

Diplomarbeit

**BIOMARKER BEI CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN
DARMERKRANKUNGEN**

eingereicht von

Laura Lang

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitäts-Klinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie

unter der Anleitung von

Ao.Univ.-Prof. Dr. med. univ. Christoph Högenauer

und

Priv.-Doz. Dr. med. univ. Dr. scient. med. Jasmin Rabensteiner

Graz, 08.05.2017

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 08.05.2017

Laura Lang eh

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen all jenen danken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Ao.Univ.-Prof. Dr. med. univ. Christoph Högenauer, welcher diese Arbeit betreut und begutachtet hat. Er verstand es stets, mich durch seine konstruktive Kritik zu motivieren, mein Bestes zu geben.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. univ. Dr. scient. med. Jasmin Rabensteiner, welche mir als co-Betreuerin bei allen labormedizinischen Angelegenheiten mit viel Engagement und Geduld zur Seite gestanden ist.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern und meiner Großmutter, welche mich während meines Studiums nicht nur finanziell unterstützt, sondern mir während dieser intensiven Zeit sehr viel Kraft gegeben haben.

Meiner Schwester danke ich für die wertvolle moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Weiters danke ich meinen guten Freunden Georg Zimmermann, BA MSc und Julia Maria Voglhuber, welche während der Zeit der Erstellung meiner Diplomarbeit stets ein offenes Ohr für mich hatten, und deren hilfreiche Anregungen maßgeblich zu dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich meinen Dank gegenüber allen ProbandInnen, die an der Studie teilgenommen haben, ausdrücken.

Zusammenfassung

Einleitung: Biomarker spielen in der Diagnostik von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) eine wichtige Rolle, da sie simple, kostengünstige und risikolose Mittel zur Evaluierung der Krankheitsaktivität darstellen. Da die derzeit in der klinischen Praxis als Biomarker für CED verwendeten Laborparameter zahlreichen Limitationen bezüglich ihrer Anwendungsgebiete, Sensitivität und Spezifität unterliegen, ist es von großer Wichtigkeit, nach neuen Biomarkern zu suchen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Citrullin, D-Laktat, I-FABP (intestinal fatty acid binding protein) und β -D-Glukan auf ihr Potential als Biomarker für CED untersucht.

Methoden: In die Studie wurden 14 PatientInnen mit Colitis ulcerosa und 25 PatientInnen mit Morbus Crohn, sowie 42 gesunde Kontrollen eingeschlossen. β -D-Glukan, Citrullin und I-FABP wurden aus dem Serum und D-Laktat aus dem Harn bestimmt und mit den etablierten Biomarkern CRP und Calprotectin verglichen. Weiters wurden Korrelationsanalysen mit dem Mayo-Score für Colitis ulcerosa, sowie dem Harvey-Bradshaw-Index für Morbus Crohn durchgeführt.

Ergebnisse: Sowohl in der PatientInnen- als auch in der Kontrollgruppe lag der Medianwert von β -D-Glukan unter der Nachweisgrenze von 15,38 pg/ml, es konnte jedoch eine schwache Korrelation mit CRP und Calprotectin festgestellt werden. Für Citrullin konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen CED-PatientInnen und Kontrollen ($p = 0,253$), sowie zwischen PatientInnen mit Morbus Crohn und jenen mit Colitis ulcerosa ($p = 0,699$) ermittelt werden, es zeigte sich aber eine mittelstarke negative Korrelation mit CRP und Calprotectin. Bei dem aus dem Harn bestimmten D-Laktat konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CED-PatientInnen und Kontrollen festgestellt werden ($p = 0,828$), allerdings waren die D-Laktat-Werte bei Colitis ulcerosa signifikant höher als bei Morbus Crohn ($p = 0,041$). Für I-FABP konnte weder zwischen PatientInnen und Kontrollen ($p = 0,070$), noch zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ($p = 0,279$) unterschiedliche Medianwerte ermittelt werden. Es zeigte sich eine schwache Korrelation mit Calprotectin, jedoch keine Korrelation mit CRP.

Diskussion: Besonders Citrullin und D-Laktat lieferten interessante Ergebnisse, welche auf das Potential dieser Laborparameter, in Zukunft eine Rolle als Biomarker für CED zu spielen, hinweisen. Größer angelegte Studien sind vonnöten, um diese Erkenntnisse zu festigen.

