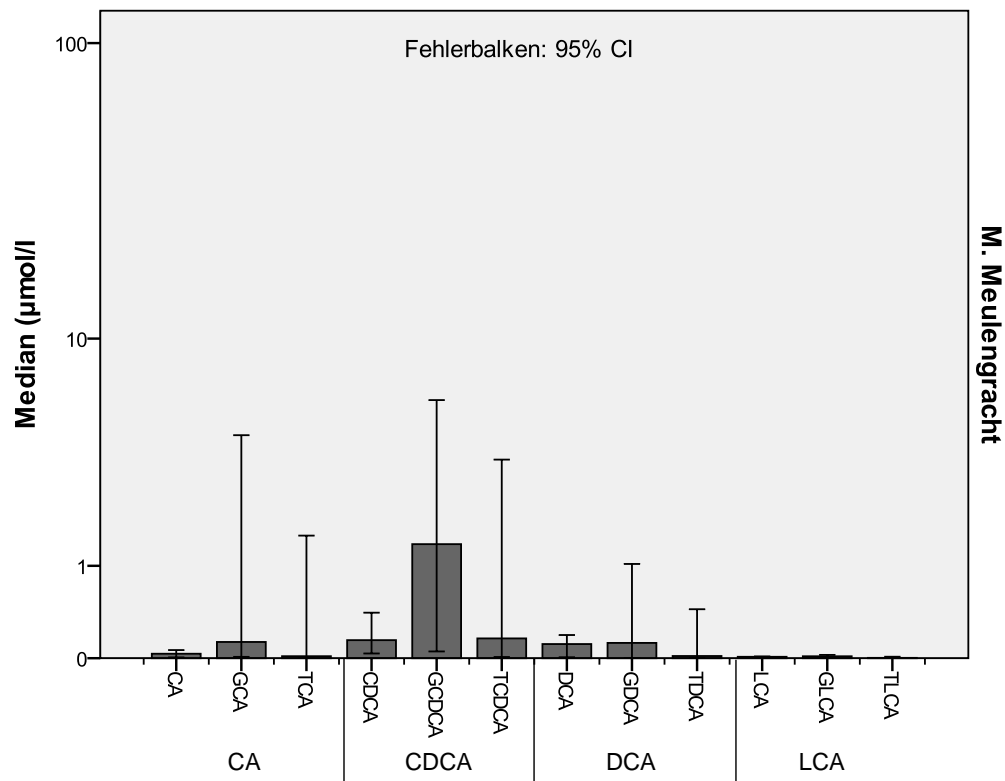


Abbildung 41: GS-Profil bei Morbus Meulengracht

An Morbus Meulengracht sind vier Patienten (n=4) erkrankt (Abbildung 41). Die Gesamtkonzentration der GS weist einen Median von 2,7 µmol/l aus und somit keine Erhöhung der Gesamt-GS. Ebenso lassen sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung primäre zu sekundäre GS und in Bezug auf Konjugation nachweisen.

