

Diplomarbeit

**Veränderungen der intestinalen Gallensäuren
Transporter-Expression bei pädiatrischer chronisch-
entzündlicher Darmerkrankung**

eingereicht von

Isabella Rupp

Geb.Dat.: 22.03.1989

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut / Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde

unter der Anleitung von

OA. Dr. med. univ. Jörg Jahnel

Univ. Prof.in Dr.in med. univ. Almuthe Hauer

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, Juni 2014

Isabella Rupp

Vorwort

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), bei denen es in Schüben zu massiven Entzündungen der Darmschleimhaut kommt. Gallensäuren (GS) werden in der Leber hergestellt, anschließend über die Gallenwege in das Darmlumen abgegeben und zum Großteil am Ende des Dünndarms (im terminalen Ileum) wieder aufgenommen und in die Leber rücktransportiert. Für die Aufrechterhaltung dieses sogenannten „enterohepatischen Kreislaufs“ sind spezielle GS-Transportproteine („GS-Transporter“) zuständig, die in den Darmwandzellen lokalisiert sind.

Die Idee dieser Arbeit war es, dass es im Rahmen einer CED durch die Entzündung des Darms zur Störung des „enterohepatischen Kreislaufs“ kommen könnte und dadurch der GS-Stoffwechsel bei CED verändert sein dürfte.

Diese Diplomarbeit im Bereich der grundlagenorientierten klinischen Forschung diente der Verfasserin, Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen. Im Rahmen dieser Arbeit lernte die Verfasserin eine wissenschaftliche Frage anhand von Literatur zu stellen, das darausfolgende wissenschaftliche Projekt zu planen, die Durchführung zu koordinieren und die Ergebnisse zu analysieren, zu interpretieren, schriftlich zusammenzufassen und zu präsentieren.

Danksagungen

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

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Hubert Scharnagl, der mich bei der statistischen Datenauswertung betreute. Vielen Dank auch an Dr. Thierry Claudel für die Unterstützung bei der Bearbeitung der Proben.

Mein Dank geht insbesondere an meine Familie. Vielen Dank an meine Eltern, denen ich diese Diplomarbeit widme. Sie haben mir dieses Studium erst ermöglicht, waren mir stets eine wertvolle seelische und moralische Stütze und sind immer für mich da. Danke, dass ich mich auf euch verlassen kann. Verena, der besten Schwester, möchte ich für ihre Geduld danken, ihr offenes Ohr und die interessanten Gespräche, die mich in manch schwieriger Situation der Diplomarbeit inspirierten und weiterbrachten. Mein großer Dank gilt nun meinem Freund Paul für die Liebe, die Geduld, die Freude und die Zeit, die er mir schenkt. Du hast mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet. Danke. Es ist schön, dass es euch gibt.

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

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

Zusammenfassung

Hintergrund: Gallensäuren (GS) werden größtenteils im terminalen Ileum und im Colon rückresorbiert, wofür spezielle GS-Transportproteine vorliegen. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) kommt es zu schubhaften Entzündungen unterschiedlicher Darmabschnitte. Die Hypothese dieser Arbeit war es, dass es bei CED zur Veränderung der Expressionen von GS-Transportproteinen in den betroffenen Darmabschnitten kommt und dadurch der GS-Stoffwechsel gestört ist.

Methoden: Im Rahmen von routinemäßigen Ileocoloskopien wurden zusätzliche Biopsien von Kindern und Jugendlichen aus dem Ileum, Colon ascendens und Colon descendens entnommen und anschließend mittels real-time(rt)-PCR-Methode Expressionsmuster von GS-Transportern bestimmt. Hierfür liegt ein positives Ethikkommissionsvotum vor (23-022 ex10/11). Es wurden insgesamt 55 Kinder und Jugendliche in die Studie eingeschlossen, wobei vier Gruppen gebildet wurden: Morbus Crohn (MC; n=17), Colitis Ulcerosa (CU; n=12), Kontrollgruppe mit anderen Darmerkrankungen (AE; n=10) und Kontrollgruppe (K; n=16). In letztere wurden PatientInnen inkludiert, die aufgrund des Verdachts auf eine CED ileokoloskopiert wurden und bei welchen der makroskopische wie auch histologische Befund unauffällig war. Als Positivkontrolle für die mRNA-Expressionsmuster verwendeten wir den Entzündungsmarker iNOS (induzierbare NO-Synthase). Normalisiert wurde zu GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase). Die wichtigsten untersuchten Transportproteine waren ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter) und MRP3 (multidrug resistance protein 3), zusätzlich untersuchten wir auch das Detoxifikationsenzym CYP3A4 (Cytochrom-P3A4), den GS-Synthese-Inhibitor FGF19 (fibroblast growth factor 19), GLP1 (glucagon like peptide 1) und den Kernrezeptor für GS FXR (farnesoid X receptor).

Ergebnisse: Für die Positivkontrolle **iNOS** zeigten sich signifikante Veränderungen der mRNA-Expression, sowohl im Colon bei CU-aktiven-PatientInnen (1795%; **p=<0,001**), als auch im Ileum in der MC-aktiven-Gruppe (1368%; **p=<0,001**). Die Expression des wichtigsten GS-Aufnahmesystems im Ileum **ASBT** war bei aktiven MC-PatientInnen mit 16% (**p=<0,001**) und auch bei inaktiven MC-PatientInnen mit

52% (**p=0,006**) signifikant verringert. Für den regulierenden Kernrezeptor **FXR** zeigte sich im Ileum ebenfalls eine signifikante Reduktion in aktiven MC-Stadien auf 59,45% (**p=0,019**). Die Expression des Colon-GS-Transporters **MRP3** lag für aktive CU-PatientInnen an der Grenze zur statistischen Signifikanz (60%; **p=0,051**). Für das Detoxifikationsenzym **CYP3A4** ergab sich eine signifikante Verringerung bei MC-aktiven-PatientInnen im Ileum (25%; **p=0,006**), sowie eine Erhöhung in der AE-Gruppe im Colon auf 571% und mit statistischer Signifikanz von **p=0,037**. Das im Darm produzierte Hormon **GLP1**, welches im Glucosestoffwechsel eine wichtige Rolle spielt, wies eine signifikante Erhöhung im Colon in der AE-Gruppe auf (272%; **p=0,041**).

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse zeigen, dass die aktive GS-Aufnahme im Ileum im aktiven MC-Stadium durch eine verminderte Expression des GS-Transporters ASBT (16%; $p < 0,001$) vermindert sein dürfte, was auch im inaktiven Stadium anzuhalten scheint (52%; $p = 0,006$), allerdings zu einem geringeren Grad. Durch den geringeren GS-Spiegel in der Ileum-Darmzelle dürfte es auch zu einer Hinunterregulation des intrazellulären GS-Rezeptors FXR und des Detoxifikationsenzym CYP3A4 kommen. Bei CU scheint die GS-Aufnahme nur tendenziell verringert zu sein. Zusammenfassend zeigt sich, dass der GS-Metabolismus bei Kindern und Jugendlichen mit CED verändert ist.

Abstract

Background: The reabsorption of bile acids (BA) through special bile acid transport proteins located in the enterocytes takes mainly place in the terminal ileum but to a minor part also in the colon. Inflammatory bowel diseases (IBD) are characterised by recurrent inflammation in different parts of the intestine. We hypothesised, that IBD causes a change in the expression of BA-transport proteins resulting in a dysfunction of BA-metabolism.

Methodes: To investigate our hypothesis, additional tissue samples of the ileum, Colon ascendens and Colon descendens in children and adolescents were obtained during routine colonoscopies. We further analyzed the mRNA expression patterns of BA-transporters by real-time (rt)-PCR. A positive ethics committee vote (23-02 ex10/11) had been received. 55 children and adolescents were included into the study and allocated to 4 different groups: Crohn's disease (CD; n=17), Ulcerative Colitis (UC; n=12), a disease control group (DCG; n=10) and controls (C; n=16), that included patients who had undergone an ileocoloscopy because of suspected IBD that could be disproved endoscopically and histologically. The inflammatory marker iNOS (inducible nitric oxide synthase) served as a positive control of mRNA-expression patterns. All data were normalized against GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). The most important transport proteins in this study were ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter) and MRP3 (multidrug resistance protein 3). Additionally we also investigated the detoxification enzyme CYP3A4 (cytochrome-P3A4), the BA-synthesis-inhibitor FGF19 (fibroblast growth factor 19), GLP1 (glucagon like peptide 1) and the BA-nuclear receptor FXR (farnesoid X receptor).

Results: The positive control **iNOS** showed significant alterations in its mRNA-expression pattern, not only in the colon of UC-active-patients (1795%; **p<0,001**), but also in the ileum of CD-active-patients (1368%; **p<0,001**). The expression of **ASBT** (representing the most important uptake-system in the ileum) was significantly reduced both for active and inactive CD-patients (16% and 52%, resp; **p<0,001** and **p=0,006**, resp.). In the ileum of active CD-patients the regulatory nuclear receptor **FXR** showed also a significant reduction to 60% (**p=0,019**). The expression of the colon-BA-transporter **MRP3** was, for active UC-patients, at the

border to statistical significance (60%; **p=0,051**). With 25% (**p=0,006**) the expression of the detoxification enzyme **CYP3A4** in the ileum of active CD-patients was significantly lower compared to healthy controls. Still it was elevated to 571% (p=0,0037) in the colon of the DCG-group. The **GLP1** hormone, which is produced in the intestine and plays an important role in glucose metabolism, showed a significant increase in the colon of the OD-group (272%; **p=0,041**).

Conclusion: Our results suggest a reduction of the active BA-uptake caused by a reduced expression of the BA-transporter ASBT (16%; p=<0,001). This reduction even persists during inactive stages (52%; p=0,006), but to a lesser extent. The decreased BA-levels inside the ileal enterocyte could cause a downregulation of the intracellular BA-receptor FXR and also of the detoxification enzyme CYP3A4. For UC-patients the BA-uptake only tends to be reduced. In summary, these results indicate an alteration in BA-metabolism in children and adolescents with IBD.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	ii
Danksagungen.....	iii
Zusammenfassung.....	iv
Abstract.....	vi
Inhaltsverzeichnis.....	viii
Glossar und Abkürzungen.....	x
Abbildungsverzeichnis.....	xiii
Tabellenverzeichnis.....	xiv
1 Einleitung.....	1
1.1 Gallensäuren.....	1
1.1.1 Biologische Funktion.....	1
1.1.2 Gallensäuresynthese.....	1
1.1.3 Enterohepatische Kreislauf.....	2
1.1.4 Gallensäuretransport im terminalen Ileum und Colon.....	3
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	6
1.2.1 Allgemein.....	6
1.2.2 Ätiologie.....	7
1.2.3 Klinische Symptome.....	7
1.2.4 Diagnose.....	9
1.2.5 Therapie.....	12
1.3 CED und Gallensäuremetabolismus.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 PatientInnen-Rekrutierung.....	18
2.2 Biopsieentnahme.....	19
2.3 Datenerhebung.....	19
2.4 Gruppeneinteilung.....	20
2.5 Probenauswertung.....	21
2.5.1 RNA-Isolierung.....	21
2.5.2 cDNA-Synthese.....	22
2.5.3 Real-time quantitative PCR.....	22
2.6 Datenauswertung.....	23
3 Ergebnisse – Resultate.....	24
3.1 Patientencharakterisierung.....	24

3.1.1	Patientenzahl, Gruppeneinteilung, Geschlecht, Alter.....	24
3.1.2	Symptome	25
3.1.3	Entzündungslokalisation	26
3.1.4	Medikamentöse Therapie	27
3.1.5	Laborwerte.....	29
3.2	Expressionsmuster.....	30
3.2.1	GAPDH.....	31
3.2.2	iNOS	32
3.2.3	CYP3A4.....	34
3.2.4	GLP1	36
3.2.5	MRP3.....	38
3.2.6	ASBT	39
3.2.7	FXR	40
3.2.8	FGF19	41
3.2.9	Übersicht der Expressionsmuster	42
4	Diskussion.....	44
5	Literaturverzeichnis	51
	Anhang – Projektplan	63

Glossar und Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
6MP	6-Mercaptopurin
AE	Andere Erkrankung
ANCA	Antineutrophile cytoplasmatische Antikörper
ASBT	Apical sodium dependent bile acid transporter
ASCA	Antisaccharomyces cerevisiae-Antikörper
ATF4	Activating transcription factor 4
AZA	Azathioprin
BA	Bile acids
BCRP	Brest cancer resistance protein
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C	Controls
CD	Crohn's Disease
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CDCS	Chenodeoxycholsäure
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CS	Cholsäure
CT	Computertomographie
CU	Colitis ulcerosa
CYP3A4	Cytochrom-P3A4
CYP7A1	(Cytochrom P450)7-alpha-Hydroxylase
DCG	Disease control group
DNA	Deoxyribonucleic acid (=Desoxyribonukleinsäure)
EEN	Exclusive enteral nutrition

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FXR	Farnesoid X receptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GLP1	Glucagon like peptide 1
GPBAR1	G-protein-coupled bile acid receptor 1
GPGE	Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung
GS	Gallensäuren
I-BABP	Ileal bile acid binding protein
IBD	Inflammatory bowel disease
IBDu	Inflammatory bowel disease unclassified
IL-1β	Interleukin-1beta
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
MC	Morbus Crohn
MDR1	Multidrug resistance gene
Mean	(engl.) Mittelwert
MRP2 (4, 3)	Multidrug resistance protein 2 bzw. 4 oder 3
MRT	Magnetresonanztomographie
MUG	Medizinische Universität Graz
OATP	Organic anion transporter
OSTα	Organic solute transporter alpha
OSTβ	Organic solute transporter beta
pANCA	Perinukleäre antineutrophile cytoplasmatische Antikörper
PCDAI	Paediatric Crohn's Disease Activity Index
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RNA	Ribonucleic acid (=Ribonukleinsäure)

RT-PCR	Realtime polymerase chain reaction
SD	<i>engl: standard deviation</i> = Standardabweichung
s.o.	siehe oben
SHP	Small heterodimer partner
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TPMT	Thiopurinmethyltransferase
UC	Ulcerative Colitis
ZMF	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf und GS-Transporter.....	3
Abbildung 2: GAPDH Ileum.....	31
Abbildung 3: GAPDH Colon.	32
Abbildung 4: iNOS/GAPDH Ileum.	33
Abbildung 5: iNOS/GAPDH Colon.....	34
Abbildung 6: CYP3A4/GAPDH Ileum	35
Abbildung 7: CYP3A4/GAPDH Colon.....	36
Abbildung 8: GLP1/GAPDH Ileum.....	37
Abbildung 9: GLP1/GAPDH Colon	38
Abbildung 10: MRP3/GAPDH Colon	39
Abbildung 11: ASBT/GAPDH Ileum.....	40
Abbildung 12: FXR/GAPDH Ileum.....	41
Abbildung 13: FGF19/GAPDH Ileum.....	42
Abbildung 14: Übersicht der Expressionsmuster in den Colonbiopsien	42
Abbildung 15: Übersicht der Expressionsmuster in den Ileumbiopsien	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-a: Gruppenzuteilung der Ileum-Biopsien	25
Tabelle 3-b: Gruppenzuteilung der Colon-Biopsien.....	25
Tabelle 3-c: PatientInnencharakterisierung	26
Tabelle 3-d: Medikamentöse Therapie	29
Tabelle 3-e: Entzündungswerte	29
Tabelle 3-g: GAPDH-Werte Ileum	31
Tabelle 3-h: GAPDH-Werte Colon.....	32
Tabelle 3-i: iNOS/GAPDH-Werte Ileum.....	33
Tabelle 3-j: iNOS/GAPDH-Werte Colon	33
Tabelle 3-k: CYP3A4/GAPDH-Werte Ileum.....	34
Tabelle 3-l: CYP3A4/GAPDH-Werte Colon	35
Tabelle 3-m: GLP1/GAPDH-Werte Ileum	36
Tabelle 3-n: GLP1/GAPDH-Werte Colon	37
Tabelle 3-o: MRP3/GAPDH-Werte Colon.....	38
Tabelle 3-p: ASBT/GAPDH-Werte Ileum.....	39
Tabelle 3-q: FXR/GAPDH-Werte Ileum.....	40
Tabelle 3-r: FGF19/GAPDH-Werte Ileum.....	41

1 Einleitung

1.1 Gallensäuren

1.1.1 Biologische Funktion

Gallensäuren (GS) sind in der Leber produzierte Steroide, die verschiedene biologische Funktionen haben, wobei anzunehmen ist, dass bis heute das vollständige Ausmaß der Aufgabenbereiche von GS im menschlichen Organismus noch unbekannt ist. Die bekannteste Aufgabe von GS beim Menschen ist die Fettverdauung und das Ermöglichen der Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen (A, D, E und K₁) und Lipiden in die Enterozyten. GS sorgen ebenfalls für die Elimination von Cholesterol, da Cholesterol in GS umgewandelt wird. Neben der Stimulation des Galleflusses und der biliären Phospholipidsekretion bewirken sie letztlich auch einen negativen Rückkoppelungsmechanismus, nicht nur auf die Gallensäurenproduktion, sondern auch auf die Cholesterolbiosynthese (1, 2).

1.1.2 Gallensäuresynthese

GS werden in der Leber über zwei unterschiedliche Wege aus Cholesterol synthetisiert. Der „klassische Weg“ führt durch die enzymatische Regulation der **7- α -Hydroxylase (CYP7A1)** zur Umwandlung von Cholesterol zu **7-Hydroxycholesterin**, während beim „alternativen Weg“ Cholesterol über CYP27A1 und CYP7B1 zu GS hydroxyliert wird. Mit diesen Schritten erhält man schließlich die sogenannten „primären“ Gallensäuren, **Cholsäure (CS)** und **Chenodeoxycholsäure (CDCS)**. Im Anschluss erfolgt eine Konjugation der Aminosäuren Glycin und Taurin mit primären GS. In diesem wasserlöslichen Zustand werden die Zellwände für GS impermeabel und eine bleibende hohe Gallensäurenkonzentration ist hiermit bis ins Intestinum garantiert (1, 3).

Es wird angenommen, dass der klassische Weg derjenige ist, über den beim Menschen unter physiologischen Bedingungen der Großteil der Gallensäurensynthese abläuft. Der alternative Weg hat vor allem bei PatientInnen mit Lebererkrankungen Bedeutung (3).

1.1.3 Enterohepatische Kreislauf

Um einen konstanten Gallensäurepool von 3-4 g aufrechtzuerhalten, durchlaufen Gallensäuren einen „enterohepatischen Kreislauf“, der täglich 6-10 mal wiederholt wird (siehe Abb. 1; (1, 4, 5). Unter diesem Kreislauf versteht man den Kreislauf der GS zwischen Leber und Darm. Nach der Synthese der GS in der Leber gelangen die GS über die Gallenwege ins Duodenum und dann über den Dünndarm ins terminale Ileum (6).

Im terminalen Ileum werden die GS mit Hilfe spezieller Transportproteine („Transporter“) zuerst apikal in die Enterozyten aufgenommen und anschließend basal - ebenfalls aktiv - ins Portalblut abgegeben, sodass die GS letztlich über die Pfortader, wo sie hauptsächlich an Albumin gebunden transportiert werden, wieder in die Leber gelangen (1, 6).