Abstract

Introduction: Biomarkers play an important role in the diagnostics of inflammatory bowel disease (IBD), because they are relatively simple, cheap and risk-free tools to assess disease activity. The laboratory parameters that are currently being used as biomarkers for IBD are subject to different limitations concerning their areas of application, sensitivity and specificity. For this reason, finding more specific, sensitive and responsive markers of inflammation is of great importance. The aim of this study was to determine whether Citrulline, D-Lactate, I-FABP (intestinal fatty acid binding protein) and β -D-Glucane have the potential to serve as biomarkers for IBD.

Methods: In this study, 14 patients with ulcerative colitis and 25 patients with Crohn's disease as well as 42 healthy controls were included. β -D-glucane, Citrulline and I-FABP were detected from serum, and D-lactate was determined from urine samples. These parameters were then compared with the already established biomarkers CRP (c-reactive protein) and Calprotectin. Furthermore, correlation analysis with the Mayo-Score for ulcerative colitis and the Harvey-Bradshaw-Index for Crohn's disease was performed.

Results: In the patients group as well as the control group, the median values of β -D-glucane were below the limit of detection of 15,38 pg/ml. A weak correlation with CRP and Calprotectin was found. For Citrulline, no statistically significant difference was found between serum levels in IBD patients and healthy controls ($p = 0,253$), as well as between patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Nevertheless, a moderate negative correlation with CRP and Calprotectin was shown. For D-Lactate, no significant difference between urine levels of IBD-patients and healthy controls ($p = 0,828$) was determined, but the median levels in patients with ulcerative colitis were significantly higher than in patients with Crohn's disease ($p = 0,041$). Concerning I-FABP, neither for patients and healthy controls ($p = 0,070$), nor for Crohn's disease and ulcerative colitis ($p = 0,279$), significant differences in median serum levels was shown. A weak correlation with Calprotectin, but no correlation with CRP was determined.

Discussion: Especially Citrulline and D-Lactate showed promising results that indicate that these two laboratory parameters could potentially be used as biomarkers for IBD in the future. Further studies will be necessary to confirm these findings.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Glossar und Abkürzungen	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
1. Einleitung	1
1.1 Einführung und Zielsetzung	1
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.2.1 Epidemiologie	2
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.2.3 Pathologie und klinische Charakteristika	3
1.2.4 Krankheitsaktivität und –verlauf	4
1.2.5 Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	9
1.2.6 Diagnostik	10
1.3 Biomarker	13
1.3.1 Definition	13
1.3.2 Anwendungsgebiete von Biomarkern bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	13
2 Methoden	30
2.1 Studiendesign und Zeitraum	30
2.2 Ethikvotum	30
2.3 PatientInnenkollektiv und gesunde Vergleichspersonen	30
2.4 Studienablauf	31
2.5 Labormethodik	32
2.6 Statistische Auswertung	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Demografische und klinische Daten	33
3.2 Routineparameter	36
3.2.1 Vergleich der PatientInnengruppe mit der Kontrollgruppe	36
3.2.2 Vergleich von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	39
3.2.3 Korrelationsanalysen der Routineparameter mit klinischen Scores ..	41

3.3	β-D-Glukan.....	42
3.4	Citrullin	44
	D-Laktat	47
3.5	I-FABP.....	50
4	Diskussion.....	54
5	Literaturverzeichnis	60

Glossar und Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
ACCA	Englisch: antichitobioside carbohydrate antibody, anti-Chitobiosid Kohlenhydrat-Antikörper
ACSAs	Englisch: anti-Saccharomyces cerevisiae-antibodies, anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper
ALCA	Englisch: antilaminaribioside carbohydrate antibody, anti-Laminaribiosid Kohlenhydrat-Antikörper
AMCA	Englisch: antimannobioside carbohydrate antibody, anti-Mannobiosid Kohlenhydrat-Antikörper
AMPs	Englisch: antimicrobial peptides, antimikrobielle Peptide
ANCAs	Englisch: anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies, zytoplasmatische anti-Neutrophilen-Antikörper
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
et al.	Latein: et alii/et aliae, und andere
GWAS	Englisch: genome-wide association studies, genomweite Assoziationsstudien
Hb	Hämoglobin
HPLC	Englisch: High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
I-FABP	Englisch: intestinal fatty acid binding protein, intestinales fettsäurebindendes Protein
IL	Interleukin
LKH	Landeskrankenhaus
MAP	Englisch: multiple antigenic peptides, multiple Antigen-Peptide
MR	Magnetresonanz
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
PAB	Englisch: pancreatic antibodies, pankreatische Antikörper
PAD	Englisch: perianal disease, perianale Erkrankung