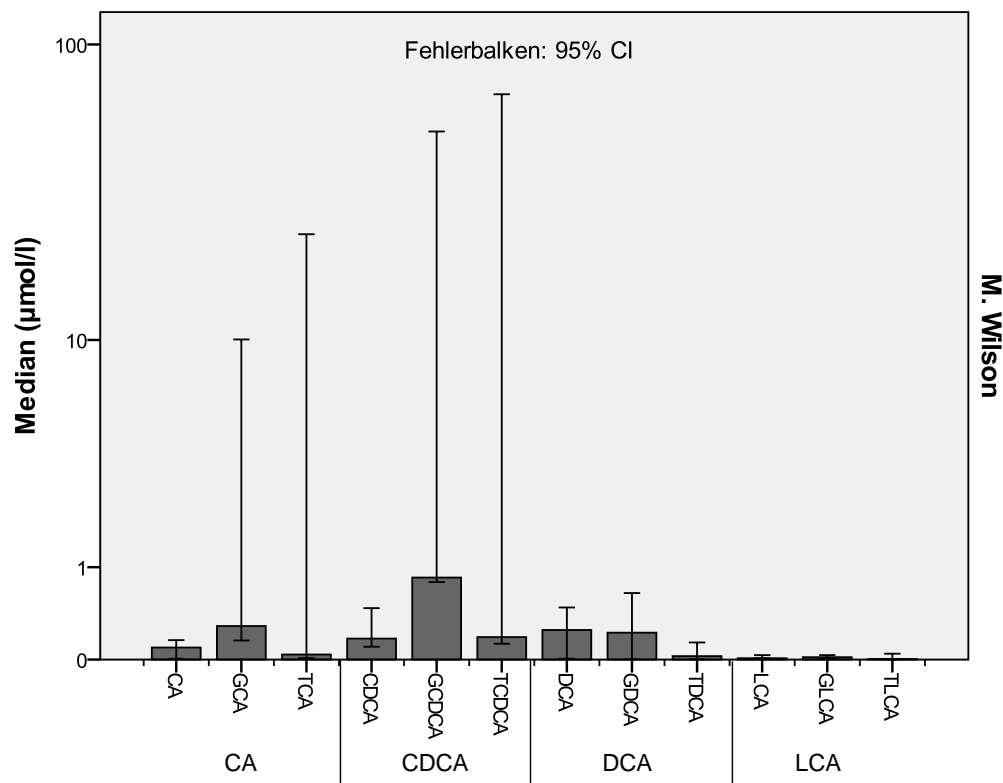


Abbildung 42: GS-Profil bei Morbus Wilson

In die Diagnosegruppe werden vier Patienten Morbus Wilson (n=4) eingeschlossen (Abbildung 42). Bei einem Patient mit der Diagnose Morbus Wilson fallen deutlich erhöhte Gesamt-GS (Gesamtkonzentration der GS 154,6 µmol/l) auf. Außerdem imponiert eine Verschiebung zugunsten der konjugierten primären GS mit 153,7 µmol/l in der Verteilung der GS. Die anderen Patienten zeigen keine signifikanten Veränderungen in der GS-Zusammensetzung.