Ein Teil der GS entgeht jedoch der Aufnahme im Ileum und gelangt in das Colon, wo sie durch Bakterien der Darmflora dekonjugiert und dehydroxyliert werden, sodass „sekundäre“ GS entstehen (z.B.: Deoxycholsäure, Lithocholsäure, etc.). Nur in dekonjugierter Form ist es den GS möglich, passiv in die Epithelzelle aufgenommen zu werden. Im Gegensatz zur Situation im terminalen Ileum stehen den GS im Colon apikal keine aktiven Transportersysteme zur Verfügung. Nach passiver Diffusion in die Enterozyten können die GS aber erneut aktiv ins Pfortaderblut abgegeben werden und erreichen auf diesem Weg wieder die Leber (5, 7). Ungefähr 95% der GS werden durch diesen Kreislauf wiederverwertet, während die über den Darm verlorengegangenen 5% in der Leber durch Neusynthese ersetzt werden (8).

1.1.4 Gallensäuretransport im terminalen Ileum und Colon

Um die verschiedenen Aufnahme- und Abgabeprozesse der GS im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes zu ermöglichen, werden spezielle Transport-Proteine, die sog. „GS-Transporter“, benötigt.

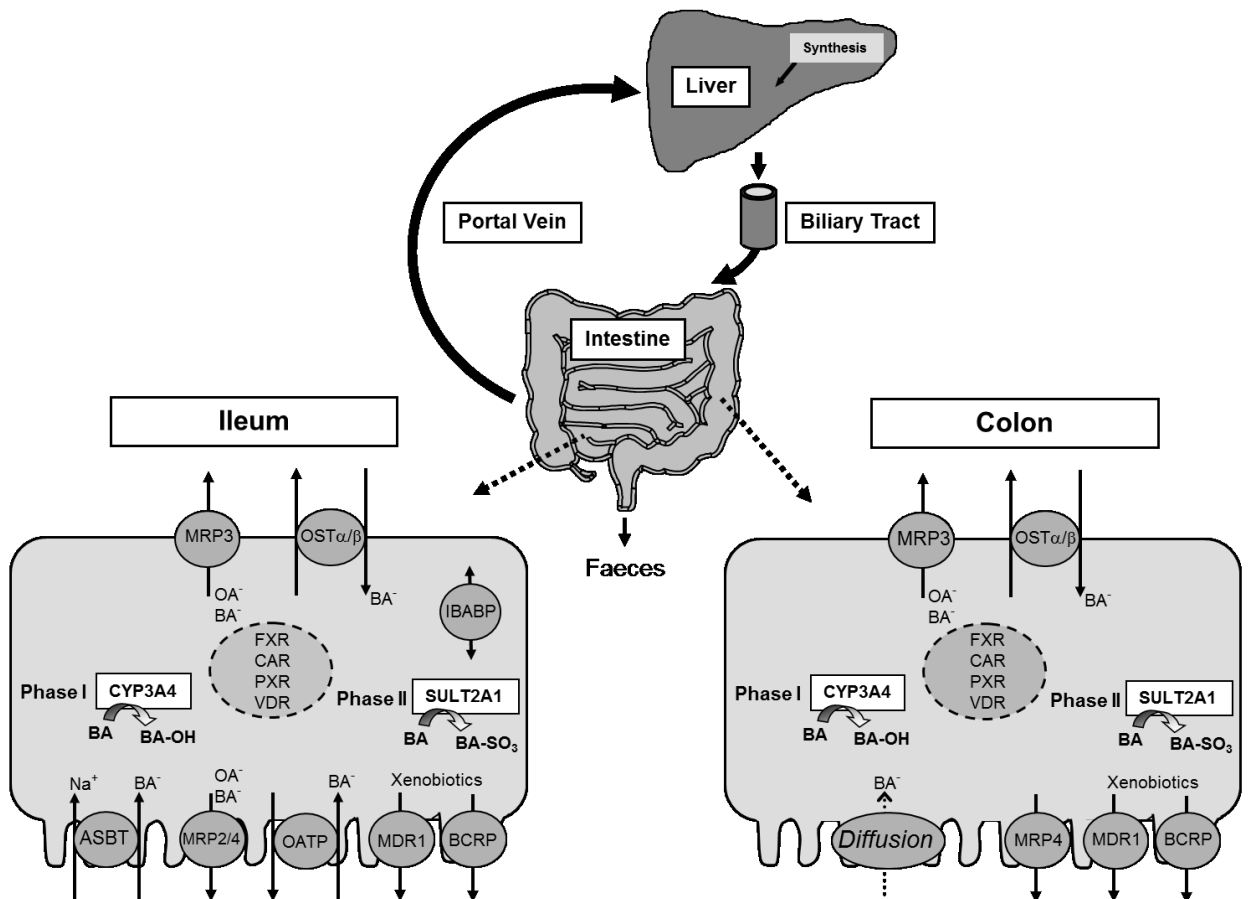


Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf und GS-Transporter (Jahnel et al., noch nicht publiziert, mit persönlicher Erlaubnis)

1.1.4.1 Apikale GS-Transporter

An der apikalen (=die dem Darmlumen zugewandte Seite des Enterozyten) Membran der Ileum-Darmzelle ist das Transportersystem **ASBT/SLC10A2** (apical sodium dependent bile acid transporter) lokalisiert, welches auch als IBAT (Ileal bile acid transporter) bezeichnet wird. Es ist im Ileum für die aktive Aufnahme der konjugierten GS vom Darmlumen in den Enterozyten zuständig (4). ASBT wirkt als Symporter, indem er zwei Na⁺-Ionen mit einem Molekül Gallensäure transportiert

(2, 9). Ebenfalls können im Dünndarm GS Na⁺-unabhängig über die organic anion transporters (**OATP** isoforms) aufgenommen werden.

1.1.4.2 Basolaterale GS-Transporter

An der basolateralen Membran der Enterozyten werden die GS über die Export-Transporter **MRP3** (Multidrug resistance protein 3) und **OST α /OST β** (Organic solute transporter) ins Portalblut abgegeben (10, 11). Diese beiden für den basolateralen Gallensäureefflux zuständigen Transporter kommen sowohl im Ileum als auch im Colon vor, während ASBT im Colon nicht exprimiert wird. Die GS-Aufnahme im Colon kann also ausschließlich mittels passiver Diffusion und in dekonjugierter Form stattfinden, während die Abgabe ins Pfortaderblut wie im Ileum über MRP3 sowie OST α /OST β erfolgt (5, 7).

Dass vor allem die ilealen Transporter für eine effiziente Absorption von konjugierten GS notwendig sind, wird bei PatientInnen mit Ileumresektion offensichtlich, die unter schwersten GS-Malabsorptionen leiden können (7).

1.1.4.3 Intrazellulärer Transport, Detoxifikation und apikaler Export

I-BABP (Ileal bile acid binding protein) ist für den Transport innerhalb des Enterozyten zuständig (12). GS können innerhalb der Darmzelle mittels Detoxifikationsenzymen (**Cytochrome-P450-, Sulfatierungs- und Glukuronidierungsenzyme**), die für die Entgiftung von vielen Xeno- und Endobiotika zuständig sind, auch modifiziert werden. Der Detoxifikationsprozess läuft in 3 Phasen ab. Die Hydroxylierung mittels Cytochrome-P450-Enzymen (z.B. CYP3A4) entspricht dabei der Phase 1. Studien zeigten, dass eine herabgesetzte Expression von Detoxifikationsenzymen der Phase 1 und 2 zur Krankheitsentstehung von CU beitragen können. Diese Enzyme werden zumindest teilweise von dem in 1.1.4.4 erwähnten Kernrezeptor FXR reguliert (13). Nach der Modifizierung werden die GS wieder ins Darmlumen abgegeben, wofür bei Enterozyten die apikalen GS-Exportsysteme **MRP2, MRP4, BCRP** (breast cancer resistance protein) und **MDR1** (Multidrug resistance gene 1) vorliegen (4). Das Gen für BCRP wurde aus einer Brustkrebszelllinie isoliert und daher danach benannt, auch wenn es nicht spezifisch für Brustkrebszellen ist (14).

MDR1, welches für das P-Glykoprotein kodiert und in mehreren Geweben exprimiert wird, agiert als wichtige intestinale Barriere für Xenobiotika und Toxine. Aber auch GS werden über dieses apikale Effluxsystem wieder ins Darmlumen exportiert (15-17). Mäuse mit MDR1-Defizit zeigten interessanterweise eine Anfälligkeit für die Entwicklung einer Colitis, sodass durchaus ein Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und reduzierter MDR1 Expression vorliegen könnte (18, 19).

1.1.4.4 Kernrezeptoren

GS regulieren die Transporter-Expressionen v.a. über Kernrezeptoren, die sog. „Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren“. Innerhalb der Enterozyten stehen Kernrezeptoren zur Verfügung, an die GS binden können, um die GS-Synthese und den GS-Transport auf transkriptioneller Ebene zu regulieren. Der Kernrezeptor **FXR** (Farnesoid X receptor) gilt als der wichtigste Rezeptor für GS. Durch die Aktivierung von FXR im Enterozyt wird ein intrazellulärer Gallensäureüberschuss, der zur Gallensäuretoxizität führen kann, durch die Repression intestinaler GS-Aufnahmesysteme wie auch durch die vermehrte Expression von GS-Effluxtransportern verhindert (4, 13).

Bei Aktivierung von FXR kommt es u.a. zur Expression des intrazellulären Transporters I-BABP und der basolateralen Gallensäuretransporter OST α /OST β (5).

Zusätzlich führt die FXR-Aktivierung zur Expression von **SHP** (Small heterodimer partner), der über mehrere Stufen unter anderem eine Repression von CYP7A1 in den Hepatozyten bewirkt und damit wiederum negativ auf die GS-Biosynthese rückwirkt. Ein anderer FXR-abhängiger Grund für die Hinunterregulierung von CYP7A1 stellt die durch die FXR-Aktivierung in den Enterozyten ausgelöste Expression von **FGF19** (Fibroblast growth factor 19) dar (2, 20). Die FGF19 Expression wird im Darm bei einer verstärkten Aktivierung von FXR durch hohe luminale GS-Konzentrationen induziert. FGF19 gelangt dann über das Blut in die Leber und bewirkt dort die Expression von SHP (s.o.). Dieses supprimiert

wiederum die Expression von CYP7A1, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym in der GS-Biosynthese, und inhibiert damit die GS-Biosynthese (21).

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.2.1 Allgemein

Bei den CED handelt es sich um chronische, in Schüben verlaufende Erkrankungen, die in **Morbus Crohn (MC)**, **Colitis ulcerosa (CU)** und **unklassifizierte CED** („IBDu“ Inflammatory bowel disease unclassified, ehemals Colitis indeterminata) unterteilt werden (22, 23). In der Folge beziehen wir uns allerdings auf die beiden großen Entitäten MC und CU. Während MC durch den diskontinuierlichen, transmuralen Befall charakterisiert ist und alle Abschnitte des Verdauungstrakts erfassen kann, beschränkt sich die Entzündung bei CU auf Rektum bzw. Colon und betrifft ausschließlich die Mukosa. Sie beginnt im Rektum und setzt sich kontinuierlich nach proximal hin fort, sodass bei CU individuell schließlich entweder eine Proctitis, Proctosigmoiditis, Linksseitencolitis oder Pancolitis auftreten kann (24, 25). In seltenen Fällen ist das terminale Ileum bei CU mitbetroffen, sodass man von einer sogenannten „backwash ileitis“ spricht (26).

Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr, obwohl eine CED auch schon in den ersten Lebensjahren auftreten kann (27, 28). Ungefähr 25-30% der neudiagnostizierten PatientInnen mit CED sind Kinder und Jugendliche unter 20 Jahren (29). Die Inzidenz der CED bei Kindern und Jugendlichen stieg in den letzten Jahrzehnten stetig an und nahm v.a. in Industrienationen zu. Besonders hohe Inzidenzraten waren in Nordamerika und Nordeuropa zu verzeichnen (30-32). Als Beispiel wäre Schottland zu nennen, mit einer Inzidenzrate von 7,82/100.000/Jahr (33). Eine Österreichische Studie (Petritsch et al.) untersuchte die Inzidenz von CED innerhalb unterschiedlicher Altersgruppen in der Steiermark über einen Zeitraum von 11 Jahren. Es zeigte sich eine durchschnittliche Inzidenz von 6,7/100.000/Jahr für MC und

4,8/100.000/Jahr für CU. Man beobachtete dabei, dass CED in größeren Städten häufiger vorkam als in ländlichen Regionen (34). Das Verhältnis pädiatrischer MC zu CU ist mit 2,3:1 länderübergreifend sehr ähnlich (27).

1.2.2 Ätiologie

Sowohl die Ätiologie des MC als auch der CU ist nach wie vor unbekannt (35, 36). Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei CED um multifaktorielle Erkrankungen, d.h., dass mehrere Faktoren Einfluss auf Entstehung und Verlauf der Erkrankung haben. Genetische Prädisposition, dysfunktionelle Immunität und Umweltfaktoren spielen nachweislich eine wichtige Rolle (35). Letzteres bezieht sich v.a. auf Tabakkonsum. RaucherInnen sind 2-4 mal gefährdeter, einen MC zu entwickeln als Nichtraucher (37). Interessanterweise scheint bei CU-PatientInnen genau das Gegenteil zuzutreffen. Studien ergaben, dass unter RaucherInnen nicht nur das Erkrankungsrisiko von CU verringert ist, sondern auch ein besserer Krankheitsverlauf und eine niedrigere Wahrscheinlichkeit einer benötigten Kolektomie gefunden wurden. Außerdem wird die Entwicklung einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) fast ausschließlich unter Nicht-RaucherInnen beobachtet (38).

Die genetische Komponente bei der Entwicklung einer CED ist nicht zu leugnen. So tragen Verwandte ersten Grades ein Risiko von 5,7 - 15,5%, auch an CU zu erkranken (36). Beispielsweise betrug in einer Zwillingsstudie die Rate für CU 6%. Genetische Faktoren spielen bei der Entstehung des MC wahrscheinlich eine noch bedeutendere Rolle (39).

1.2.3 Klinische Symptome

MC kann sich klinisch als akut, subakut oder chronisch manifestieren. Vorwiegend sind das terminale Ileum und Colon betroffen, wobei Entzündungen im gesamten Gastrointestinaltrakt, von Mund bis Anus, auftreten können. Der Großteil der PatientInnen (72%) gibt abdominale Schmerzen an, die bevorzugt im rechten Unterbauch lokalisiert sind. Im aktiven Stadium sind Durchfälle typisch, wobei aber

blutige Stühle im Vergleich zur CU nicht charakteristisch sind. Fieber, Gewichtsverlust und tastbare abdominelle Resistenzen sind häufig präsent (35, 37).

MC verläuft bei Kindern und Jugendlichen etwas anders als bei Erwachsenen: Nur 25% der bei einer Studie untersuchten Kinder präsentierten sich mit der „klassischen Trias“ Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Diarrhoe. Beinahe die Hälfte gab überhaupt keine Durchfälle an. Durch dieses relativ „atypische“ Bild kommt es unter Umständen zur verzögerten Diagnose. Bei Kindern und Jugendlichen machen sich CED nämlich häufig mit Wachstums- und Pubertätsverzögerung bemerkbar (40). PatientInnen mit CU präsentieren sich im aktiven Schub mit erhöhter Stuhlfrequenz, blutig-schleimigen Stühlen, Tenesmen, Stuhldrang, dem Gefühl der inkompletten Entleerung und Schmerznachlassen nach der Defäkation (41).

Extraintestinale Manifestationen können in praktisch jedem Organ auftreten. Bevorzugte Lokalisationen bei CU sind jedoch das Auge (Iritis, Episkleritis, Konjunktivitis, Uveitis), die Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangrenosum), Gelenke bzw. Knochen (Arthritis, ankylosierende Spondylitis, Osteoporose), Gallengänge (PSC), und Lunge (42). Ähnliche extraintestinale Manifestationen finden sich auch bei MC, z.B. Arthritis, Erythema nodosum, ankylosierende Spondylitis, Psoriasis oder Pyoderma gangrenosum (43). Bei Kindern und Jugendlichen ist die seronegative Spondyloarthropathie die häufigste bisher beschriebene extraintestinale Manifestation (35).

Bei CED besteht ein erhöhtes Malignomrisiko. Eine Meta-Analyse bei erwachsenen PatientInnen zeigte, dass das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, bei CU-PatientInnen bei 2% innerhalb von 10 Jahren, 8% innerhalb von 20 Jahren und 18% innerhalb von 30 Jahren liegt (44). Das Ausmaß der Erkrankung und vor allem die Dauer sind somit unter anderem ausschlaggebende Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms bei CU-PatientInnen (45).

1.2.4 Diagnose

Die Diagnosestellung basiert bei der CED auf klinischen, laborchemischen, radiologischen, endoskopischen und histologischen Kriterien (46). Um die Entzündungsaktivität bei MC zusätzlich zu beurteilen, wird bei erwachsenen PatientInnen meist der sog. Crohn's Disease Activity Index (CDAI) verwendet, der subjektive Symptome, objektive Untersuchungsbefunde und Laborergebnisse kombiniert (37, 47). Bei Kindern und Jugendlichen kommt der sog. Paediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) zum Einsatz, in welchen subjektive Symptome (Bauchschmerzen, Stuhlgewohnheiten, Allgemeinbefinden), extraintestinale Manifestationen (z.B.: Fieber, Arthritis, Ausschlag, Uveitis), physikalische Untersuchungsbefunde, Größe und Gewicht, wie auch Laborergebnisse inkludiert werden (Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Hämatokrit, Serumalbumin) und so die Entzündungsaktivität in „keine, mild, moderat oder schwerwiegend“ unterteilt wird (48).

1.2.4.1 Laborparameter

Da die Symptomatik bei Kindern und Jugendlichen unter Umständen sehr unspezifisch ist (s.o.), stellen Laborparameter eine wertvolle Hilfe für die Diagnosestellung dar. Dies beinhaltet vor allem **Blutbildveränderungen** (Anämie, Thrombozytose, Leukozytose), eine verlängerte BSG, ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und ein vermindertes Serumalbumin. Dabei ist zu bemerken, dass **CRP** ein besonders zuverlässiger Marker in der MC-Diagnostik ist, schnell ansteigt und nach der Entzündung auch relativ schnell wieder abfällt (35, 47, 49). **ASCA** (Antisaccharomyces cerevisiae-Antikörper) können in 60% und **ANCA** (antineutrophile cytoplasmatische Antikörper) in 20% der MC-Fälle ebenfalls erhöht sein (35, 46, 47). In 50-70% der Fälle kann man auch bei CU ANCA mit perinukleärem Fluoreszenzmuster (**pANCA**) nachweisen (50). Für die Diagnostik der CU sind neben der oben bereits erwähnten Bluttests, u.a. auch Leberwerte, Bilirubin, Kreatinin, Elektrolyte etc. von Bedeutung (51).

1.2.4.2 Stuhltests

Unter mehreren Stuhltests sei hier das sog. **Calprotectin** erwähnt, das sowohl bei MC als auch bei CU bestimmt werden kann und eher mit dem endoskopischen und histologischen Entzündungsnachweis korreliert. Calprotectin scheint bei CU allerdings aussagekräftiger zu sein als bei MC (47). Calprotectin gehört zu der Gruppe der Ca^{2+} -bindenden Proteine und wird in großen Mengen in neutrophilen Granulozyten, aber auch in Monozyten und Makrophagen gefunden. Es hat bakterio- und fungistatische Eigenschaften und hemmt das mikrobielle Wachstum bereits in minimaler Konzentration. Stuhl-Calprotectin kann mit einer einfachen ELISA-Methode bereits in sehr geringen Mengen von Stuhlproben nachgewiesen werden und stellt damit einen Vorteil gegenüber dem Plasma-Calprotectin dar. Außerdem bleibt seine Konzentration in Stuhlproben bis zu 7 Tagen unverändert (52). Es weist eine hohe Sensitivität, aber auch eine niedrige Spezifität auf, d.h., dass ein negativer Calprotectinwert zwar ein Hinweis für eine fehlende Aktivität einer CED ist, ein erhöhtes Calprotectin aber bei jeder Form der Darmentzündung auftreten kann und nicht nur spezifisch bei einer CED (53).