rSp Spearman-Korrelationskoeffizient
S. cerevisiae Saccharomyces cerevisiae
TNF- α Tumornekrosefaktor- α

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch dargestellter Behandlungsverlauf bei CED unter Verwendung von Biomarkern	17
Abbildung 2: Aufbau der Darmwand.....	23
Abbildung 3: Pathogenese einer erhöhten Darmwandpermeabilität bei CED	24
Abbildung 4: Strukturformel von β -D-Glukan.....	26
Abbildung 5: Strukturformel von D-Laktat.....	27
Abbildung 6: Strukturformel von L-Laktat	27
Abbildung 7 a-e: Grafische Darstellung der Routineparameter bei CED-PatientInnen (P) und Kontrollen (K). (a) Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) in mm. (b) C-reaktives Protein (CRP) in mg/l. (c) Leukozytenzahl in $10^9/l$. (d) Thrombozytenzahl in G/l. (e) Hämoglobin (Hb) in g/dl.....	38
Abbildung 8 a-f: Grafische Darstellung der Routineparameter bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC). (a) Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) in mm. (b) C-reaktives Protein (CRP) in mg/l. (c) Leukozytenzahl in $10^9/l$. (d) Thrombozytenzahl in G/l. (e) Hämoglobin (Hb) in g/dl. (f) Calprotectin in $\mu\text{g/g}$	40
Abbildung 9: β -D-Glukan (BDGLUK) in pg/ml bei CED-PatientInnen (P) und Kontrollen (K)	43
Abbildung 10: β -D-Glukan (BDGLUK) in pg/ml bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC).....	43
Abbildung 11: Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei CED-PatientInnen (P) und Kontrollen (K)	45
Abbildung 12: Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC)	45
Abbildung 13: Unterschiede im Serum-Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei PatientInnen mit Colitis Ulcerosa in Remission (Remission-ja) und mit aktiver Erkrankung (Remission-nein)	46
Abbildung 14: Unterschiede im Serum-Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei PatientInnen mit Morbus Crohn in Remission (Remission-ja) und mit aktiver Erkrankung (Remission-nein)	46
Abbildung 15: Unterschiede im Serum-Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei PatientInnen mit Morbus Crohn, bei denen eine Resektion von Darmabschnitten stattgefunden hat (OP) und jenen, bei denen keine solche Operation durchgeführt wurde (keine OP)	47