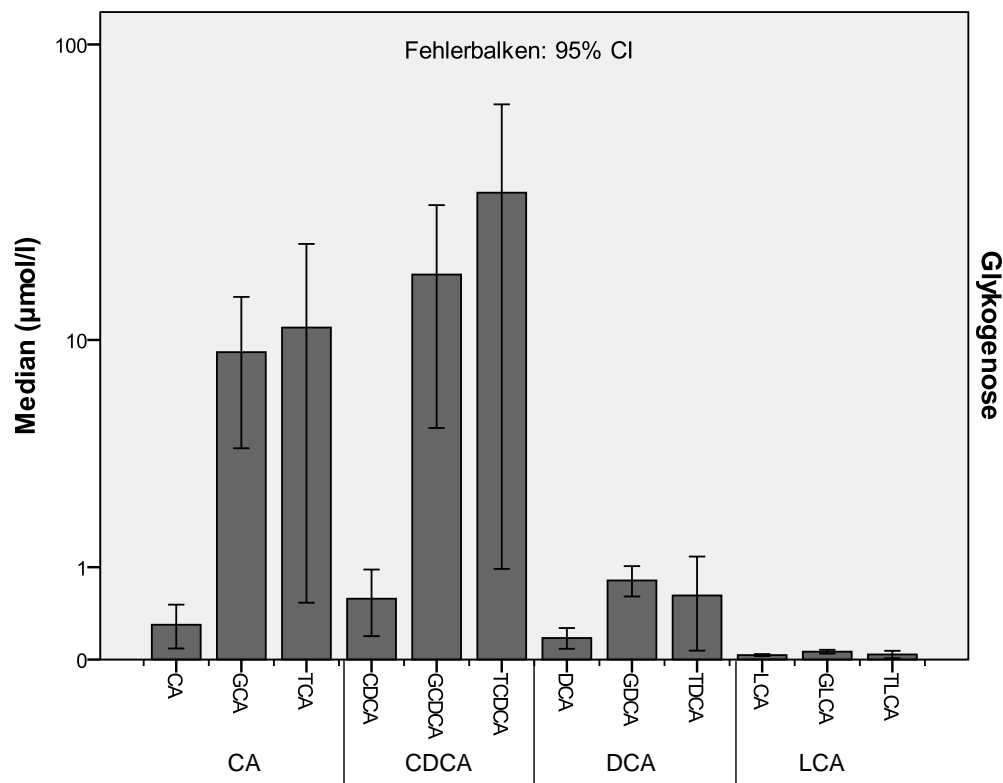


Abbildung 43: GS-Profil bei Glykogenosen

Zwei Patienten werden unter der Diagnose Glykogenose (Typ IV) geführt (Abbildung 43). Ein Patient präsentiert sich mit erhöhten konjugierten primären GS und nahezu einem Fehlen an sekundären GS. Dieser Patient wird im Verlauf der Erkrankung lebertransplantiert. Dem gegenüber zeigt der zweite Patient keine pathologischen GS-Konzentrationen.

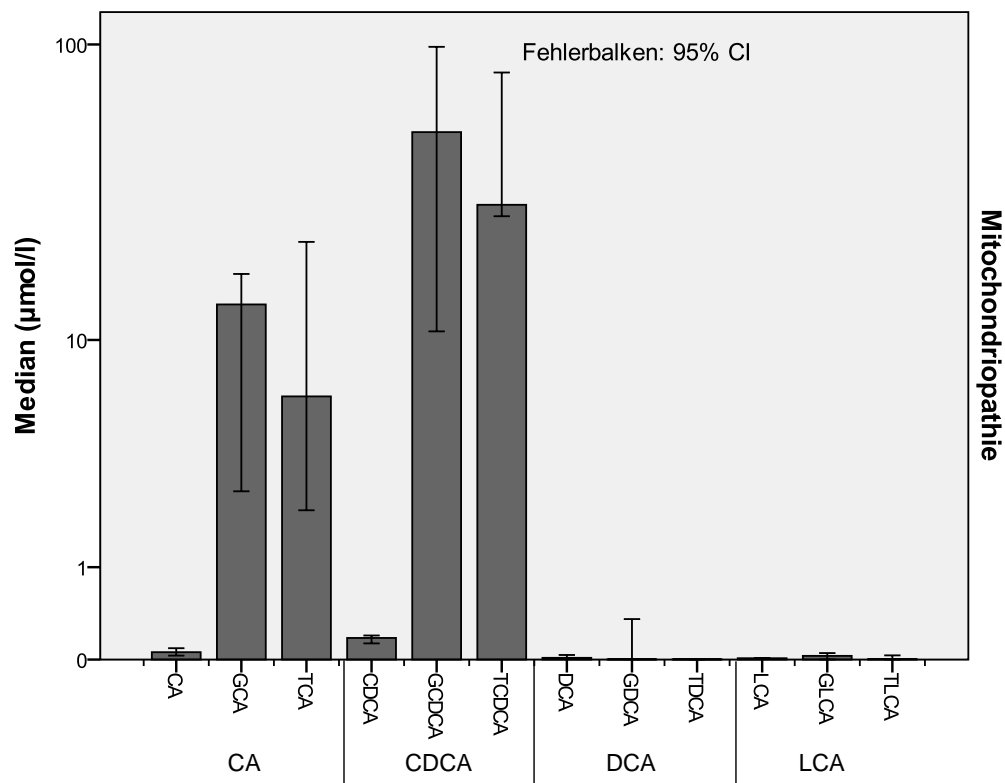


Abbildung 44: GS-Profil bei Mitochondriopathien

Die Diagnose Mitochondriopathie umfasst drei Patienten (Abbildung 44). Die Analyse der GS-Profile weist eine deutlich erhöhte Gesamtkonzentration der GS (Median 203,2 µmol/l) nach. Ein Patient wird mit UDCA therapiert (Median ohne UDCA-Metaboliten 83,1 µmol/l). Die Konzentrationserhöhung ist auf die Erhöhung der konjugierten primären GS zurückzuführen. Sekundäre GS sind kaum im GS-Profil vertreten.