1.2.4.3 Bildgebende Diagnostik

Hinsichtlich klassischer bildgebender Verfahren gibt es folgende Möglichkeiten: Die **Sonographie**, **Computertomographie** (CT), **Magnetresonanztomographie** (MRT) und ergänzende konventionelle **Röntgenuntersuchungen** (37). Sonographie und MRT können eine CED bei Kindern und Jugendlichen mit großer Genauigkeit feststellen, wobei eine Differenzierung zwischen MC und CU bei fehlender Ileumbeteiligung in der Regel nicht möglich ist. Die Sonographie ist im Vergleich zur MRT wenig zeitintensiv, kostengünstig und angenehmer für Kinder und Jugendliche, weshalb der Ultraschall in der Pädiatrie mit großem Erfolg eingesetzt wird. Mit einem Wandler für Hochfrequenzen ist eine genaue Beurteilung des gesamten Darms möglich. Entzündungen können mittels Farbdoppler-Ultraschall durch die Darstellung vermehrter Vaskularisation bzw. Perfusion erkannt werden und auch die Beurteilung extraintestinale Auffälligkeiten (z.B. vergrößerte Lymphknoten) ist möglich. Allerdings kann eine CED im Rahmen einer Sonographie aufgrund von Artefakten oder bei sehr gering ausgeprägter Erkrankung auch übersehen werden. Die Stellung der korrekten Diagnose mittels

Ultraschall erfordert jedenfalls große Sonografie-Erfahrung (54, 55). Die MRT ist nach den neuesten pädiatrischen CED-Diagnosekriterien, den sog. „PORTO-Kriterien“, die Bildgebung der Wahl und zwingend in der Initialdiagnostik pädiatrischer CED. Die MRT spielt vor allem für die Beurteilung des Dünndarms eine zentrale Rolle und ist der Sonografie dahingehend überlegen (56). In der Erwachsenenengastroenerologie trifft dies evtl. auch auf die CT zu, die bei Kindern und Jugendlichen aufgrund der Strahlenbelastung problematisch ist. CT und MRT liefern Informationen über die Lokalisierung der Läsionen und helfen bei der Beurteilung deren Schweregrades, Ausmaßes und Entzündungsaktivität. Darüber hinaus identifizieren sie noch extraintestinale Manifestationen und pathologische Veränderungen, die z.B. eine chirurgische Intervention notwendig machen (57, 58). Zusätzlich kann die CT zur Detektion von Fisteln oder im Rahmen perianaler Erkrankungen eingesetzt werden. Sie kann aber oberflächliche Läsionen nicht genau visualisieren, weshalb die CT bei milder Erkrankungsaktivität nicht verwendet werden soll (37, 59). Die MRT erwies sich in Studien besser in der Differenzierung von pathologischen Veränderungen in der Darmwand und die MR-Kolographie als überaus genau in der Bestimmung der Krankheitsaktivität, sowie des Schweregrades der CU (60, 61). Im Vergleich zur CT hat die MRT zusätzlich den Vorteil der fehlenden Strahlenbelastung und ist somit besser geeignet für junge PatientInnen, die in ihrem Krankheitsverlauf noch häufiger eine bildgebende Diagnostik erfahren werden (60, 62). Die reine Röntgenuntersuchung ist aufgrund ihrer Unspezifität nur akuten Erkrankungen vorbehalten (55).

1.2.4.4 Endoskopische Diagnostik

Die **Ösophagogastroduodenoskopie** und die **Ileokoloskopie** mit Intubation des terminalen Ileums und mehrfachen Biopsienentnahmen aller Darmabschnitte sind Goldstandard zur Beurteilung der Krankheitsaktivität und des Krankheitsausmaßes. Die Kombination von Endoskopie und Biopsie ermöglicht die korrekte Diagnosestellung von CED in 90% der Fälle (34, 36). Makroskopisch können sich beim MC ein diskontinuierlicher Befall, Pflastersteinrelief der Schleimhaut, aphtoide Läsionen, Ulzera mit umliegendem gesundem Gewebe und Strikturen zeigen, während sich die CU mit abnormaler Gefäßzeichnung, Granulierungen, Blutungen und vor allem Ulzerationen präsentiert (54).

1.2.5 Therapie

Eine zur kompletten Ausheilung der Erkrankung führende Therapie bei Kindern und Jugendlichen wie auch bei Erwachsenen mit CED ist unbekannt, da die Ursache der Erkrankung bis heute nicht geklärt ist (s.o.). Man kann zwischen Therapien beim akuten Schub und Dauertherapien zur Prophylaxe eines neuen Schubes unterscheiden.

1.2.5.1 Enterale Ernährung

Eine ausschließlich enterale Ernährung (EEN = exclusive enteral nutrition) stellt in den meisten Fällen des MC in der Pädiatrie eine angemessene initiale Therapie dar und induziert effektiv eine Remission. Dies konnte in einer Studie bei 88,9% pädiatrischer MC-PatientInnen (Alter zwischen 7,4-16,2 Jahren) gezeigt werden (35, 63, 64). Eine andere Untersuchung zeigte, dass Corticosteroide der EEN diesbezüglich nicht nur nicht überlegen sind, sondern die EEN bei Kindern und Jugendlichen geeigneter für die Verbesserung der Entzündungssituation und die Remissionserhaltung ist, als Cortison (35, 65, 66).

Bei der EEN wird die reguläre Nahrungsaufnahme unterbrochen und für einen Zeitraum von 6- 8 Wochen auf eine komplette Formulaernährung (elementar oder polymerisch) umgestellt, die speziell für diese Indikation konzipiert wurde. Die EEN erfolgt entweder oral oder via Sonde (35, 63, 67). Neben ihrer antiinflammatorischen Wirkung (z.B. dramatischer CRP-Abfall), hat die EEN einen verbessernden Effekt auf den Ernährungszustand der gelegentlich malnutrierten Kinder und Jugendlichen und wirkt sich außerdem positiv auf deren Wachstum aus. Daher wird die EEN in Europa als primäre Therapie bei MC empfohlen (63, 68, 69). Interessant zu erwähnen ist, dass KollegInnen in den USA initial bisher zumeist Medikamente einsetzen.

1.2.5.2 Glukokortikoide

Glukokortikoide sind in der Therapie eines akuten Schubs eine Alternative zur EEN und eine Behandlungsoption bei schwerwiegender Pancolitis (35, 70). Auch bei unzureichender Symptomverbesserung bei CU oder Intoleranz gegenüber Aminosalizylaten wirken Glukokortikoide sehr effektiv. Ebenso werden CU-PatientInnen im schweren Schub mit hochdosierter Corticosteroid-Gabe therapiert (25). Das Problem der Corticosteroidtherapie sind die bekannten Nebenwirkungen, da bei langfristigen Cortisongaben Wachstumsverzögerung oder Entwicklungsstörungen in der Pubertät auftreten können. Außerdem wird die Knochenmineralisation gestört, weswegen während der Corticosteroidtherapie Calcium und Vitamin D ersetzt werden sollten (65). Aufgrund der Nebenwirkungen sollte die Phase der Glukokortikoid-Therapie daher während der Remissionsinduktion möglichst kurz sein und auf keinen Fall eine Dauertherapie darstellen (37). Eine weniger toxische Alternative zu Prednisolon ist das besonders im terminalen Ileum freigesetzte Budesonid, da es eine niedrige systemische Bioverfügbarkeit hat und so ein geringeres Nebenwirkungsspektrum aufweist (35, 71).

1.2.5.3 Aminosalizylate

5-ASA-Präparate (**Mesalazin** oder 5-ASA, **Sulfasalazin**) können in Kombination mit Steroiden zur Remissionsinduktion, aber auch als Erhaltungstherapie eingesetzt werden (72). Es sind passende Medikamente für die initiale Monotherapie bei milden bis moderaten Formen des MC. Da die Erkrankung bei Kindern dazu neigt, schwerwiegender zu verlaufen, werden entweder enterale Ernährung oder Steroide in Kombination mit 5-ASA eingesetzt (35, 73). Sie entwickeln ihre antiinflammatorische Wirkung direkt an der Läsion, wirken jedoch bei MC nicht so gut wie Immunsuppressiva (74). Mesalazin ist Sulfalazin vorzuziehen, da bei letzterem häufiger Nebenwirkungen beschrieben worden sind (35).

Da bei CU gegebenenfalls auch lokal behandelt werden kann, ist die entscheidende Frage, ob die Entzündung distal begrenzt ist, oder ob sie bis zum Colon descendens reicht und damit eine systemische Therapie notwendig macht

(75). Bei mildem bis moderatem distalem Befall der CU wird mit lokalen oder systemischen 5-ASA-Präparaten behandelt. Diese sind auch bei milder Pancolitis in systemischer Form Therapie der ersten Wahl (25).

1.2.5.4 Immunsuppressiva

Azathioprin (AZA) und **6-Mercaptopurin (6MP)** sind hocheffektive Substanzen für die Remissionserhaltung bei CED und sind bei MC auch in der Remissionsinduktion wirksam. Sie werden bei schwerwiegenden CED, v.a. steroidresistenten oder steroidabhängigen PatientInnen eingesetzt und sind trotz ihrer Nebenwirkungen sicherer und besser verträglich für die Langzeittherapie als Glukokortikoide (35, 72, 76). Der maximale Effekt wird erst nach 8-16 Wochen nach Therapiebeginn erreicht und die PatientInnen müssen über mögliche Nebenwirkungen, wie Myelosuppression, Pankreatitis, Hepatitis, Fieber, Übelkeit, Unwohlsein oder Hautausschlag aufgeklärt werden. Daher sind regelmäßige Blutabnahmen obligat. Vor Therapiebeginn sollte ebenfalls der Thiopurinmethyltransferasestatus (TPMT) überprüft werden. Niedrige Werte dieses Enzyms, das AZA metabolisiert, korrelieren nämlich mit einem erhöhten Myelosuppressionsrisiko (35, 77). Eine Alternative wäre **Methotrexat**, das allerdings auch zu Leukopenie und hepatischer Fibrose führen kann und bei pädiatrischer CU aufgrund unzureichender Evidenz bisher nicht generell empfohlen wurde (72, 78).

1.2.5.5 Biologika

Biologika sind z.B. monoklonale Antikörper. Bei CED werden TNF α -Antikörper wie Infliximab (Remicade[®]) und Adalimumab (Humira[®]) eingesetzt, die ins Entzündungsgeschehen eingreifen, indem sie auf den Entzündungsmediator TNF α abzielen, diesen blockieren und auch eine Apoptose von Entzündungszellen bewirken. **Infliximab** ist ein chimärer anti-TNF α monoklonaler Antikörper, der, wie Adalimumab auch, an TNF α bindet und ihn neutralisiert (72, 73, 79). TNF α spielt unabhängig der vielen anderen bei CED involvierten Entzündungsmediatoren insofern eine zentrale Rolle, als es eines jener proinflammatorischen T_H1-Zytokine ist, deren erhöhte Aktivität für MC charakteristisch ist. TNF α -Blocker sind bei 2/3 der PatientInnen in der Behandlung von enterokutanen Fisteln wirksam und damit

den Corticosteroiden weit überlegen (72, 80). Der Einsatz von Biologika hat gute Erfolge in der Remissionsinduktion- und -erhaltung erzielt (81, 82). Infliximab kommt bei Kindern und Jugendlichen zum Einsatz, die nicht mehr auf die konventionelle Behandlung ansprechen und werden, wie erwähnt, auch bei enterokutanen oder perianalen Fisteln eingesetzt (78, 83). Nebenwirkungen sind u.a. Infektionen, Lupus, Lymphome, Pneumonien, Sepsis etc. Die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose wird besonders gefürchtet, weswegen vor Therapiebeginn mit Infliximab die Durchführung eines Mendel-Mantoux-Hauttests oder eines sog. Quantiferon-Tests, eines Thoraxröntgen und eine ausführliche Anamnese bezüglich Tuberkulose obligat sind (84). Bei **Adalimumab** handelt es sich um einen vollständig humanisierten anti-TNF α -Antikörper, der nicht wie Infliximab intravenös, sondern subkutan verabreicht wird (85). Es wird zur Remissionsinduktion und -erhaltung eingesetzt. Seine Wirkung in der Fistelheilung wurde ebenfalls bewiesen (86, 87). Die Nebenwirkungen, die in einer Langzeitstudie unter Adalimumab-Therapie am häufigsten auftraten, waren Nasopharyngitis, Arthralgien, Bauchschmerzen, Übelkeit, Influenza, Kopfschmerzen und Fieber (86). Weitere TNF α -Blocker wären Certolizumab oder Etanercept (88, 89), die jedoch für die CED-Therapie bei Kindern und Jugendlichen aktuell keine Rolle spielen.

1.2.5.6 Operation

Sollte die medikamentöse Therapie unzureichend oder unwirksam sein, wird ein chirurgischer Eingriff notwendig. Eine dauerhafte Aktivität der Erkrankung erfordert erhöhten Steroidbedarf und führt schließlich unter anderem zu Medikamentenintoxikation, Wachstums- und Pubertätsverzögerung (35). Indikationen für einen chirurgischen Eingriff bei MC-Kindern sind massive Blutungen, persistierende oder immer wiederkehrende Obstruktionen, Perforation, therapieresistente fulminante Erkrankung oder toxisches Megakolon. Die häufigsten Gründe sind allerdings die trotz medikamentöser Therapie bleibenden hartnäckigen Fisteln oder Abszesse (83, 90). Eine Studie belegte, dass bei drei von vier MC PatientInnen im Laufe ihres Lebens eine intestinale Resektion erfolgt. Besonders betroffen sind davon jene mit Dünndarbefall oder perianalen Fisteln.

Die Hälfte der operativ versorgten PatientInnen wurde wieder rückfällig, wobei für Frauen ein höheres Rückfallrisiko als für Männer gezeigt wurde (91).

Da bei der CU der intestinale Befall nur auf das Colon begrenzt ist, ist eine totale Resektion des Colons heilend für PatientInnen, die nicht mehr auf die medikamentöse Therapie ansprechen (92). Heute ist die **totale Proktokolektomie mit Anlage eines ileoanal Pouch** die chirurgische Methode der Wahl, auch bei Kindern (93, 94), da dadurch der betroffene Darm entfernt, das kolorektale Krebsrisiko gesenkt und ein natürlicher Defäkationsweg bewahrt wird (93, 95). Die Kolektomierate bei pädiatrischer CU betrug bei einer Studie 40,9% innerhalb von 10 Jahren. Dies liegt daran, dass das Erkrankungsausmaß mit dem Krankheitsschweregrad assoziiert ist und bei Manifestation in der Kindheit die CU in 60-80% der Fälle extensiv vorkommt - zweimal so häufig wie bei Erwachsenen (78, 96). Eine Alternative bei therapieresistenter Colitis wäre die Kolektomie mit Ileostoma bei Erhaltung des Rektums in situ. Diese schnelle und einfache Operation lässt zwar eine bessere Kontrolle über den Darm zu, hat allerdings den Nachteil, dass mit dem Zurückbleiben der rektalen Mukosa die Gefahr des Wiederauftretens der Erkrankung oder der malignen Transformation besteht (97).

1.3 CED und Gallensäuremetabolismus

Es ist bekannt, dass inflammatorische Vorgänge zu weitreichenden metabolischen Veränderungen führen, wie z.B. der Inhibition der GS-Synthese durch eine Repression von FXR. Grundlegend dafür ist die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 β , die durch Bindung an FXR eine Verminderung dessen Expression, DNA-Bindungsaktivität und Transkription bewirken (98, 99). CED können durch die verminderte Aufnahme von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser mit Diarrhoe, Malnutrition und Gewichtsverlust einhergehen (100). Die molekularen Mechanismen sind diesbezüglich noch nicht vollständig geklärt, aber wahrscheinlich unterliegen diesem Phänomen auch Veränderungen des GS-Stoffwechsels und der aktiven GS-Absorption. Diskutiert wurden beispielsweise **ASBT-Mutationen**, die zu einer primären GS-Malabsorption mit chronischer Diarrhoe, Steatorrhoe, Unterbrechung des

enterohepatischen Kreislaufs und reduziertem Plasmacholesterolspiegel führt. Eine GS-Malabsorption im terminalen Ileum, wie es v.a. bei MC-PatientInnen vorkommt, führt zu einem GS-Überschuss und erhöhten Konzentrationen im Kolon und resultiert schließlich in einer sog. **chologenen Diarrhoe** (101, 102). Intestinaler GS-Verlust wird bis zu einem gewissen Grad durch erhöhte hepatische GS-Produktion kompensiert. So kommt zu der erhöhten intestinalen GS-Konzentration aufgrund der gestörten ilealen Funktion noch eine, aufgrund der Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs, erhöhte GS-Biosynthese hinzu. Dies hat zur Folge, dass noch mehr GS in das Colon gelangen (103), was mit einer vermehrten mukosalen Permeabilität und strukturellen Veränderungen assoziiert zu sein scheint. Unter anderem wurde dieses Phänomen in einer Studie erklärt, indem gezeigt wurde, dass eine kologene Perfusion mit Dihydroxy-GS zu einer Sekretion im Kolon führt, was sich klinisch schließlich als diese besagte Diarrhoe manifestiert (103, 104) und zusätzlich zu den Diarrhoen bei CED beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 PatientInnen-Rekrutierung

Die PatientInnen-Rekrutierung erfolgte auf der Basis von Ein- und Ausschlusskriterien (s.u.) am „GPGE“ (Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung) - Weiterbildungszentrum für Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz (Leitung: Univ. Prof. Dr.in med. univ. Almuthe Hauer). Kinder und Jugendliche, bei denen aufgrund des Verdachts einer CED die Indikation zu einer Ileokoloskopie mit Biopsieentnahme bestand und die Einschlusskriterien zutrafen, wurden im Rahmen des Aufklärungsgesprächs eingeladen, an der Studie teilzunehmen. Hierfür erhielten Erziehungsberechtigte wie auch PatientInnen eine studienspezifische PatientInneninformation mit Einwilligungserklärung, sowie ein ausführliches Gespräch. Da die definitive, histologische Diagnose zu diesem Zeitpunkt nur vermutet werden konnte, war eine Zuteilung zu den einzelnen Gruppen (MC, CU, Kontrolle, andere Erkrankung) erst nach der makroskopischen Beurteilung via Ileokoloskopie und der histologischen Beurteilung der Biopsien möglich.

Einschlusskriterien:

- Kinder und Jugendliche mit dem dringenden Verdacht auf CED
- Kinder und Jugendliche mit dem anfänglichen klinischen Verdacht auf CED und dann unauffälligem histologischem Befund (= Kontrollgruppe)
- Kinder und Jugendliche bei einer klinisch indizierten „Follow-up“ Untersuchung bei bereits bekannter CED
- PatientInnen mit anderen medizinischen Indikationen zur Ileokoloskopie (z.B.: Familiäre Polyposis Coli)
- Medizinische Tauglichkeit für eine Ileokoloskopie
- Höchstalter von 19 Jahren

- Einverständnis der Erziehungsberechtigten für die Entnahme sechs zusätzlicher Biopsien

Ausschlusskriterien:

- Nichteinwilligung der Erziehungsberechtigten zur Teilnahme an der Studie
- Ungenügende Darmentleerung zum Zeitpunkt der Ileokoloskopie
- Pathologisch verändertes Blutbild (z.B. Anämie) oder auffällige Gerinnungswerte (Quick-Wert, Thromboplastinzeit) bzw. Befunde älter als 7 Tage
- Einnahme von blutgerinnungshemmenden Medikamenten

2.2 Biopsieentnahme

Während der Ileokoloskopie wurden zusätzlich zu den routinemäßig entnommenen Darmbiopsien jeweils zwei weitere Biopsien aus dem Ileum, Colon ascendens und Colon descendens entnommen. Diese wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff bei -190°C tiefgefroren gelagert. Die Biopsien wurden anonymisiert bzw. kodiert und in einem verschließbaren Raum der Gewebebank der Medizinischen Universität Graz (MUG) aufbewahrt. Die Probenentnahme für dieses Projekt erfolgte ausschließlich nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und dem Erhalt der unterzeichneten Einwilligungserklärung. Es liegt ein positives Ethikkommissionsvotum der MUG für diese Studie vor.