Abbildung 16: D-Laktat (H.LAKT.Krea) in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin im Harn von PatientInnen (P) und Kontrollen (K).....	49
Abbildung 17: D-Laktat (H.LAKT.Krea) in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin im Harn bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC).....	49
Abbildung 18: Unterschiede im D-Laktat in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin im Harn von PatientInnen mit aktiver Colitis ulcerosa (Remission-nein), sowie PatientInnen mit Colitis ulcerosa in Remission (Remission-ja).....	49
Abbildung 19: I-FABP in pg/ml bei CED-PatientInnen und Kontrollen.....	51
Abbildung 20: I-FABP in pg/ml bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.....	51
Abbildung 21: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan (BDGLUK), Citrullin, D-Laktat im Harn (H.LAKT.Krea) und I-FABP mit CRP.....	52
Abbildung 22: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan (BDGLUK), Citrullin, D-Laktat im Harn (H.LAKT.Krea) und I-FABP mit Calprotectin	52
Abbildung 23: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan (BDGLUK), Citrullin, D-Laktat im Harn (H.LAKT.Krea) und I-FABP mit dem partiellen Mayo-Score, sowie dem Harvey-Bradshaw-Index.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Montréal Klassifikation für den Schweregrad einer Colitis ulcerosa.....	5
Tabelle 2: Montréal Klassifikation für die Ausdehnung einer Colitis ulcerosa.....	5
Tabelle 3: Mayo Score.....	6
Tabelle 4: Crohn's Disease Activity Index (CDAI).....	7
Tabelle 5: Harvey-Bradshaw-Index	8
Tabelle 6: Demografische und klinische Daten	34
Tabelle 7: Daten zur Krankheitsaktivität, stattgefundenen Operationen und der aktuellen Therapie.....	35
Tabelle 8: Vergleich der Routineparameter zwischen PatientInnen und Kontrollen	37
Tabelle 9: Vergleich der Routineparameter zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.....	39
Tabelle 10: Interpretation des Spearman-Korrelationskoeffizienten r_{Sp}	41
Tabelle 11: Korrelationsanalysen der Routineparameter mit dem partiellen Mayo-Score, sowie dem Harvey-Bradshaw-Index.....	42
Tabelle 12: Vergleich von β -D-Glukan bei Kontrollen, CED-PatientInnen, Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC).....	43
Tabelle 13: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan mit Calprotectin, CRP sowie der Krankheitsaktivität	44
Tabelle 14: Vergleich von Serum-Citrullin bei Kontrollen, CED-PatientInnen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn	45
Tabelle 15: Vergleich von Serum-Citrullin bei PatientInnen mit aktiver Colitis Ulcerosa (CU) und Colitis Ulcerosa in Remission, sowie PatientInnen mit aktivem Morbus Crohn (MC) und PatientInnen mit Morbus Crohn in Remission	46
Tabelle 16: Vergleich von Serum-Citrullin von PatientInnen mit Morbus Crohn (MC), bei welchen eine Resektion von Darmabschnitten stattgefunden hat (mit OP), mit jenen, bei denen keine solche Operation stattgefunden hat (ohne OP) Angaben in $\mu\text{mol/l}$	46
Tabelle 17: Korrelationsanalysen von Citrullin mit Calprotectin, CRP und der Krankheitsaktivität	47
Tabelle 18: Vergleich von D-Laktat im Harn bei Kontrollen, PatientInnen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn	48

Tabelle 19: Vergleich von D-Laktat im Harn bei PatientInnen mit aktiver Colitis ulcerosa (CU) und PatientInnen von CU in Remission	49
Tabelle 20: Korrelationsanalysen von D-Laktat mit Calprotectin, CRP sowie der Krankheitsaktivität	50
Tabelle 21: Vergleich von I-FABP bei CED-PatientInnen, Kontrollen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn	51
Tabelle 22: Korrelationsanalysen von I-FABP mit Calprotectin, CRP sowie der Krankheitsaktivität	51

1. Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Die Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) bedeutet für viele PatientInnen, dass diese sie lebenslang begleiten wird. Um eine bestmögliche Lebensqualität zu erreichen, ist in den meisten Fällen eine langfristige Therapie vonnöten. Nur mittels exakter und verlässlicher diagnostischer Methoden können die Art, die Lokalisation und der Aktivitätsgrad der Erkrankung ermittelt werden, nach welcher sich wiederum die Therapie richtet. Die Methoden der Diagnostik sollten dabei so einfach, risikolos und minimal invasiv wie möglich sein. Biomarker, im Sinne von Parametern, welche im Blut, Harn oder Stuhl von PatientInnen detektiert werden können und Auskunft über deren Gesundheitszustand geben, nehmen hierbei eine zentrale Rolle ein.

Im klinischen Alltag und für Studienzwecke wird bereits eine Reihe von Biomarkern angewendet, diese unterliegen jedoch, bezüglich ihrer Sensitivität, Spezifität und Praktikabilität, bestimmten Limitierungen. Deshalb stellt die Suche nach neuen, besseren Biomarkern ein überaus interessantes und notwendiges Forschungsgebiet dar.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden die derzeit in Verwendung befindlichen Biomarker für CED samt deren Aufgaben, Vor- und Nachteilen besprochen. Im Anschluss werden die Ergebnisse einer prospektiven Studie präsentiert, bei der aktuelle, sowie potenziell neue Biomarker bei PatientInnen mit einer CED, sowie gesunden Vergleichspersonen bestimmt wurden.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Der Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen bezeichnet eine Gruppe von Erkrankungen, welche durch chronisch-rezidivierende oder persistierende Entzündungen des Darms, verbunden mit einer Imbalance der körpereigenen Immunabwehr charakterisiert sind. Die Vertreter der CED sind Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. In den folgenden Kapiteln werden diese beiden Erkrankungen gemeinsam behandelt, auf die Unterschiede wird jedoch jeweils hingewiesen.