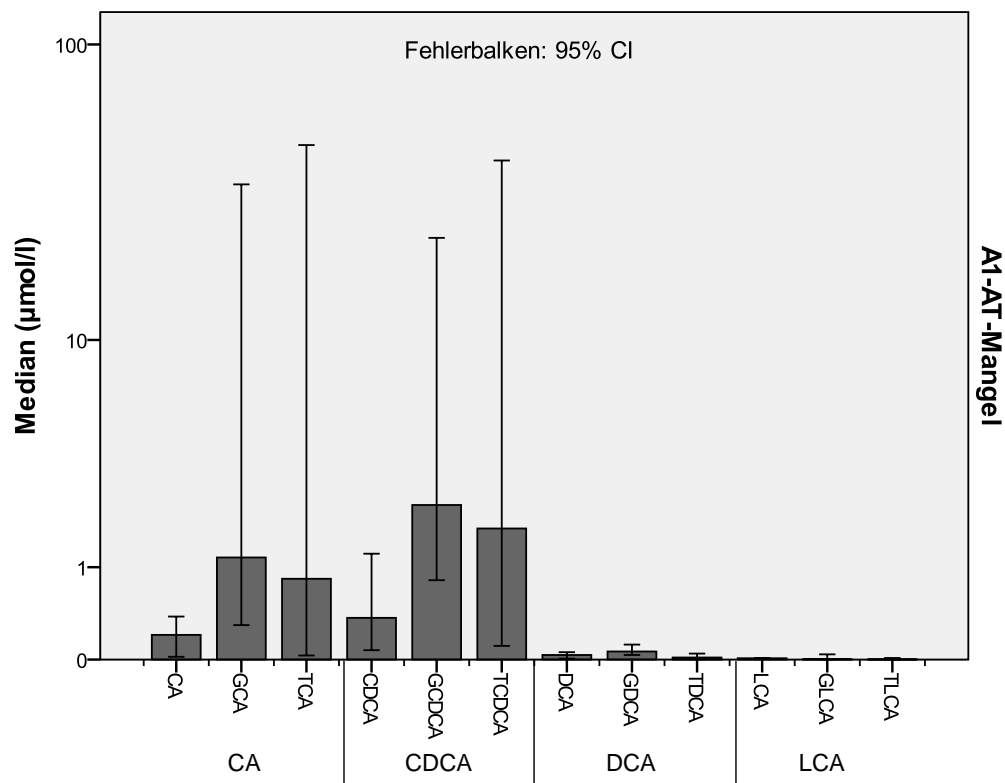


Abbildung 45: GS-Profil bei α1-AT-Mangel

In die Studie können vier Patienten mit α1-Antitrypsin-Mangel eingeschlossen werden (Abbildung 45). Das Profil eines Patienten entspricht in der Zusammensetzung den Referenzwerten der gesunden Kontrollgruppe. Ein Patient lässt einen Anstieg der Gesamtkonzentration der GS (193 μmol/l) und konjugierter primärer GS (145 μmol/l) erkennen. Auf die UDCA-Metaboliten entfallen 48,0 μmol/l. Bei zwei Patienten fällt eine diskrete Erhöhung der Gesamtkonzentration der GS (< 20 μmol/l) mit Verschiebung zugunsten konjugierter primärer GS bei einem Mangel an sekundären GS auf.