2.3 Datenerhebung

Für diese Studie waren Ileokoloskopie-, Labor- und Histologiebefunde, sowie anamnestische Daten (aktuelle und vorangegangene Medikation, Symptome zum Zeitpunkt der Ileokoloskopie etc.) von Relevanz. Die Datenerhebung erfolgte hierfür mit der Daten-Verarbeitungssoftware „Medocs“. Den Ileokoloskopie- bzw. Histologiebefunden wurden Entzündungsaktivität und Lokalisation entnommen,

während wir uns bezüglich des Labors auf die Entzündungswerte CRP, Leukozytenzahl und Stuhl-Calprotectin konzentrierten. Anamnestisch wurde untersucht, ob die PatientInnen beschwerdefrei waren, oder unter Bauchschmerzen, Fieber, Hämatochezie oder Diarrhoe litten. Weiters wurde untersucht, ob ein Zusammenhang mit einer vorangegangenen bzw. aktuellen Medikation besteht.

2.4 Gruppeneinteilung

Für diese Studie wurden ursprünglich 57 Kinder und Jugendliche ileokoloskopiert und biopsiert. Diese wurden bereits vor der Ileokoloskopie in die Studie eingeschlossen. Eine Gruppeneinteilung war zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, da eine definitive Diagnose erst nach der makroskopischen und histologischen Beurteilung erfolgen konnte. Von den 57 ileokoloskopierten Kindern und Jugendlichen wurden anfangs 18 der MC-Gruppe zugeteilt, 12 waren CU-PatientInnen und wiederum 18 kamen in die Kontrollgruppe, d.h. bei diesen bestand zwar der initiale Verdacht einer CED, der histologische Befund war letztlich aber bland. Weitere 9 PatientInnen wurden der Gruppe „andere Erkrankung“ (AE) zugeteilt, welche zwar eine Entzündung in der Histologie aufwiesen, die allerdings nicht einer CED zuzuordnen war. Bei 2 weiteren Kindern, welche der Kontroll- und der AE-Gruppe zugeordnet waren, kam es aufgrund der nicht verwertbaren Daten zum Studienausschluss. 3 PatientInnen wechselten die Gruppe: ein Kind aus der MC-Gruppe kam in die Kontrollgruppe, da dieses lediglich nach einer Appendektomie im OP-Präparat evtl. für MC sprechende Veränderungen aufwies, im histologischen Befund der Ileokoloskopie allerdings keinerlei Entzündungsaktivität zeigte und auch klinisch beschwerdefrei war. 2 Kinder wechselten von der Kontrollgruppe in die Gruppe AE, da hier in der histologischen Analyse doch geringgradige entzündliche Veränderungen gefunden wurden.

Letztlich ergab sich für eine Gesamtzahl von **55 Kindern und Jugendlichen** folgende Gruppenzuteilung:

1. Kontrollgruppe: $n=16$
2. Gruppe mit MC: $n=17$
3. Gruppe mit CU: $n=12$
4. Gruppe mit AE: $n=10$

2.5 Probenauswertung

Im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMF) der MUG wurde aus den Darm-Biopsien RNA isoliert, komplementäre DNA synthetisiert und daraus mit Hilfe der quantitativen rt-PCR-Methode (realtime polymerase chain reaction) unter Bezugnahme auf ein „Housekeeping-Gen“ (GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) relevante Expressionsmuster von GS-Transportern bestimmt.

Die Auswertung der Biopsien erfolgte in insgesamt drei Durchgängen. Die ersten beiden fanden bereits im Oktober 2011 und März 2012 statt, wo die Bestimmung von ASBT und FXR im Ileum, sowie MRP3 und CYP3A4 (Cytochrom P450 3A4) im Colon, iNOS (induzierbare NO-Synthase) und GAPDH durchgeführt wurde. In einem dritten Durchgang (Jänner 2013), für den bereits tiefgefrorene cDNA (complementary DNA) der ersten beiden Durchgänge verwendet wurde, erfolgte die zusätzliche Bestimmung von FGF19, CYP3A4, GLP1 (Glucagon-like-peptide 1) und iNOS für die Ileum-Biopsien, sowie die Ermittlung von iNOS, GLP1 und GPBAR1 (G protein-coupled bile acid receptor 1) für die Colon-Gewebeproben. Auch hier wurde zur Normalisierung GAPDH verwendet. Die GPBAR1-Werte konnten aufgrund einer PCR-Kontamination nicht verwendet werden.

2.5.1 RNA-Isolierung

Vor der Durchführung der RNA-Isolierung wurde die Arbeitsfläche mit 70%igem Alkohol desinfiziert und die benötigten Utensilien (Stößel, Mörser, etc.) mit Aceton

gereinigt. RNA-Reste auf Pipetten wurden mittels UV-Crosslinker[®] quervernetzt. Die bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Gewebeproben (s.o.) wurden in Eppendorf Reaktionsgefäßen homogenisiert und primär mit 800µl Tri-Reagent (Fa. Sigma Aldrich) und 160µl Chloroform versetzt. Nach 15 minütiger Durchmischung mittels Drehscheibe wurden 70%-iger Alkohol und Isopropanol hinzugefügt und nach einem 20 minütigem Zentrifugationsschritt die obere RNA haltige Phase abgehoben. Nach einem Reinigungsschritt mit Isopropanol wurde das RNA-Pellet in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend konnte die Konzentration mittels Photometrie vermessen werden. Letztlich wurde die Qualität der RNA auf einem 1%igem Agarosegel (LE-Agarose) (Vergleich 18s und 28s Banden) bestimmt.

2.5.2 cDNA-Synthese

Die cDNA ist eine DNA, die mithilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ (RT) aus der zuvor isolierten, einzelsträngigen RNA synthetisiert werden kann. Die cDNA wurde mittels Oligo-dT Primer synthetisiert, die am Poly-Adenin Strang der RNA binden. Am Ende des RNA-Stranges kann sich dadurch ein Stück Doppelstrang bilden, an dem nach Hinzufügen der RT Nukleotide (sog. „dNTP“) binden können.

2.5.3 Real-time quantitative PCR

Die rt-PCR, oder auch qPCR (Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion), dient der Amplifikation von Nukleinsäuren und ermöglicht zusätzlich zur herkömmlichen PCR-Methode die Quantifizierung der gewonnenen DNA und die Konzentrationsbestimmung in Echtzeit. Da die qPCR in diesem Fall mit einer vorgeschalteten RT (s.o.) kombiniert wurde, sprechen wir von einer sog. qRT-PCR. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der während des PCR Zyklus entstehenden Fluoreszenz, die proportional zur Menge der PCR Produkte steigt.

Diese Quantifizierung wurde hier mit Hilfe des SYBR[®]Green Verfahrens auf dem AB7900HT von Applied Biosystems durchgeführt. Bei der SYBR[®] Green Methode arbeitet man mit 2 Primern und einem speziellen, grünlichen Fluoreszenzfarbstoff

(sog. SYBR[®] Green), der nukleinsäurespezifisch in die gebildete doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch stärker als freier Farbstoff fluoresziert. Aus der in Echtzeit gemessenen Fluoreszenz kann man schließlich auf die Menge der amplifizierten DNA schließen.

Die rt-PCR wurde bei dieser Studie auf einem GeneAmp 7900 Sequenz-Detektions-System mit einer GeneAmp 7900 SDS software durchgeführt. Die cDNA (3,5µl) wurde in einem 20µl Reaktionsmix (10,5µl SYBR[®]GREEN Universal PCR Master Mix, 0,7 µl von genspezifischen forward und reverse Primern und 8,1 µl H₂O) quantifiziert. Folgende Thermocyclerbedingungen wurden verwendet: 2 Minuten 50°C, gefolgt von 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute. Die Reaktionen wurden als 2-fach-Ansatz in einer 96-Lochplatte durchgeführt. Am Ende jedes Durchgangs wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese auf die richtige Größe und Qualität geprüft. Die Daten aller Gene wurden gegen die für die Expression von GAPDH normalisiert.

2.6 Datenauswertung

Die gewonnenen Daten wurden in Microsoft Excel Tabellen aufgelistet, wobei ebenfalls alle Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet sowie die graphischen Darstellungen erstellt wurden. Die erhobenen rt-PCR-Daten wurden zusätzlich mittels SPSS statistisch ausgewertet, wofür der T-Test bei unabhängigen Stichproben zur Verwendung kam.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Patientencharakterisierung

3.1.1 Patientenzahl, Gruppeneinteilung, Geschlecht, Alter

Wie bereits in 2.4. erwähnt, wurden aus 55/57 koloskopierten und biopsierten Kindern und Jugendlichen die Gruppen „Kontrolle“ (n=16), „MC“ (n=17), „CU“ (n=12) und „AE“ (n=10) erstellt. Dabei zeigte sich eine relativ homogene Geschlechtsverteilung (s. Tab. 3-c). Die Kontrollgruppe inkludierte jeweils 9 weibliche und 7 männliche PatientInnen, während die MC-Gruppe 9 weibliche und 8 männliche StudienteilnehmerInnen umfasste. In der CU-Gruppe (6 weiblich, 6 männlich) und in der AE-Gruppe (5 weiblich, 5 männlich) war die Geschlechtsverteilung ausgeglichen. Die Altersverteilung lag zwischen 3 Monaten und 18 Jahren, wobei das Durchschnittsalter in der Kontrollgruppe 9,6 ($\pm 6,6$) Jahre, in der MC-Gruppe 13,8 ($\pm 3,3$) Jahre, in der CU-Gruppe 14,6 ($\pm 3,3$) Jahre und in der AE-Gruppe 10,6 ($\pm 6,4$) Jahre betrug (s. Tab. 3-c).

Für die Beurteilung der Gallensäuretransporter-mRNA-Expressionsmuster erstellten wir je nach Entnahmeort der Biopsien (Ileum, Colon) zwei Gruppen: Ileumbiopsien und Colonbiopsien. Da wir je nach Entzündungsaktivität Unterschiede in der mRNA-Expression feststellten, unterteilten wir die MC-Gruppe der Ileumbiopsien und die CU-Gruppe der Colonbiopsien noch jeweils in eine aktive und niedrig-aktive Gruppe. Diese Zuteilung erfolgte nach der Höhe der iNOS-Werte. Bei MC liegt der Fokus der Entzündung häufig im terminalen Ileum. Daher wurden bei den Ileumbiopsien jene der aktiven MC-Stadien mit jenen der niedrig-aktiven MC-Stadien genauer verglichen. Eine derartige Unterteilung der Ileumbiopsien der CU-PatientInnen in eine aktive CU- und niedrig-aktive CU-Gruppe war nicht relevant, da bei CU in der Regel keine wesentliche Entzündung im Ileum vorliegt. Hingegen erfolgte für die CU-Gruppe bei den Colonbiopsien. Da unter allen Gruppen das Colon bei CU am stärksten entzündlich betroffen ist, wurden hier die Colonbiopsien der aktiven CU-PatientInnen und niedrig-aktiven

CU-Patientinnen im Detail verglichen. Aufgrund der meist gering ausgeprägten entzündlichen Veränderungen im Colon bei MC, wurde auf eine noch detailliertere Aufteilung der Colonbiopsien bei MC und den anderen Gruppen verzichtet. Wie in 2.5 bereits erwähnt, fanden drei Auswertungsdurchgänge statt, wobei die Ergebnisse der ersten beiden Durchgänge zusammengefasst wurden. So ergab sich folgende Gruppenzuteilung bei den Gallensäuretransporter-Expressionsmustern (n=Anzahl der Biopsien):

Tabelle 3-a: Gruppenzuteilung der Ileum-Biopsien (n=Anzahl der Biopsien)

<u>Ileum-Biopsien</u>	1.+2. Durchgang	3. Durchgang
Kontrolle	n=14	n=9
MC aktiv	n=6	n=3
MC niedrig-aktiv	n=9	n=9
CU	n=12	n=9
AE	n=10	n=5

Tabelle 3-b: Gruppenzuteilung der Colon-Biopsien (n=Anzahl der Biopsien)

<u>Colon-Biopsien</u>	1.+2. Durchgang	3. Durchgang
Kontrolle	n=16	n=14
MC	n=18	n=15
CU aktiv	n=7	n=5
CU niedrig-aktiv	n=6	n=5
AE	n=14	n=6

3.1.2 Symptome

Wir untersuchten die Zahl der PatientInnen, die vor der Ileokoloskopie Beschwerdefreiheit, Bauchschmerzen, Fieber, Hämatochezie oder Diarrhoe angaben (s. Tab. 3-c). Es stellte sich dabei heraus, dass das Leitsymptom und damit die häufigste Indikation für die Ileokoloskopie für die Kontrollgruppe mit 44% die Hämatochezie war, gefolgt von den Bauchschmerzen mit einer Häufigkeit von 38%. In der MC-Gruppe gaben zum Zeitpunkt der Untersuchung 41% der Kinder und Jugendlichen Bauchschmerzen und 35% Diarrhoe an. Beschwerdefrei waren

in der MC-Gruppe 5 PatientInnen (29%), wobei sich nur 1 Patientin in vollständiger klinischer und histologischer Remission befand. Die anderen 3 PatientInnen erreichten zwar eine klinische Remission, waren aber histologisch aktiv. 67% der CU-PatientInnen klagten über Hämatochezie und 58% gaben in der Anamnese Diarrhoe als Symptom an. Kein/e einzige/r Patient/in der CU-Gruppe präsentierte sich mit Fieber. 3 CU-PatientInnen (25%) waren beschwerdefrei und in klinischer Remission, allerdings histologisch und laborchemisch aktiv. Ebenso wie die KontrollpatientInnen litten 60% der AE-PatientInnen an Hämatochezie und 40% an Bauchschmerzen.

Tabelle 3-c: PatientInnencharakterisierung: a) PatientInnendaten, b) Symptome vor der Ileocoloskopie, c) Entzündungslokalisation

	Kontrolle	MC	CU	Andere
<i>(a) PatientInnenendaten</i>				
Anzahl	n=16	n=17	n=12	n=10
Geschlecht (w/m)	9w / 7m	9w / 8 m	6w / 6m	5w / 5m
Alter (in Jahren)	9,56 ± 6,60	13,82 ± 3,32	14,58 ± 3,26	10,60 ± 6,40
<i>(b) Symptome vor der Ileocoloskopie (%)</i>				
Beschwerdefreiheit	2 (12,5)	5 (29)	3 (25)	2 (20)
Bauchschmerzen	6 (37,5)	7 (41)	3 (25)	4 (40)
Fieber	1 (6,25)	2 (12)	0 (0)	2 (20)
Hämatochezie	7 (43,75)	2 (12)	8 (67)	6 (60)
Diarrhoe	3 (18,75)	6 (35)	7 (58)	3 (30)
<i>(c)Entzündungslokalisation (%)</i>				
Ileum terminale	0 (0)	10 (59)	0 (0)	5 (50)
Coecum	1 (6)	10 (59)	6 (50)	3 (30)
Colon ascendens	0 (0)	8 (47)	6 (50)	5 (50)
Colon transversum	0 (0)	8 (47)	7 (58)	3 (30)
Colon descendens	0 (0)	8 (47)	10 (83)	3 (30)
Colon sigmoideum	0 (0)	8 (47)	10 (83)	3 (30)
Rektum	0 (0)	9 (53)	11 (92)	2 (20)

3.1.3 Entzündungslokalisation

Tabelle 3-c zeigt die Verteilung der Entzündungslokalisationen in den verschiedenen Gruppen. Es ist zu sehen, dass in der MC-Gruppe alle Darmabschnitte entzündlich betroffen waren, allerdings waren mit jeweils 58,8% der Fälle das terminale Ileum und das Coecum am häufigsten befallen. In 52,9%

der Fälle war die Entzündung auch im Rektum lokalisiert und damit häufiger als in den übrigen Colonabschnitten (je 47,1%). Bei den CU-PatientInnen fand sich die Entzündung zu 91,7% im Rektum, wobei die Häufigkeit der entzündlichen Aktivität nach proximal hin abnahm. So waren Colon sigmoideum, als auch Colon descendens in 83,3%, Colon ascendens und Colon transversum nur mehr in 50-58,3% der Fälle befallen. Dennoch fanden sich immerhin noch bei 50% der CU-PatientInnen entzündliche Veränderungen im Coecum. Im terminalen Ileum war in keinem der CU-Fälle eine Entzündung nachweisbar. In der AE-Gruppe waren alle Darmabschnitte entzündlich befallen, wobei das terminale Ileum (50%) und das Colon ascendens (50%) die häufigsten Entzündungslokalisationen darstellten. In der Kontrollgruppe konnte bei niemandem ein entzündliches Geschehen nachgewiesen werden. Nur ein Patient hatte eine sehr gering ausgeprägte Entzündung an einer für uns nicht relevanten Stelle im Zökum, da wir für unsere Studie von diesem Patienten eine unauffällige Biopsie vom Colon descendens verwendeten.

3.1.4 Medikamentöse Therapie

Für diese Studie untersuchten wir, ob und wenn ja, welche Medikation zum Zeitpunkt der Biopsie oder kurz davor eingenommen wurde. In Tabelle 3-d sind die unterschiedlichen medikamentösen Therapien zu sehen.

In der **MC-Gruppe** wurde ein Patient im Rahmen einer Helicobacter-pylori-Eradikation mit relevanten Antibiotika (z.B.: Doxybene[®]) und einem Protonenpumpeninhibitor (Pantoprazol[®]) therapiert. 6 MC-PatientInnen erhielten zum Zeitpunkt der Ileokoloskopie bereits eine MC-spezifische Therapie mit Corticosteroiden (2x Aprednislon[®] =Prednisolon), Immunsuppressiva (3x Imurek[®] =Azathioprin, 1x Ebetrexat[®] =Methotrexat), Aminosalizylaten (3x Pentasa[®] und 1x Salofalk[®] =Mesalazin) und Biologika (1x Remicade[®] =Infliximab). Diejenigen mit Cortison-Einnahme wurden zusätzlich mit einem Protonenpumpeninhibitor (PPI) behandelt. Als eine langzeitanamnestisch zu erhebende Medikation, die zum Zeitpunkt der Endoskopie nicht mehr eingenommen wurde, erhielten drei PatientInnen Imurek[®] (=Azathioprin) und Infliximab, sowie jeweils 2 PatientInnen

Humira® (=Adalimumab) und Methotrexat. Dreimal wurde Pentasa® (=5-ASA) verordnet und eine PatientIn erhielt Cortison. Ebenfalls eine Patientin wurde vor der Biopsie aufgrund einer Angina tonsillaris mit einem Antibiotikum behandelt.

In der **CU-Gruppe** wurden drei PatientInnen aktuell mit Cortison therapiert, vier mit Salofalk® (=5-ASA) und ebenfalls vier mit Imurek®. 1 Patient erhielt Ursofalk® (=Ursodeoxycholsäure) und ein weiterer wurde aufgrund einer Eisenmangelanämie mit Ferretab® therapiert. Vorangegangene Medikationen waren Mesalazin (1x Pentasa®, 1x Salofalk®, 1x Claversal®), 1x Sulfasalazin (Salazopyrin®), sowie 2x Cortison in Kombination mit Losec® (=Omeprazol).