1.2.1 Epidemiologie

In Europa leiden in etwa zwischen 2,5 und 3 Millionen Menschen an einer CED, wobei Inzidenz und Prävalenz im Steigen sind[1]. In den Industrienationen zeigt sich eine höhere Prävalenz als in Entwicklungsländern, außerdem besteht ein Nord-Süd-Gradient, wobei neuere geoepidemiologische Studien zeigen, dass mit der wirtschaftlichen und kulturellen Annäherung einiger südlicher Länder an die Industrienationen die Prävalenz der CED steigt. Als Ursachen dafür werden veränderte Lebens- sowie Ernährungsgewohnheiten diskutiert, welche eventuell eine Änderung der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms zur Folge haben könnten[2].

Die Erstmanifestation einer CED erfolgt meist im frühen Erwachsenenalter, grundsätzlich können aber Personen jedes Lebensalters erkranken. Frauen sind gleichermaßen von CED betroffen wie Männer.

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass es aufgrund einer Imbalance der intestinalen Immunantwort auf luminale Faktoren (vor allem Bakterien) zu der Entzündungsreaktion kommt. Wichtig bezüglich der Pathogenese der Erkrankung ist eine erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut, die die Auseinandersetzung des mukosalen Immunsystems mit dem luminalen Darminhalt verstärkt. Generell wird angenommen, dass bei der Entstehung einer CED eine Kombination aus genetischen, luminalen und Umweltfaktoren wirksam ist.

1.2.2.1 Genetik

Bei 5-10% der PatientInnen mit einer CED ist eine familiäre Häufung bekannt und bei genomweiten Assoziationsstudien (GWAS, engl. genome-wide association studies) wurden 99 Risikoloci im Erbmaterial identifiziert, von denen 28 sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis ulcerosa als prädisponierend angesehen werden[3].

Es handelt sich dabei beispielsweise um Mutationen an Genen, die für eine funktionierende Barrierefunktion der Darmwand verantwortlich sind. Solche Gene wären CDH1, GNA12 und PTPN2, oder das NOD2-Gen, welches eine wichtige

Rolle in der angeborenen Immunantwort spielt, da es für ein Protein codiert, welches als Rezeptor für bestimmte Bestandteile der Bakterienzellwand agiert.

1.2.2.2 Luminale Faktoren

Die Hypothese, dass das intestinale Mikrobiom eine wichtige Rolle in der Pathogenese einer CED spielt, wird unter anderem durch die Lokalisation der entzündlichen Läsionen in Darmabschnitten, in denen die bakterielle Besiedelung besonders hoch ist, erhärtet. Ferner wird das Phänomen einer Dysbiose, was eine veränderte Zusammensetzung unterschiedlicher Mikroorganismengruppen im Vergleich zu gesunden Personen bedeutet, in zahlreichen Arbeiten beschrieben [4–6]. Daraus entstand die Idee, die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms mittels Prä- und Probiotika, Antibiotika oder einer fäkalen Mikrobiomtransplantation zu verändern. Der Einsatz von Antibiotika als Therapie einer CED wird kontrovers diskutiert, und ist allenfalls nur für bestimmte PatientInnen, welche sich im Anfangsstadium der Erkrankung mit Colonbefall befinden, sinnvoll.[7]

1.2.2.3 Umweltfaktoren

Als Risikofaktor für die Erstmanifestation, eine Rezidivneigung sowie einen schwereren Krankheitsverlauf ist beim Morbus Crohn das Rauchen bekannt[8]. Bei Colitis ulcerosa wird dem Tabakkonsum hingegen ein protektiver Effekt zugeschrieben.

Eine vorangegangene Appendektomie und eine durchgemachte infektiöse Gastroenteritis werden als mögliche Triggerfaktoren für die Erstmanifestation eines Morbus Crohn angenommen [9,10]. Bei der Colitis ulcerosa scheint sich eine vorangegangene Appendektomie Studien zufolge positiv auf den Krankheitsverlauf auszuwirken [11–14]. Eine neuere Studie aus China beschreibt jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Appendektomie und Colitis ulcerosa [15].