Tabelle 3-d: Medikamentöse Therapie (%): a) aktuelle Medikation, b) langzeitanamnestisch zu erhebende Medikation, die zum Zeitpunkt der Endoskopie nicht mehr eingenommen wurde

	Kontrolle n=16	MC n=17	CU n=12	Andere n=10
(a) aktuelle Medikation (%)				
Antibiotikum	2 (12,5)	1 (5,88)	-	1 (1)
Sultanol	1 (6,25)	-	-	1 (1)
Singulair	1 (6,25)	-	-	-
Antihistaminikum	1 (6,25)	-	-	-
Cyklokapron	-	-	-	1 (1)
Laxanzien	-	-	-	1 (1)
Eisenpräparate	1 (6,25)	-	1 (8,33)	1 (1)
Euthyrox	1 (6,25)	-	-	-
Oleovit D3	1 (6,25)	-	-	-
Probiotikum	1 (6,25)	1 (5,88)	-	-
Ditropan	1 (6,25)	-	-	-
Paracetamol	-	1 (5,88)	-	-
NSRI	1 (6,25)	-	-	1 (1)
Protonenpumpeninhibitor	2 (12,5)	4 (23,5)	-	-
Ulcogant	-	1 (5,88)	-	-
Anticholingergikum	-	1 (5,88)	-	-
Corticosteroide	2 (12,5)	2 (11,76)	3 (25,00)	-
Azathioprin	-	3 (17,65)	4 (33,33)	-
Infliximab	-	1 (5,88)	-	-
Methotrexat	-	1 (5,88)	-	-
Mesalazin	-	3 (17,65)	4 (33,33)	-
Folsäure	-	1 (5,88)	-	-
Multibionta-Plus	-	1 (5,88)	-	-
Ursofalk	-	-	1 (8,33)	-
	-	-	-	-
(b) vorangegangene Medikation (%)				
Sultanol	1 (6,25)	-	-	-
ThromboASS	-	-	-	1 (1)
Antibiotikum	-	1 (5,88)	1 (8,33)	1 (1)
Ganzyklovir	-	-	-	1 (1)
Protonenpumpeninhibitor	-	-	2 (16,67)	-
Corticosteroide	-	1 (5,88)	2 (16,67)	1 (1)
Azathioprin	-	3 (17,65)	-	-
Infliximab	-	3 (17,65)	-	-
Mesalazin	-	3 (17,65)	3 (25,00)	-
Sulfasalazin	-	-	1 (8,33)	-
Methotrexat	-	2 (11,76)	-	-
Adalimumab	-	2 (11,76)	-	-
Oleovit D3	-	1 (5,88)	-	-
Advit 4	-	1 (5,88)	-	-
Eisenpräparate	-	2 (11,76)	-	1 (1)
Diflucan	1 (6,25)	-	-	-

3.1.5 Laborwerte

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Entzündungsgeschehen und der Veränderung der Gallensäuretransporterexpression herstellen zu können,

untersuchten wir die PatientInnendaten auf die Entzündungswerte CRP, Leukozyten und Stuhl-Calprotectin (s. Tab. 3-e). Es zeigte sich, dass die Leukozyten im Durchschnitt bei allen vier Gruppen im Normbereich waren (8-12 g/l bei Kindern und Jugendlichen). Hingegen - wie auch Tabelle 3-e zu entnehmen - war das CRP im Durchschnitt in der MC-, aber v.a. auch in der AE-Gruppe erhöht (Norm für Kinder/Jugendliche <5 mg/l). Auch in der CU-Gruppe zeigten sich durchschnittlich leicht erhöhte CRP-Werte, wobei aber nur 3/12 CU-PatientInnen tatsächlich ein erhöhtes CRP hatten. Bei diesen PatientInnen entsprach der histologische Befund im Vergleich zu jenem der anderen CU-PatientInnen einer als „hochgradig“ eingestuftem aktiven Entzündung. In der Kontrollgruppe lag das CRP im Normbereich. Hinsichtlich des Stuhl-Calprotectins wurden in allen vier Gruppen erhöhte Werte gemessen (Norm < 50 µg/g). Der durchschnittlich höchste Wert ist in der AE-Gruppe zu finden, was sich durch 2 PatientInnen mit Werten >1800 µg/g bei vergleichsweise geringer PatientInnenanzahl in der AE-Gruppe erklären lassen könnte. Nur jeweils 1 PatientIn aus der MC- und CU-Gruppe wies normale Stuhl-Calprotectin-Werte auf. Im Vergleich zum CU-Patient konnten bei der MC-Patientin allerdings erhöhte Werte von Leukozyten und CRP nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe wurden mit maximal 540 µg/g keinesfalls so hohe Stuhl-Calprotectin-Werte wie in der MC- oder CU-Gruppe gefunden.

Tabelle 3-e: Entzündungswerte, # St-Calprotectin: Kontrolle n=11, MC n=14, CU n=11, AE n=6

	Kontrolle (n=16)	MC (n=17)	CU (n=12)	Andere (n=10)
CRP (mg/l)	2,61 ± 3,22	23,29 ± 23,90	9,56 ± 16,82	26,65 ± 35,02
Leukozyten (g/l)	8,73 ± 6,49	8,73 ± 3,32	6,60 ± 1,12	9,12 ± 4,46
St-Calprotectin (µg/g)	168,00 ± 162,39	687,29 ± 588,31	545,91 ± 521,77	801,00 ± 787,97

3.2 Expressionsmuster

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Expressionsmuster erläutert. Um einen Vergleich der einzelnen Gruppen zur Kontrolle zu ermöglichen, wurde der Wert der Kontrollgruppe als 100% angenommen. Wie in den nächsten Punkten zu sehen ist, entstehen dadurch in den zu vergleichenden Gruppen oft

Werte >100%. Zur besseren Veranschaulichung soll die Prozentangabe im Folgenden dennoch beibehalten werden.

3.2.1 GAPDH

Die Bestimmung der GS-Transporter-Expression erfolgte unter Bezugnahme des Housekeeping-Gens GAPDH. Wie den Tabellen 3-g und 3-h zu entnehmen ist, wurde GAPDH im Vergleich zur Kontrollgruppe im Durchschnitt in allen Gruppen vermehrt exprimiert. Nur die GAPDH-Werte der AE-Gruppe im Colon waren vergleichsweise niedriger als bei den anderen PatientInnen. Bei Durchsicht der einzelnen Werte ist zu sehen, dass diese sowohl in der Ileum-, als auch in der Colon-Gruppe stark variieren. Ein Zusammenhang konnte weder mit dem Alter noch mit dem Geschlecht gefunden werden. Die Werte der CU-Gruppe (131,9%) waren im Ileum im Vergleich zu jener der Kontrollgruppe signifikant verändert ($p=0,046$).

Tabelle 3-f: GAPDH-Werte Ileum (1.+2. Durchgang); * $p<0,05$

	Kontrolle (n=14)	MC aktiv (n=6)	MC niedrig aktiv (n=10)	CU (n=12)	AE (n=9)
Mean %	100,00	140,77	102,92	131,91*	133,46
SD %	39,10	61,95	24,43	46,86	73,95

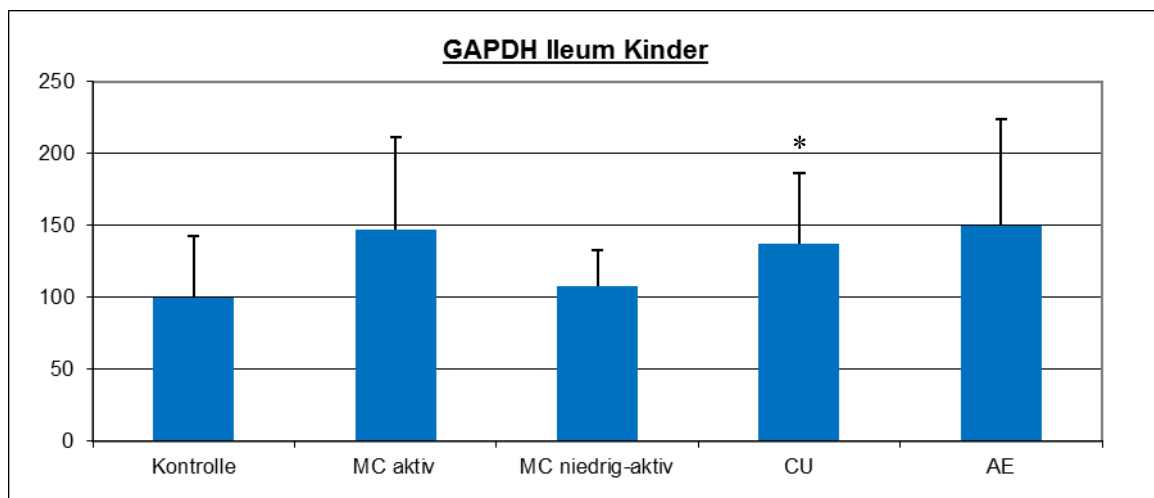


Abbildung 2: GAPDH Ileum (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten

Tabelle 3-g: GAPDH-Werte Colon (1.+2. Durchgang)

	Kontrolle (n=16)	MC (n=18)	CU aktiv (n=7)	CU niedrig-aktiv (n=6)	AE (n=14)
Mean %	100,00	135,80	111,27	110,22	83,47
SD %	62,00	72,96	67,21	68,16	40,86

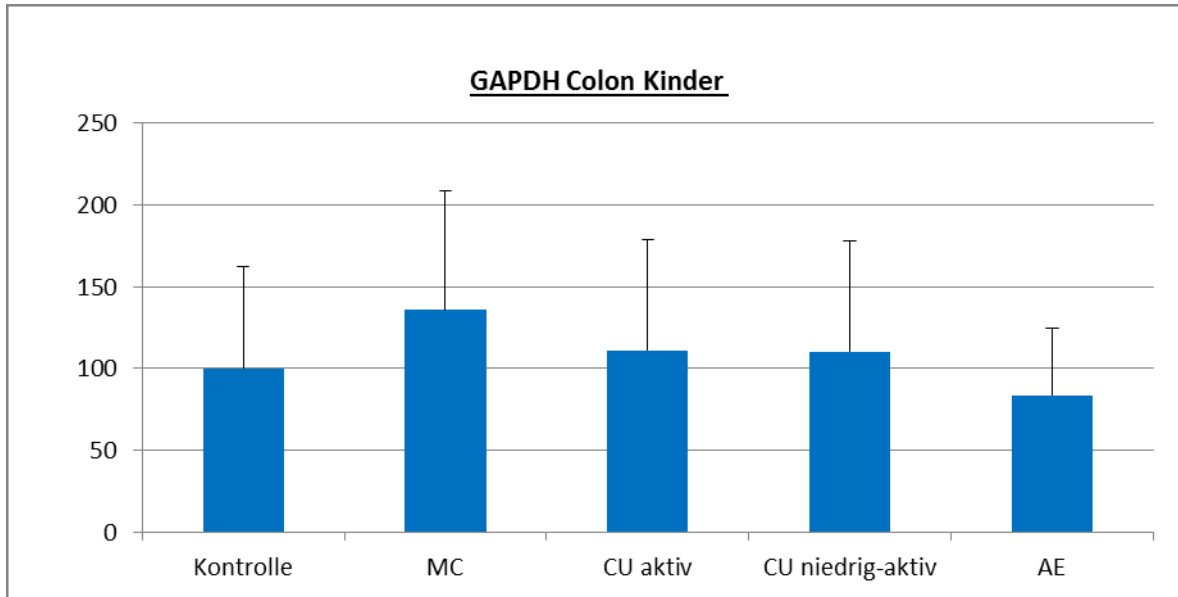


Abbildung 3: GAPDH Colon (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.2 iNOS

Für diese Studie wurde iNOS als Positivkontrolle verwendet. Nach diesen iNOS-Werten erfolgte, wie schon in 3.1.1. erwähnt, die Zuordnung zu den „aktiven“ und „niedrig-aktiven“ Gruppen. iNOS war im Ileum in der MC aktiv-Gruppe (1368,15%) gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand eine Signifikanz von $p < 0,001$. MC niedrig-aktiv, CU- und die AE-Gruppe zeigten nur sehr leichte, nicht signifikante Erhöhungen gegenüber der Kontrollgruppe.

Tabelle 3-h: iNOS/GAPDH-Werte Ileum (1.+2. Durchgang); ***p<0,001

	Kontrolle (n=14)	MC aktiv (n=6)	MC niedrig-aktiv (n=9)	CU (n=12)	AE (n=9)
Mean %	100,00	1368,15***	194,68	169,19	205,93
SD %	126,01	816,66	142,64	190,85	228,55

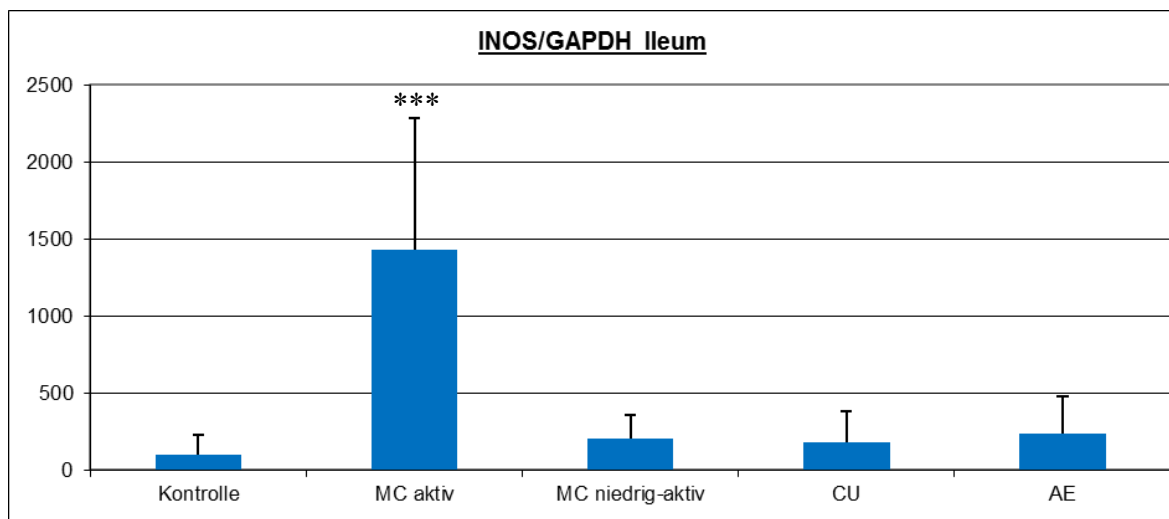


Abbildung 4: iNOS/GAPDH Ileum (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

Im Colon konnte eine signifikante iNOS-Erhöhung der CU aktiv-PatientInnen (1795%) gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden ($p < 0,001$). Die MC-Gruppe wies die größte Streuung auf, da vor allem ein MC-Patient einen vergleichsweise hohen iNOS-Wert hatte. Interessanterweise handelte es sich hierbei um einen Patienten, der sich zwar klinisch in Remission befand, histologisch allerdings aktiv-entzündliche Veränderungen in allen Darmabschnitten aufwies und dessen Entzündungswerte (CRP, Leukozyten, St-Calprotectin) ebenfalls erhöht waren.

Tabelle 3-i: iNOS/GAPDH-Werte Colon (1.+2. Durchgang); ***p<0,001

	Kontrolle (n=16)	MC (n=18)	CU aktiv (n=7)	CU niedrig-aktiv (n=6)	AE (n=14)
Mean %	100,00	305,93	1795,26***	134,87	193,37
SD %	123,73	467,62	1131,91	153,18	231,55

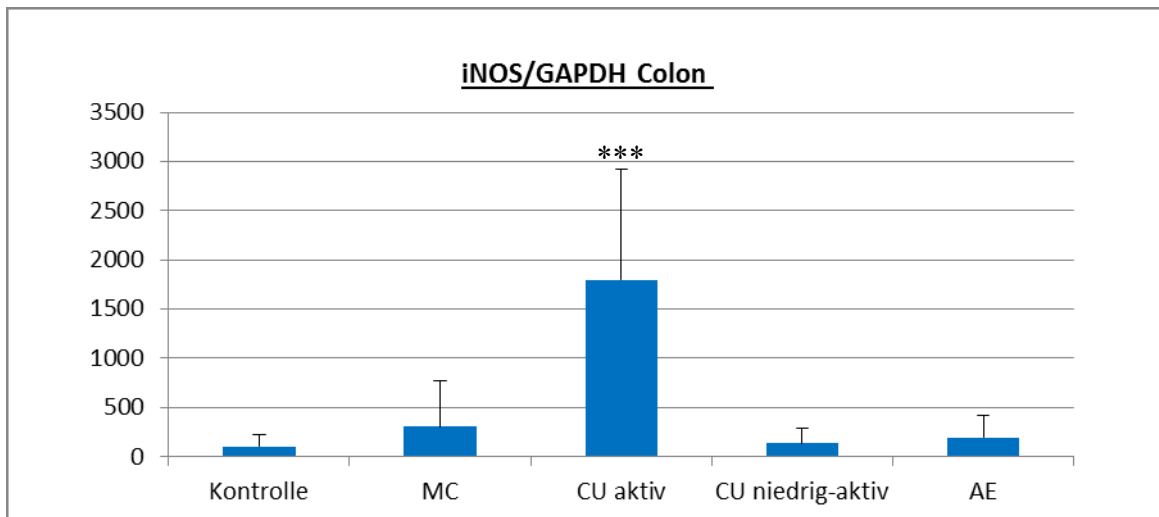


Abbildung 5: iNOS/GAPDH Colon (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.3 CYP3A4

Im Ileum war CYP3A4 in der MC aktiv Gruppe (25,3%) gegenüber der Kontrolle signifikant verringert ($p=0,006$). Ansonsten zeigten die Expressionen von CYP3A4 bei allen PatientInnen ähnliche und im Vergleich zur Kontrolle leicht erniedrigte Werte.

Tabelle 3-j: CYP3A4/GAPDH-Werte Ileum (3. Durchgang); ** $p < 0,01$

	Kontrolle (n=9)	MC aktiv (n=3)	MC niedrig-aktiv (n=9)	CU (n=9)	AE (n=5)
Mean %	100,00	25,32**	95,86	87,06	87,37
SD %	30,76	35,64	77,06	46,32	36,78

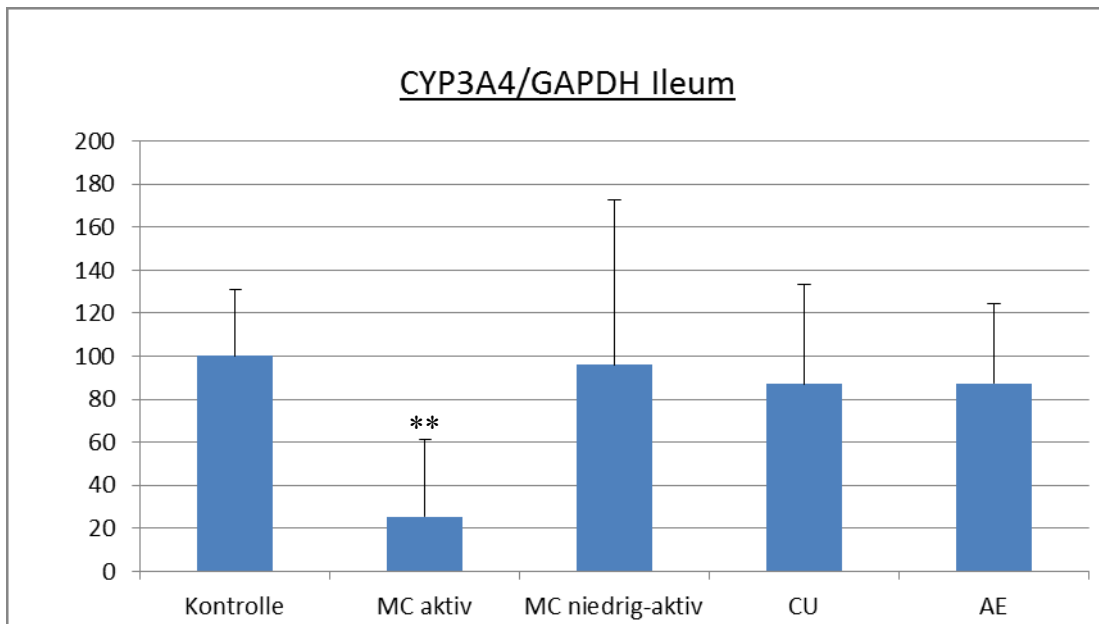


Abbildung 6: CYP3A4/GAPDH Ileum (3. Durchgang). Angaben in Prozenten.

Die Streuungen für die CYP3A4-Expression waren im Colon sehr groß. Auch hier konnte kein Grund für die unterschiedlich hohen Werte gefunden werden. Aufgrund technischer Probleme mussten vier PatientInnen ausgeschlossen werden. Die AE-Gruppe wies die größte mRNA-Expression (571%) von CYP3A4 auf, die im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war ($p=0,037$). Ebenfalls erhöht, aber ohne statistische Signifikanz, war die CU niedrig-aktiv-Gruppe (198%). Bei der CU aktiv-Gruppe (150%) konnte man zwar eine leichte Steigerung gegenüber der Kontroll- und MC-Gruppe beobachten, allerdings eine Erniedrigung im Vergleich zum Mittelwert der CU niedrig-aktiv- und AE-Gruppe. Die Werte der MC-PatientInnen (93%) waren durchschnittlich geringer, wenn auch ähnlich denen der Kontrollgruppe.

Tabelle 3-k: CYP3A4/GAPDH-Werte Colon (1. + 2. Durchgang); # Aufgrund technischer Probleme konnten nicht alle Daten miteingeschlossen werden; * $p<0,05$

	Kontrolle (n=14) [#]	MC (n=17) [#]	CU aktiv (n=7)	CU niedrig-aktiv (n=6)	AE (n=14)
Mean %	100,00	93,42	150,19	198,38	571,25*
SD %	89,10	87,50	142,75	328,03	796,65

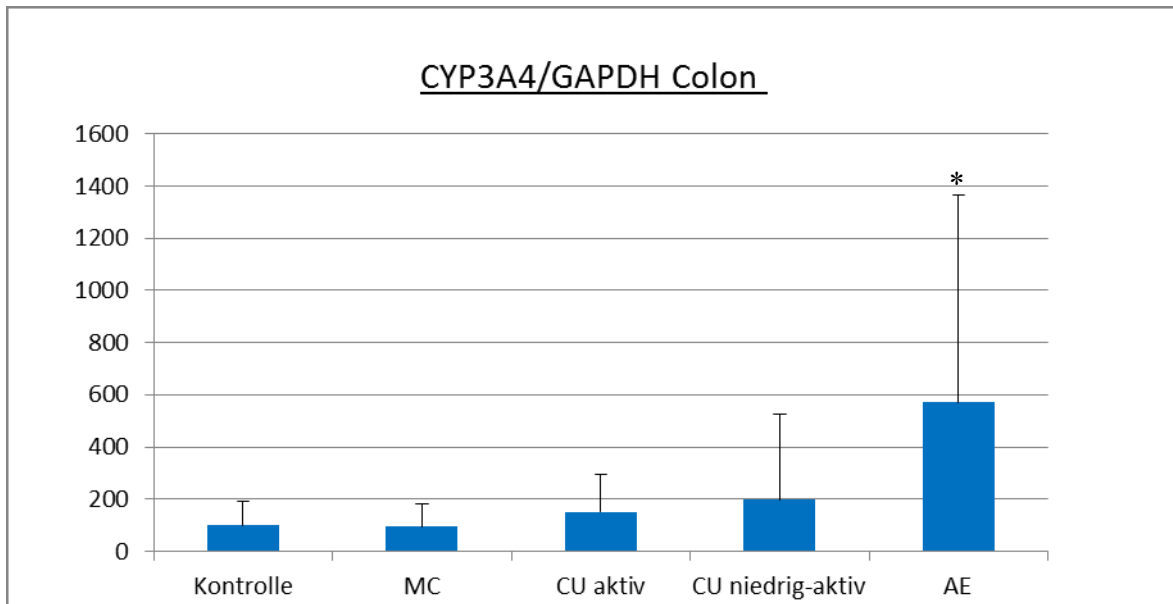


Abbildung 7: CYP3A4/GAPDH Colon (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.4 GLP1

Bei den Ileumbiopsien zeigte sich, dass GLP1 im Durchschnitt im Vergleich zu den anderen Gruppen in der MC aktiv- und AE-Gruppe erhöht war - allerdings nicht signifikant. Als Grund für diese Erhöhung könnte die Tatsache, dass in diesen beiden Gruppen die Teilnehmerzahl erheblich geringer war als in den Vergleichsgruppen, überlegt werden. MC niedrig-aktiv und CU zeigten zwar leichte Erniedrigungen gegenüber der Kontrollgruppe, allerdings keine signifikanten Veränderungen.

Tabelle 3-I: GLP1/GAPDH-Werte Ileum (3. Durchgang)

	Kontrolle (n=9)	MC aktiv (n=3)	MC niedrig-aktiv (n=9)	CU (n=9)	AE (n=5)
Mean %	100,00	171,05	85,15	90,84	128,25
SD %	44,09	94,21	58,38	54,76	58,60

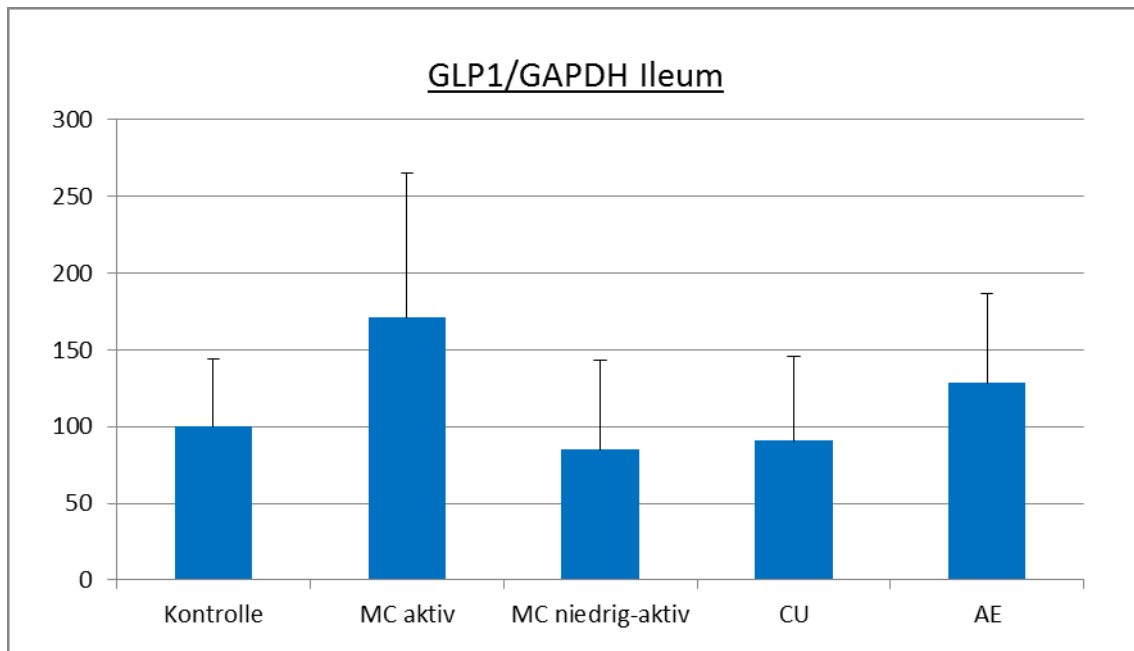


Abbildung 8: GLP1/GAPDH Ileum (3. Durchgang). Angaben in Prozenten.

GLP1 war im Colon in allen Gruppen leicht und für die AE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar signifikant erhöht ($p=0,041$). In der MC- und AE-Gruppe gab es große Streuungen. Grund hierfür war, dass in diesen Gruppen jeweils zwei PatientInnen sehr hohe Werte erreichten. Es konnten keine Gründe oder erklärende Zusammenhänge dafür gefunden werden.

Tabelle 3-m: GLP1/GAPDH-Werte Colon (3. Durchgang); # hier wurden Daten aufgrund technischer Probleme entfernt; * $p<0,05$

	Kontrolle (n=13)[#]	MC (n=15)	CU aktiv (n=5)	CU niedrig-aktiv (n=5)	AE (n=6)
Mean %	100,00	191,73	182,78	150,24	272,33*
SD %	83,38	173,94	101,08	108,58	263,72

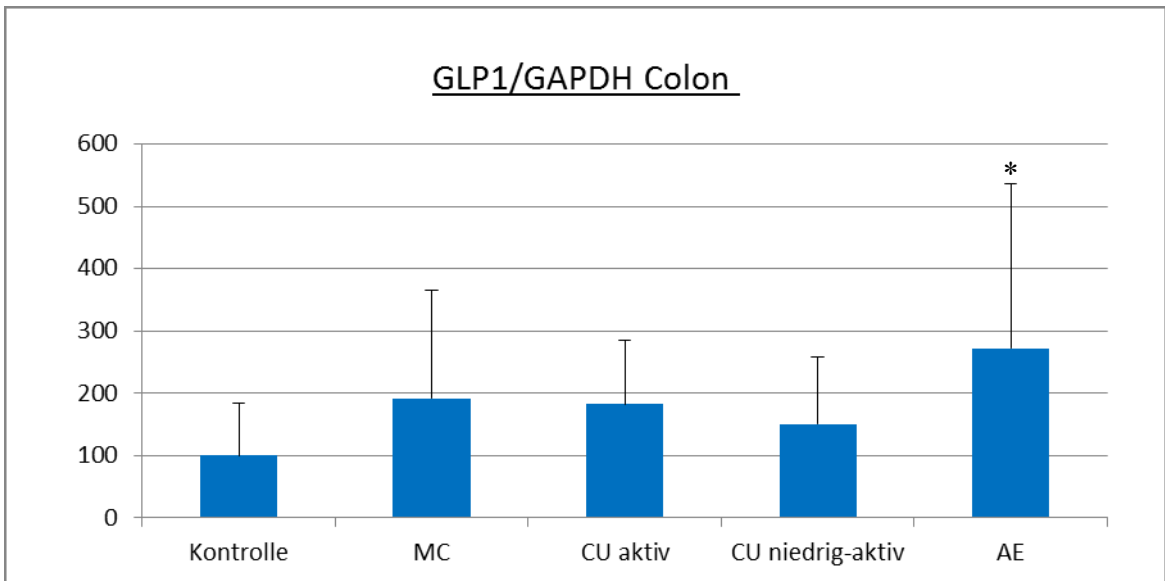


Abbildung 9: GLP1/GAPDH Colon (3. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.5 MRP3

Die Expression des basolateralen GS-Transporters MRP3 wurde in dieser Studie nur im Colon untersucht. Die Kontroll- und die AE-Gruppe wiesen die höchsten, aber ähnliche Werte auf. CU-aktiv-PatientInnen hatten im Durchschnitt eine gegenüber allen anderen Gruppen verringerte MRP3-Expression, die gegenüber der Kontrollgruppe mit einer $p=0,051$ sogar an der Grenze zur statistischen Signifikanz lag. Die Werte der CU-niedrig-aktiv-Gruppe (74,4%) waren insgesamt höher als die der CU-aktiv-PatientInnen (60,4%), allerdings geringer, als die der anderen Gruppen. Der MRP3-Mittelwert bei MC-PatientInnen (78,2%) war höher als in den CU-Gruppen, aber im Vergleich zur Kontroll- und AE-Gruppe sichtbar verringert. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nirgends erreicht werden.

Tabelle 3-n: MRP3/GAPDH-Werte Colon (1.+2. Durchgang)

	Kontrolle (n=16)	MC (n=18)	CU aktiv (n=7)	CU niedrig-aktiv (n=6)	AE (n=14)
Mean %	100,00	78,16	60,42	74,38	95,35
SD %	45,68	30,31	32,18	10,86	29,08

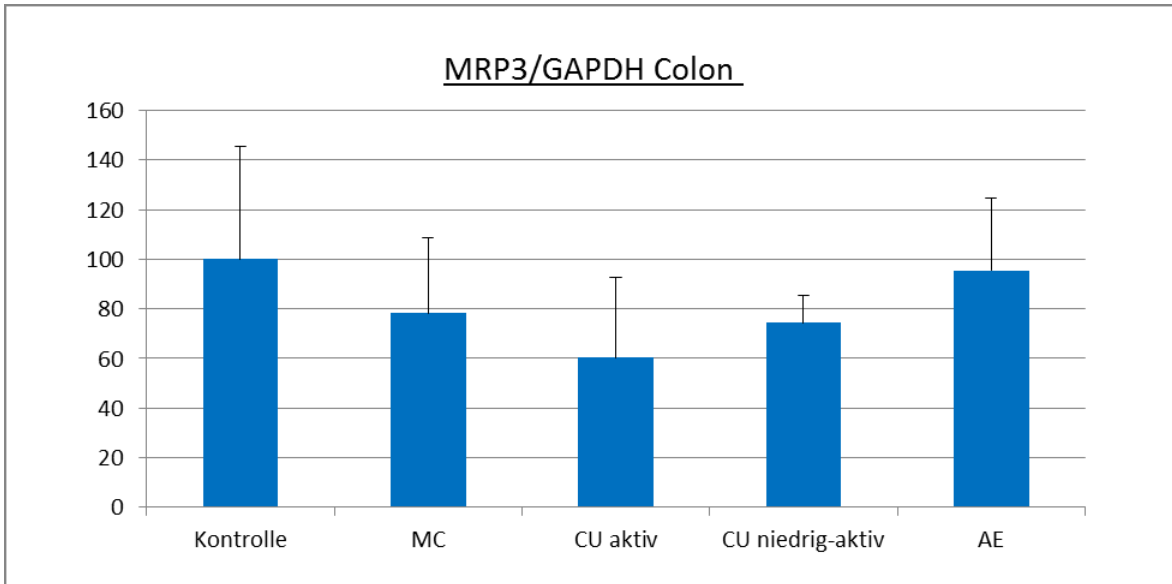


Abbildung 10: MRP3/GAPDH Colon (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.6 ASBT

In Tabelle 3-p ist zu erkennen, dass die mRNA-Expression von ASBT bei PatientInnen mit aktivem MC (15,6%) gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert war ($p < 0,001$). In der MC-niedrig-aktiv-Gruppe (52,3%) war ASBT zwar im Durchschnitt stärker exprimiert als bei den MC-aktiv-PatientInnen, aber im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant verringert ($p = 0,006$). Leichte ASBT-Erniedrigungen gegenüber der Kontrollgruppe konnten bei CU- und AE-PatientInnen festgestellt werden.

Tabelle 3-o: ASBT/GAPDH-Werte Ileum (1.+ 2. Durchgang); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

	Kontrolle (n=14)	MC aktiv (n=6)	MC niedrig-aktiv (n=9)	CU (n=12)	AE (n=9)
Mean %	100,00	15,64***	52,33**	93,10	76,32
SD %	37,40	17,03	37,33	62,12	56,56

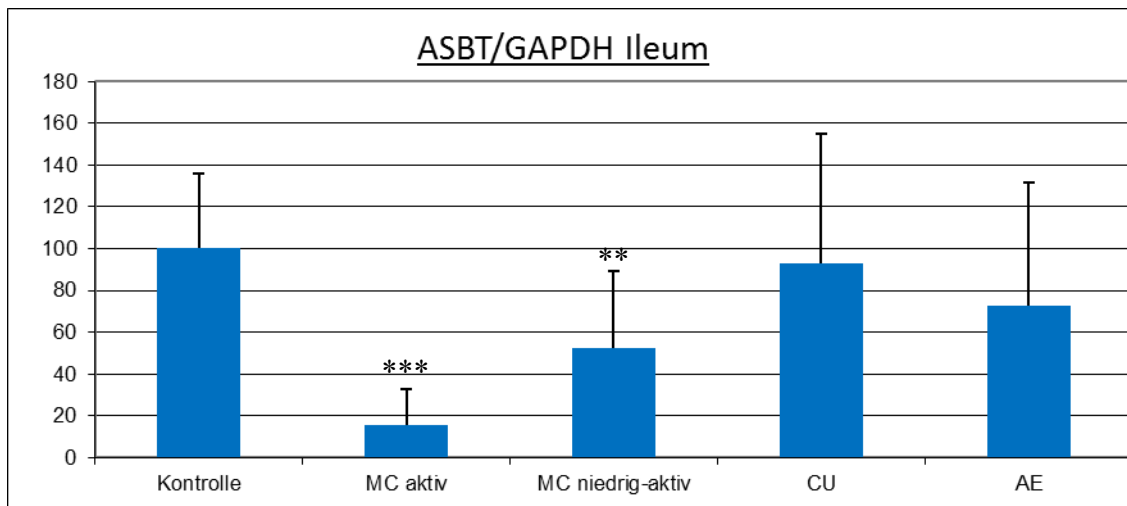


Abbildung 11: ASBT/GAPDH Ileum (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.7 FXR

Für die Expression des Kernrezeptors FXR zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine Verminderung in allen Gruppen. Für die MC-aktiv-Gruppe (59,5%) ergab sich eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,019$). Die zweitniedrigsten Werte zeigte die CU-Gruppe (78,1%), gefolgt von den MC-niedrig-aktiv- (83,3%) und AE-PatientInnen, wobei diese drei Gruppen sehr ähnliche Werte aufwiesen.

Tabelle 3-p: FXR/GAPDH-Werte Ileum (1.+2. Durchgang), * $p<0,05$

	Kontrolle (n=14)	MC aktiv (n=6)	MC niedrig-aktiv (n=9)	CU (n=12)	AE (n=9)
Mean %	100,00	59,45*	83,28	78,13	88,47
SD %	35,20	29,75	53,31	31,31	40,61

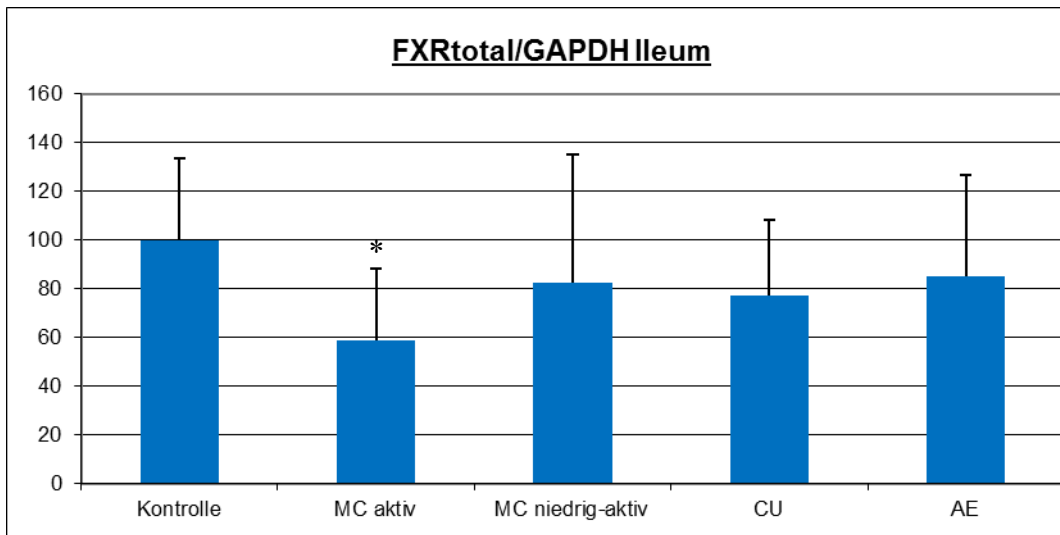


Abbildung 12: FXR/GAPDH Ileum (1. + 2. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.8 FGF19

Die Expression von FGF19 wurde im Ileum gemessen. Die Werte waren innerhalb jeder einzelnen Gruppe sehr unterschiedlich, allerdings ist besonders in der MC-niedrig-aktiv-Gruppe eine große Streuung auffällig. Dies liegt an 2 PatientInnen, deren Werte stark abweichen. Auch in der AE-Gruppe gab es vor allem eine Patientin, deren FGF19-mRNA-Expression besonders stark ausgeprägt war. Für diese drei PatientInnen konnte in eingehenden Nachforschungen dennoch keine Übereinstimmung in den Laborbefunden, in Geschlecht, Alter, Medikation oder Erkrankungsanamnese gefunden werden. Ohne Ausschluss dieser erhöhten Werte, ergab sich eine nicht signifikante FGF19-Erniedrigung für die MCaktiv-PatientInnen gegenüber allen Gruppen, sowie eine weniger starke Erniedrigung für die CU-Gruppe. Die durchschnittlich höchsten Werte kamen in der MCinaktiv-Gruppe vor, gefolgt von der AE-Gruppe, deren FGF19-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe an der Grenze zur Signifikanz lag ($p=0,051$).

Tabelle 3-q: FGF19/GAPDH-Werte Ileum (3. Durchgang)

	Kontrolle (n=9)	MC aktiv (n=3)	MC niedrig-inaktiv (n=9)	CU (n=9)	AE (n=5)
Mean %	100,0	4,1	303,3	51,0	288,8
SD %	94,8	3,7	618,4	76,8	234,5

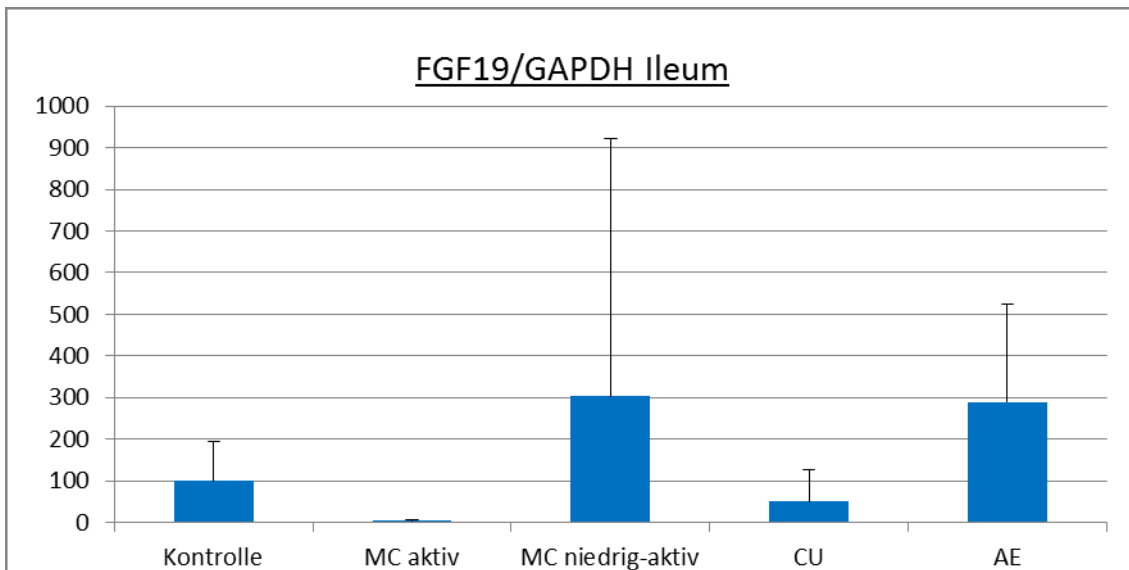


Abbildung 13: FGF19/GAPDH Ileum (3. Durchgang). Angaben in Prozenten.

3.2.9 Übersicht der Expressionsmuster

	<u>K</u>	<u>MC</u>	<u>CU aktiv</u>	<u>CU niedrig aktiv</u>	<u>AE</u>
<u>GAPDH</u>	↔	↔	↔	↔	↔
<u>iNOS</u>	↔	↔	↑	↔	↔
<u>CYP3A4</u>	↔	↔	↔	↔	↑
<u>GLP1</u>	↔	↔	↔	↔	↑
<u>MRP3</u>	↔	↔	↓*	↔	↔

Abbildung 14: Übersicht der Expressionsmuster in den Colonbiopsien. * keine statistische Signifikanz, jedoch tendenziell verringert

In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass signifikante Expressionsveränderungen bei den Colonbiopsien lediglich in den Gruppen CUaktiv und AE auftraten. Im aktiven CU-Stadium zeigte sich eine signifikante iNOS-Erhöhung, sowie eine tendenzielle Expressionsverringerng des GS-Transporters MRP3, welche an der Grenze zur statistischen Signifikanz lag ($p=0,051$). In der Gruppe der AE kam es in den

Colonbiopsien zur signifikanten Erhöhung des Detoxifikationsenzym CYP3A4, als auch von GLP1.

	<u>K</u>	<u>MC aktiv</u>	<u>MC niedrig aktiv</u>	<u>CU</u>	<u>AE</u>
<u>GAPDH</u>	↔	↔	↔	↔	↔
<u>iNOS</u>	↔	↑	↔	↔	↔
<u>CYP3A4</u>	↔	↑	↔	↔	↔
<u>GLP1</u>	↔	↔	↔	↔	↔
<u>ASBT</u>	↔	↓	↓	↔	↔
<u>FXR</u>	↔	↓	↔	↔	↔
<u>FGF19</u>	↔	↔	↔	↔	↔

Abbildung 15: Übersicht der Expressionsmuster in den Ileumbiopsien.

Signifikante Expressionsveränderungen in den Ileumbiopsien konnten nur in den Gruppen MC aktiv und MC niedrig aktiv nachgewiesen werden. Während iNOS und CYP3A4 in der MCaktiv-Gruppe erhöht waren, kam es in dieser Gruppe MC aktiv zu einer signifikanten Erniedrigung des GS-Transporters ASBT und des Kernrezeptors FXR. In Abbildung 15 ist zu sehen, dass in der Remissionsphase bzw. während niedrig aktiven Stadien des MC bis auf eine signifikante Erniedrigung von ASBT keine zur Kontrollgruppe verglichene große Expressionsveränderung auftrat.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, Veränderungen der Expression von GS-Transportern bei pädiatrischen CED zu untersuchen. GS-Transporter haben eine wichtige Schlüsselfunktion für die Regulation des enterohepatischen Kreislaufs und damit die Aufrechterhaltung des GS-Pools. Eine intestinale Entzündung, wie sie im Rahmen eines MC oder einer CU vorkommt, führt zu massiven Zelluntergängen, GS-Malabsorption und daraus resultierender Diarrhoe. Dies lässt Veränderungen der GS-Transporter-Expression in den noch vitalen Enterozyten vermuten. In Voruntersuchungen konnte bereits bei MC-PatientInnen eine signifikante Suppression des wichtigsten apikalen Aufnahmetransporters ASBT bewiesen werden (105) und auch vorangegangene Untersuchungen der Medizinischen Universität Graz zeigten bei erwachsenen MC- und CU-PatientInnen signifikante Reduktionen von ASBT im Ileum bzw. MRP3, OST α und OST β im Colon (Jahnel & Trauner et al., nicht veröffentlicht). Da sich jene Erwachsene bereits in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien befanden und eine Beeinflussung der GS-Transporter-Expression durch deren Medikation, sowie deren Begleit- bzw. Vorerkrankungen nicht auszuschließen war, sollte diese Studie nun die Situation bei Kindern und Jugendlichen beleuchten, bei denen eine CED erst kürzlich bzw. neu diagnostiziert wurde und bei denen im Vergleich zu dem erwachsenen Patientengut keine oder kaum Vormedikationen bestehen.

Wir erwarteten bei dieser Studie vor allem eine Suppression von GS-Transportern dort, wo die Entzündung vorliegt. Als Positivkontrolle verwendeten wir **iNOS**, welches bei Entzündungen vermehrt exprimiert wird. Da wir innerhalb der MC- und CU-Gruppen Unterschiede in der Höhe der iNOS-Werte erkennen konnten, entschlossen wir uns dazu, je nach Höhe der Werte, eine weitere Unterteilung in eine jeweils aktive bzw. niedrig-aktive (z.B. MC-aktiv, MC-niedrig-aktiv) Gruppe durchzuführen. Somit ergab sich eine signifikante Erhöhung für die MC-aktiv-Gruppe im Ileum ($p < 0,001$) und für die CU-aktiv-Gruppe im Colon ($p < 0,001$), was auf eine verstärkte Inflammation in aktiven CED-Stadien hinweist. Diese Einteilung ging auch mit einheitlichen Werten innerhalb der Gruppen bei anderen untersuchten Parametern (z.B.: ASBT, MRP3 etc.) einher. Die Höhe der iNOS-

Werte korrelierte jedoch nicht immer mit dem klinischen Bild, den histologischen Ergebnissen oder den untersuchten Laborwerten. So gab es PatientInnen, die niedrige iNOS-Werte aufwiesen und daher als „niedrig-aktiv“ bezeichnet wurden, aber klinisch unter Diarrhoen litten, sowie in der Histologie Entzündungszeichen aufwiesen und vice versa. Dies könnte einerseits bedeuten, dass es zwar eine Korrelation zwischen iNOS und der Expression von GS-Transportern gibt, jedoch ein Zusammenhang zwischen iNOS und dem klinischen Ausprägungsbild der Erkrankung nicht zwingend bestehen muss. Andererseits könnten möglicherweise auch nicht-entzündete Bereiche bei klinisch auffälligen PatientInnen biopsiert worden sein und umgekehrt. Diagnostisch muss aus entzündeten und makroskopisch eher unauffälligen Arealen biopsiert werden. Eventuell wurden daher für diese Studie von den oben genannten PatientInnen Biopsien aus besagten nur wenig entzündeten Bereichen verwendet.

Bezüglich der **ASBT**-mRNA-Expression zeigten unsere Daten eine signifikante Reduktion bei aktiven MC-PatientInnen auf 15,6% ($p < 0,001$), welche bei niedrig-aktiven MC-PatientInnen mit 52,33% ($p = 0,006$) ebenfalls bestand. Dies lässt darauf schließen, dass im akut-entzündlichen Schub die ASBT-mRNA-Expression bei MC hinunterreguliert wird und sich dieser Prozess in der niedrig-aktiven Phase offensichtlich etwas erholt, jedoch nach wie vor eine Einschränkung des GS-Transports über ASBT bestehen bleibt. Grund dafür könnten proinflammatorische Zytokine sein, die im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion ausgeschüttet werden und womöglich über die Bindung an FXR zu dessen verminderter Aktivität und wie unten beschrieben, offensichtlich auch zu dessen verminderter Expression führen und dadurch eine reduzierte Expression von ASBT bewirken. Eine weitere Möglichkeit könnten genetische Variationen innerhalb der MC-Gruppe sein. In einer bereits 1995 durchgeführten amerikanischen Studie wurde bei einem MC-Patienten eine Dysfunktion des Na⁺/GS-Cotransporters ASBT identifiziert, wofür man anfänglich eine Punktmutation, bei der ein Prolin durch ein Serin in Position 290 ersetzt wurde, verantwortlich machte. Allerdings konnte diese Mutation ebenfalls in gesunden Probanden gefunden werden, weshalb eine sichere Beziehung zur Krankheitsentstehung von MC nicht nachweisbar war (106). Weiters konnten Genomsequenzierungen und in vitro Studien bei gesunden Personen das Vorhandensein von multiplen funktionell relevanten Variationen des

Gens SLC10A2 (welches für ASBT kodiert) beweisen, was möglicherweise die GS-Homöostase und Physiologie beeinflusst (107). Dies lässt eine Annahme des Zusammenhangs zwischen Mutationen im SLC10A2 Gen und CED zu. Dahingehende Studien sind momentan allerdings noch ausständig.

Unseren Daten ist zu entnehmen, dass die mRNA-Expression des Abgabesystems **MRP3** im Colon bei allen untersuchten Gruppen und v.a. bei aktiven CU-PatientInnen im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert ist, wobei hierfür nur knapp keine Signifikanz besteht ($p=0,051$). Dieses Ergebnis scheint somit nicht vollständig mit dem der Untersuchungen bei Erwachsenen übereinzustimmen, bei welchen eine signifikant verminderte Expression von MRP3 bei CU beobachtet wurde (Jahnel & Trauner et al., nicht publiziert). Man könnte nun annehmen, dass die MRP3-mRNA-Expression bei Kindern und Jugendlichen bzw. in frühen Stadien einer CED tatsächlich noch nicht in gleich starkem Ausmaß reduziert ist wie bei Erwachsenen bzw. fortgeschrittenen Stadien und dass die Expressionsverringerung am Beginn der Erkrankung eventuell noch über Adaptationsvorgänge verzögert wird, die später bei Erwachsenen nicht mehr ausreichend sind. Da die Daten allerdings auf eine tendenzielle Erniedrigung der MRP3-mRNA-Expression hinweisen, könnte bei einer größeren und einheitlicheren Gruppe pädiatrischer PatientInnen wahrscheinlich ebenfalls eine signifikante Reduktion für aktive CU-Stadien zu zeigen sein (hier K: $n=16$, CU-aktiv: $n=7$).

Im Ileum untersuchten wir die Veränderung des Kernrezeptors **FXR**, der durch GS aktiviert als Transkriptionsfaktor fungiert und über Feedback- und Forward-Mechanismen die GS-Synthese und die Expression von GS-Transportern reguliert. Wir erwarteten auch hier eine Suppression. Theoretisch müsste der massive Zelluntergang im Rahmen des Entzündungsgeschehens eine verstärkte Expression von Aufnahme- (z.B. ASBT) und Abgabesystemen (z.B. MRP3) in nicht befallenen Darmabschnitten nach sich ziehen. Unsere Vermutung war jedoch, dass proinflammatorische Zytokine dieser Hinaufregulation entgegenwirken, indem sie die Expression und DNA-Bindung von Kernrezeptoren wie FXR hemmen und somit die Senkung der GS-Transporter-Expression in gesunden Darmabschnitten bewirken. Dies wurde bereits in anderen Studien

beobachtet (99). Zusätzlich oder gerade deswegen kann durch eine verminderte GS-Konzentration im Enterozyt eine intrazelluläre Hinunterregulation von FXR und auch von CYP3A4 (s.u.) bewirkt werden. Bei Durchsicht unserer Daten bestätigte sich, dass FXR bei aktiven MC-PatientInnen signifikant verringert war ($p=0,019$). Dies zeigt uns, dass womöglich nicht nur die Aktivität und DNA-Bindung dieses Kernrezeptors im Rahmen einer CED beeinflusst wird, sondern dass ebenfalls eine Reduktion der FXR-Expression an sich zu einer verringerten GS-Transporter-Expression führt. In einer Schweizer Studie konnte man bei Erwachsenen zeigen, dass gewisse Genvariationen des für FXR kodierenden NR1H4-Gens (nuclear receptor subfamily 1, group H, member4) bei CED vermindert (rs3863377) bzw. erhöht (rs56163822) vorkommen (108). Diese Reduktion von bestimmten Genvariationen, die offenbar einen Zusammenhang zwischen FXR und einer intestinalen Schutzfunktion darstellen, könnte daher auch in unserer Studie bei Kindern und Jugendlichen ein Mitgrund für die Entstehung einer CED sein.

Eine nicht signifikante Reduktion der **FGF19**-mRNA-Expression im Ileum konnte für die MC-aktiv- und interessanterweise auch für die CU-Gruppe festgestellt werden, obwohl bei CU-PatientInnen das terminale Ileum nicht mitbetroffen war. Eine sog. „backwash-ileitis“ konnte bei keiner/m unserer CU-PatientInnen festgestellt werden. Grundsätzlich erwies sich die Beurteilung als äußerst schwierig, da immense Streuungen in allen Gruppen auftraten. In der MC-niedrig-aktiv- und AE-Gruppe gab es insgesamt 3 PatientInnen, deren Werte für FGF19 massiv hoch waren. Trotz eingehenden Nachforschungen konnte dennoch kein Zusammenhang zwischen den Laborbefunden, Geschlecht, Alter, Medikation oder Erkrankungsanamnese gefunden werden. Der anfängliche Verdacht eines Zusammenhangs zwischen einer hohen FGF19-mRNA-Expression und der Einnahme von Imurek, konnte nicht bestätigt werden, da nur 2 dieser 3 PatientInnen eine Imurek-Therapie erhielten und die FGF19-Werte anderer Imurek-PatientInnen keine Erhöhung aufwiesen. Beim Vergleich mit der Höhe der FXR-Werte dieser PatientInnen konnte interessanterweise ebenfalls keine Assoziation hergestellt werden, was den Verdacht aufwarf, dass das Problem bei diesen PatientInnen nicht ein intestinales sondern evtl. ein hepatisches war. Allerdings konnten wir weder in den Laborwerten noch in sonstigen Befunden Hinweise auf eine Lebererkrankung finden. In einer japanischen Studie stellte man

fest, dass ATF4 (activating transcription factor 4), welches als Antwort auf Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert wird, in intestinalen humanen epithelialen CaCo-2 Zellen eine erhöhte FGF19-mRNA-Expression induziert. Interessanterweise war FXR an dieser ER-Stress-vermittelten FGF19 Induktion auch nicht beteiligt (109). Eventuell gibt es daher einen Zusammenhang mit unseren erhöhten FGF19-Werten, allerdings müsste hierfür erst ER-Stress in den Zellen unserer Biopsien nachgewiesen werden. Eine wahrscheinlichere Erklärung wäre allerdings entweder eine Mutation des Aktivators oder des FGF19-Promotors, wodurch es zu einer verstärkten Bindung des Aktivators kommt und somit die Expression des Gens erhöht wird.

Die mRNA-Expression des Detoxifikationsenzym **CYP3A4** war für die MCaktiv-Gruppe im Ileum gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert ($p=0,006$). Die Werte der MC-niedrig-aktiv-PatientInnen waren dagegen wieder ähnlich hoch wie jene der Kontrollgruppe. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass proinflammatorische Zytokine eventuell durch modulierende Einwirkungen auf Funktion und/oder Expression ausschlaggebender Kernrezeptoren, die Suppression von CYP3A4 im Entzündungsgeschehen induzieren, im inaktiven Stadium die verminderte Expression jedoch wieder reversibel ist. Dies würde auch mit der von uns beobachteten Unterdrückung der FXR-mRNA-Expression in derselben Gruppe zusammenpassen. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass die MC-aktiv-Gruppe für CYP3A4 nur 3 PatientInnen inkludierte und damit im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=9$) eine viel niedrigere PatientInnenanzahl hatte. Die Beurteilung der CYP3A4-Expression im Colon war aufgrund der für uns unerklärbar großen Streuungen, die interessanterweise auch in der Erwachsenenstudie von Jahnle & Trauner et al. aufgetreten waren, sehr schwierig. Die signifikante Erhöhung in der AE-Gruppe im Colon ($p=0,041$) gegenüber der Kontrollgruppe ist daher vermutlich nicht aussagekräftig. Erwähnenswert sei ebenfalls, dass alle 3 mit Pentasa therapierten MC-PatientInnen sowie der einzige mit Salofalk therapierte MC-Patient stark erniedrigte CYP3A4-Werte im Ileum aufwies, wo der Wirkstoff hauptsächlich freigesetzt wird. Bei mit Salofalk therapierten CU-PatientInnen konnten im Colon keine auffälligen CYP3A4-Werte beobachtet werden. Dies lässt evtl. einen inhibitorischen Effekt von 5-ASA auf CYP3A4 vermuten.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass durch die signifikante Suppression des GS-Aufnahmesystems ASBT bei hoch-aktiven und auch bei niedrig-aktiven MC-PatientInnen die GS-Aufnahme in den Enterozyten des terminalen Ileums über diesen Transporter bei Kindern und Jugendlichen eingeschränkt ist, wobei eine leichte Verbesserung im niedrig-aktiven Stadium besteht. Außerdem ist zu erkennen, dass auch die Expression von FXR im Ileum bei hoch-aktiven MC-PatientInnen durch das entzündliche Geschehen signifikant verringert ist und damit eine GS-Transporterexpression verhindert wird. Für die MRP3-Expression gab es zwar keine Signifikanz, allerdings zeigte sich eine deutlich tendenzielle Verringerung bei hoch-aktiven CU-PatientInnen im Colon. Somit kann an dieser Stelle noch keine eindeutige Aussage über die Rolle des GS-Abgabesystems MRP3 bei CED bei Kindern und Jugendlichen gemacht werden, weswegen dies mit einer höheren Fallzahl untersucht und eventuell mit der Höhe der FXR-mRNA-Expression verglichen werden müsste.

Um die Aussagekraft einer Studie wie dieser zu erhöhen, wären eine größere und gleichmäßigere PatientInnenanzahl in den einzelnen Gruppen, sowie möglicherweise eine Einteilung in bestimmte Altersgruppen von Vorteil. Da bei Kindern und Jugendlichen mit CED in Remission Kontrollileokoloskopien in mehrjährigem Abstand durchgeführt werden, war die Anzahl der tatsächlichen RemissionspatientInnen niedrig. Eine besondere Konzentration auf diese PatientInnengruppe im Vergleich zu aktiven Stadien wäre für nachfolgende Studien daher erstrebenswert. Zusätzlich ist eine Bestimmung des Zusammenhangs der mRNA-Expression von FXR und basolateralen Abgabesystemen wie MRP3 oder OST α /OST β von Interesse. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen können in weiterer Folge die Basis für zukünftige Forschung bezüglich einer gezielten medikamentösen Therapie der Veränderungen im GS-Transport und –Stoffwechsel bei frühen CED durch nukleäre GS-Rezeptor-Agonisten (z.B.: FXR-Agonist GW4064) bedeuten, die sich derzeit im Entwicklungsstadium befinden. In anderen Studien wurde bereits eine positive Wirkung einer FXR-Aktivierung auf das Entzündungsgeschehen festgestellt, indem es die Inflammation hemmt und die intestinale Barrierefunktion

bei CED bewahrt (110,111). Dies könnte einen neuen therapeutischen Ansatz bei GS-assoziierten Diarrhoen bei pädiatrischen, aber auch adulten CED darstellen.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999 Dec 13-27;159(22):2647-2658.
- (2) Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009 Feb 21;15(7):804-816.
- (3) Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009 Oct;50(10):1955-1966.
- (4) Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004 Jan;126(1):322-342.
- (5) Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003 Apr;83(2):633-671.
- (6) Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008 Aug;65(16):2461-2483.
- (7) Amelsberg A, Jochims C, Richter CP, Nitsche R, Folsch UR. Evidence for an anion exchange mechanism for uptake of conjugated bile acid from the rat jejunum. *Am J Physiol* 1999 Mar;276(3 Pt 1):G737-42.
- (8) Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003;72:137-174.
- (9) Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, et al. Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 1998 Jan;274(1 Pt 1):G157-69.
- (10) 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 Mar 11;105(10):3891-3896.

- (11) Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, et al. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 2005 Feb 25;280(8):6960-6968.
- (12) Landrier JF, Thomas C, Grober J, Zaghini I, Petit V, Poirier H, et al. The gene encoding the human ileal bile acid-binding protein (I-BABP) is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 2005 Jun 15;1735(1):41-49.
- (13) Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* 2005 Jan 15;433(2):397-412.
- (14) Allen JD, Schinkel AH. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther* 2002 Apr;1(6):427-434.
- (15) Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004 Jan;21(1):25-51.
- (16) Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* 2003 May;52(5):759-766.
- (17) Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 15;94(8):4028-4033.
- (18) Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998 Nov 15;161(10):5733-5744.

- (19) Dommels YE, Butts CA, Zhu S, Davy M, Martell S, Hedderley D, et al. Characterization of intestinal inflammation and identification of related gene expression changes in *mdr1a(-/-)* mice. *Genes Nutr* 2007 Nov;2(2):209-223.
- (20) Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 2003 Jul 1;17(13):1581-1591.
- (21) Wu AL, Coulter S, Liddle C, Wong A, Eastham-Anderson J, French DM, et al. FGF19 regulates cell proliferation, glucose and bile acid metabolism via FGFR4-dependent and independent pathways. *PLoS One* 2011 Mar 18;6(3):e17868.
- (22) Sidoroff M, Kolho KL. Glucocorticoids in pediatric inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2012 Jul;47(7):745-750.
- (23) Ezri J, Marques-Vidal P, Nydegger A. Impact of disease and treatments on growth and puberty of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2012 Jun;85(4):308-319.
- (24) Pschyrembel editor. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. 261. Auflage ed. Berlin, S. 524: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG; 2007.
- (25) Cima RR, Pemberton JH. Medical and surgical management of chronic ulcerative colitis. *Arch Surg* 2005 Mar;140(3):300-310.
- (26) Okita Y, Miki C, Araki T, Inoue M, Otake K, Uchida K, et al. Ulcerative colitis with severe backwash ileitis successfully treated by staged operation without sacrificing any involved ileum. *J Pediatr Surg* 2009 Jan;44(1):e37-9.
- (27) Hope B, Shahdadpuri R, Dunne C, Broderick AM, Grant T, Hamzawi M, et al. Rapid rise in incidence of Irish paediatric inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2012 Jul;97(7):590-594.
- (28) Paul T, Birnbaum A, Pal DK, Pittman N, Ceballos C, LeLeiko NS, et al. Distinct phenotype of early childhood inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2006 Aug;40(7):583-586.

- (29) IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 Jul;41(1):1-7.
- (30) Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012 Aug 17.
- (31) Al-Qabandi WA, Buhamrah EK, Hamadi KA, Al-Osaimi SA, Al-Ruwayeh AA, Mada J. Inflammatory bowel disease in children, an evolving problem in Kuwait. *Saudi J Gastroenterol* 2011 Sep-Oct;17(5):323-327.
- (32) Lehtinen P, Ashorn M, Iltanen S, Jauhola R, Jauhonen P, Kolho KL, et al. Incidence trends of pediatric inflammatory bowel disease in Finland, 1987-2003, a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Aug;17(8):1778-1783.
- (33) Henderson P, Hansen R, Cameron FL, Gerasimidis K, Rogers P, Bisset WM, et al. Rising incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Scotland. *Inflamm Bowel Dis* 2012 Jun;18(6):999-1005.
- (34) Petritsch W, Fuchs S, Berghold A, Bachmaier G, Hogenauer C, Hauer AC, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in the province of Styria, Austria, from 1997 to 2007: a population-based study. *J Crohns Colitis* 2013 Feb;7(1):58-69.
- (35) Beattie RM, Croft NM, Fell JM, Afzal NA, Heuschkel RB. Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2006 May;91(5):426-432.
- (36) Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007 May 12;369(9573):1627-1640.
- (37) Wills JS, Lobis IF, Denstman FJ. Crohn disease: state of the art. *Radiology* 1997 Mar;202(3):597-610.
- (38) Bastida G, Beltran B. Ulcerative colitis in smokers, non-smokers and ex-smokers. *World J Gastroenterol* 2011 Jun 14;17(22):2740-2747.

- (39) Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988 Jul;29(7):990-996.
- (40) Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2003 Nov;88(11):995-1000.
- (41) Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988 Mar;29(3):342-345.
- (42) Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006 Aug 14;12(30):4819-4831.
- (43) Yi F, Chen M, Huang M, Li J, Zhao J, Li L, et al. The trend in newly diagnosed Crohn's disease and extraintestinal manifestations of Crohn's disease in central China: a retrospective study of a single center. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012 Aug 14.
- (44) Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001 Apr;48(4):526-535.
- (45) Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis* 2010;28(4-5):619-624.
- (46) Prideaux L, De Cruz P, Ng SC, Kamm MA. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 2012 Jul;18(7):1340-1355.
- (47) Vilela EG, Torres HO, Martins FP, Ferrari Mde L, Andrade MM, Cunha AS. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2012 Mar 7;18(9):872-881.
- (48) Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991 May;12(4):439-447.

- (49) Beattie RM, Walker-Smith JA, Murch SH. Indications for investigation of chronic gastrointestinal symptoms. *Arch Dis Child* 1995 Oct;73(4):354-355.
- (50) Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000 Feb;95(2):359-367.
- (51) Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 2009 Feb;106(8):123-133.
- (52) Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001 Feb;32(2):171-177.
- (53) Kostakis ID, Cholidou KG, Vaiopoulos AG, Vlachos IS, Perrea D, Vaos G. Fecal Calprotectin in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Dig Dis Sci* 2012 Aug 17.
- (54) Ziech ML, Hummel TZ, Smets AM, Nievelstein RA, Lavini C, Caan MW, et al. Accuracy of abdominal ultrasound and MRI for detection of Crohn disease and ulcerative colitis in children. *Pediatr Radiol* 2014 Jun 6.
- (55) Mentzel HJ, Reinsch S, Kurzai M, Stenzel M. Magnetic resonance imaging in children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014 Feb 7;20(5):1180-1191.
- (56) Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, et al. ESPGHAN Revised Porto Criteria for the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014 Jun;58(6):795-806.
- (57) Masselli G, Gualdi G. MR imaging of the small bowel. *Radiology* 2012 Aug;264(2):333-348.
- (58) Zamboni GA, Raptopoulos V. CT enterography. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2010 Apr;20(2):347-366.

- (59) Horsthuis K, Stokkers PC, Stoker J. Detection of inflammatory bowel disease: diagnostic performance of cross-sectional imaging modalities. *Abdom Imaging* 2008 Jul-Aug;33(4):407-416.
- (60) Masselli G, Gualdi G. CT and MR enterography in evaluating small bowel diseases: when to use which modality? *Abdom Imaging* 2012 Sep 26.
- (61) Ordas I, Rimola J, Garcia-Bosch O, Rodriguez S, Gallego M, Etchevers MJ, et al. Diagnostic accuracy of magnetic resonance colonography for the evaluation of disease activity and severity in ulcerative colitis: a prospective study. *Gut* 2012 Aug 30.
- (62) Fidler JL, Guimaraes L, Einstein DM. MR imaging of the small bowel. *Radiographics* 2009 Oct;29(6):1811-1825.
- (63) Grafors JM, Casswall TH. Exclusive enteral nutrition in the treatment of children with Crohn's disease in Sweden: a questionnaire survey. *Acta Paediatr* 2011 Jul;100(7):1018-1022.
- (64) Soo J, Malik BA, Turner JM, Persad R, Wine E, Siminoski K, et al. Use of exclusive enteral nutrition is just as effective as corticosteroids in newly diagnosed pediatric Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2013 Dec;58(12):3584-3591.
- (65) Heuschkel RB, Menache CC, Megerian JT, Baird AE. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 Jul;31(1):8-15.
- (66) Berni Canani R, Terrin G, Borrelli O, Romano MT, Manguso F, Coruzzo A, et al. Short- and long-term therapeutic efficacy of nutritional therapy and corticosteroids in paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2006 Jun;38(6):381-387.
- (67) Day AS, Whitten KE, Sidler M, Lemberg DA. Systematic review: nutritional therapy in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008 Feb 15;27(4):293-307.

- (68) Bannerjee K, Camacho-Hubner C, Babinska K, Dryhurst KM, Edwards R, Savage MO, et al. Anti-inflammatory and growth-stimulating effects precede nutritional restitution during enteral feeding in Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004 Mar;38(3):270-275.
- (69) Heuschkel R, Salvestrini C, Beattie RM, Hildebrand H, Walters T, Griffiths A. Guidelines for the management of growth failure in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Jun;14(6):839-849.
- (70) Rutgeerts P. The use of oral topically acting glucocorticosteroids in the treatment of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm* 1998;7(3):137-140.
- (71) Lamers CB, Wagtmans MJ, van der Sluys Veer A, van Hogezaand RA, Griffioen G. Budesonide in inflammatory bowel disease. *Neth J Med* 1996 Feb;48(2):60-63.
- (72) Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep* 2011;63(3):629-642.
- (73) Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP, IBD Section, British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004 Sep;53 Suppl 5:V1-16.
- (74) Lemann M. Treatment of chronic inflammatory bowel diseases. *Bull Acad Natl Med* 2007 Jun;191(6):1125-41; discussion 1141.
- (75) Kornbluth A, Sachar DB, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2010 Mar;105(3):501-23; quiz 524.
- (76) Ardizzone S, Maconi G, Russo A, Imbesi V, Colombo E, Bianchi Porro G. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut* 2006 Jan;55(1):47-53.

- (77) Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002 Apr;50(4):485-489.
- (78) Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, et al. Management of Pediatric Ulcerative Colitis: Joint ECCO and ESPGHAN Evidence-based Consensus Guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012 Sep;55(3):340-361.
- (79) Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997 Oct 9;337(15):1029-1035.
- (80) Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999 May 6;340(18):1398-1405.
- (81) Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004 Feb;126(2):402-413.
- (82) Russell RK, Wilson ML, Loganathan S, Bourke B, Kiparissi F, Mahdi G, et al. A British Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition survey of the effectiveness and safety of adalimumab in children with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011 Apr;33(8):946-953.
- (83) Working Group of the Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Konno M, Kobayashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Toyoda S, et al. Guidelines for the treatment of Crohn's disease in children. *Pediatr Int* 2006 Jun;48(3):349-352.
- (84) Sandborn WJ, Faubion WA. Biologics in inflammatory bowel disease: how much progress have we made? *Gut* 2004 Sep;53(9):1366-1373.

- (85) Serghini M, Haddad W, Jeddi H, Karoui S, Ben Mustapha N, Kallel L, et al. Efficacy and safety of Adalimumab in Crohn's disease. *Tunis Med* 2012 Feb;90(2):101-107.
- (86) Panaccione R, Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, D'Haens GR, Robinson AM, et al. Adalimumab sustains clinical remission and overall clinical benefit after 2 years of therapy for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010 Jun;31(12):1296-1309.
- (87) Colombel JF, Schwartz DA, Sandborn WJ, Kamm MA, D'Haens G, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *Gut* 2009 Jul;58(7):940-948.
- (88) Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, Mason D, et al. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007 Jul 19;357(3):228-238.
- (89) Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, et al. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001 Nov;121(5):1088-1094.
- (90) Kolar B, Speranza J, Bhatt S, Dogra V. Crohn's disease: Multimodality Imaging of Surgical Indications, Operative Procedures, and Complications. *J Clin Imaging Sci* 2011;1:37.
- (91) Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Ann Surg* 2000 Jan;231(1):38-45.
- (92) Duigenan S, Gee MS. Imaging of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *AJR Am J Roentgenol* 2012 Oct;199(4):907-915.
- (93) Ferrante M, Declerck S, De Hertogh G, Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P, et al. Outcome after proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Jan;14(1):20-28.
- (94) Dayan B, Turner D. Role of surgery in severe ulcerative colitis in the era of medical rescue therapy. *World J Gastroenterol* 2012 Aug 7;18(29):3833-3838.

- (95) Cho W, Cho YB, Kim JY, Chang DK, Kim YH, Kim HC, et al. Outcome of total proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *J Korean Surg Soc* 2012 Sep;83(3):135-140.
- (96) Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, et al. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008 Oct;135(4):1114-1122.
- (97) Kaiser AM, Beart RW, Jr. Surgical management of ulcerative colitis. *Swiss Med Wkly* 2001 Jun 16;131(23-24):323-337.
- (98) Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 1982;389:39-48.
- (99) Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, Grunfeld C. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem* 2003 Mar 14;278(11):8988-8995.
- (100) Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2007 Jan;42(1):16-25.
- (101) Oelkers P, Kirby LC, Heubi JE, Dawson PA. Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). *J Clin Invest* 1997 Apr 15;99(8):1880-1887.
- (102) Walters JR, Pattni SS. Managing bile acid diarrhoea. *Therap Adv Gastroenterol* 2010 Nov;3(6):349-357.
- (103) Hofmann AF, Mangelsdorf DJ, Kliwer SA. Chronic diarrhea due to excessive bile acid synthesis and not defective ileal transport: a new syndrome of defective fibroblast growth factor 19 release. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 Nov;7(11):1151-1154.
- (104) Mekjian HS, Phillips SF, Hofmann AF. Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: perfusion studies in man. *J Clin Invest* 1971 Aug;50(8):1569-1577.

(105) Jung D, Fantin AC, Scheurer U, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor. *Gut* 2004 Jan;53(1):78-84.

(106) Wong MH, Oelkers P, Dawson PA. Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* 1995 Nov 10;270(45):27228-27234.

(107) Ho RH, Leake BF, Urquhart BL, Gregor JC, Dawson PA, Kim RB. Functional characterization of genetic variants in the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT; SLC10A2). *J Gastroenterol Hepatol* 2011 Dec;26(12):1740-1748.

(108) Attinkara R, Mwinyi J, Truninger K, Regula J, Gaj P, Rogler G, et al. Association of genetic variation in the NR1H4 gene, encoding the nuclear bile acid receptor FXR, with inflammatory bowel disease. *BMC Res Notes* 2012 Aug 28;5:461-0500-5-461.

(109) Shimizu M, Li J, Maruyama R, Inoue J, Sato R. FGF19 (fibroblast growth factor 19) as a novel target gene for activating transcription factor 4 in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J* 2013 Feb 15;450(1):221-229.

(110) Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B, Willemsen EC, Renooij W, Murzilli S, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* 2011 Apr;60(4):463-472.

(111) Stojancevic M, Stankov K, Mikov M. The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* 2012 Sep;26(9):631-637.

Anhang – Projektplan

- **12.06.2012:** erste Kontaktaufnahme mit OA Dr. Jahnel
- **20.06.2012:** erstes Treffen mit OA Dr. Jahnel und Besprechung des Diplomarbeitsthemas
- **26.06.2012:** 2. Treffen mit OA Dr. Jahnel und Beginn der Erstellung des Konzeptformulars
- **27.06.2012 – September 2013:** wöchentliches Meeting jeden Mittwoch um 7:30 mit OA Dr. Jahnel und den anderen DiplomandInnen
- **August 2012:** Übermittlung der bisherigen Daten und Beginn der Auswertung, statistischer Berechnungen, Erstellung der Tabellen und Grafiken. Beginn des Studiums der PatientInnendaten und Einarbeitung in Medocs, Anlegen von PatientInnenregistern, Tabellen, Gruppeneinteilungen etc. Beginn der schriftlichen Verfassung der Diplomarbeit.
- **Jänner 2013:** 3. Durchgang der Bearbeitung der Biopsien, Auswertung der Daten mit Erstellung von Tabellen, statistischer Auswertung und grafischer Darstellung der neuen PatientInnen- bzw. der neuen Biopsie-Daten
- **März 2014:** Fertigstellung der Diplomarbeit
- **April-Juni:** Korrekturen