1.2.3 Pathologie und klinische Charakteristika

Beim Morbus Crohn sind alle Wandschichten des Darms von der Entzündung betroffen, jedoch wechseln sich gesunde Darmabschnitte mit entzündeten ab, was als „skip lesions“ bezeichnet wird. Vom Mund bis zum After können sämtliche

Abschnitte des Intestinalsystems befallen sein, als Prädilektionsstellen gelten jedoch die Ileozökalregion und das Colon. Abhängig von den befallenen Darmabschnitten und der Schwere der Erkrankung treten als Leitsymptome Bauchschmerzen, Durchfall, Fieber, Gewichtsverlust, Mangelerscheinungen wie etwa Anämie, Hypoproteinämie, Malabsorption und dergleichen auf.

Anders als die Colitis ulcerosa ist der Morbus Crohn häufig mit dem Auftreten von akut entzündlichen oder narbigen Stenosen, Abszessen und Fisteln verbunden.

Die Colitis ulcerosa ist eine chronische Entzündung, von der nur die Mukosa und Submukosa des befallenen Darmabschnittes betroffen sind. Die Entzündung beginnt im Rektum und breitet sich nach kranial hin kontinuierlich aus, wobei meist eine Linksseitencolitis besteht. Jene Abschnitte des Verdauungstraktes, welche sich oral des Colons befinden, sind von dieser Erkrankung nicht betroffen.

Die Leitsymptome der Colitis ulcerosa sind wässrig-schleimige, oft blutige Durchfälle, krampfartige Bauchschmerzen sowie imperativer Stuhldrang. Außerdem leiden betroffene PatientInnen häufig an Fieber, Gewichtsverlust und Anämie.

Sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa treten bei einem Teil der Betroffenen extraintestinale Manifestationen wie Arthritis, Uveitis, Pyoderma gangraenosum und primär sclerosierende Cholangitis auf.

1.2.4 Krankheitsaktivität und –verlauf

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch entzündliche Erkrankungen, welche durch einen schubhaften Verlauf gekennzeichnet sind. Im Folgenden werden unterschiedliche Aktivitätsindizes zur Festlegung der Krankheitsaktivität, sowie die Begriffe Schub, Remission und chronisch-aktiver Verlauf genauer erläutert und definiert.

1.2.4.1 Aktivitätsindizes

Eine CED anhand deren Aktivität und Schweregrad zu klassifizieren, ist für das Patientenmanagement und die Wahl einer geeigneten Therapie von großer Wichtigkeit [16]. Es ist eine Vielzahl von Aktivitätsscores sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis ulcerosa bekannt. Manche werden eher in der klinischen Praxis

angewendet, wie etwa die Montréal Klassifikation für Colitis ulcerosa oder der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) für Morbus Crohn und andere finden häufiger im Rahmen von klinischen Studien Anwendung, wie der modifizierte Mayo Score für Colitis ulcerosa oder der Harvey-Bradshaw-Index für Morbus Crohn.

Indizes für Colitis ulcerosa

Montréal Klassifikation

Tabelle 1: Montréal Klassifikation für den Schweregrad einer Colitis ulcerosa

Quelle: Eigene Darstellung auf der Basis von Silverberg MS et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5A–36A;

Schweregrad	Definition
S0 (klinische Remission)	Asymptomatisch
S1 (leichte Erkrankung)	4 oder weniger Stühle/Tag (mit oder ohne Blut), keine systemische Erkrankung, normale Entzündungsmarker
S2 (moderate Erkrankung)	Mehr als 4 Stühle/Tag, minimale Anzeichen einer systemischen Erkrankung
S3 (schwere Erkrankung)	Mindestens 6 blutige Stühle/Tag, Herzfrequenz mindestens 90/min, Körpertemperatur von mindestens 37,5°C, Hämoglobin weniger als 19,5g/100 ml, BSG mindestens 30 mm/h

Tabelle 2: Montréal Klassifikation für die Ausdehnung einer Colitis ulcerosa

Quelle: Eigene Darstellung auf der Basis von Silverberg MS et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5A–36A;

Bezeichnung	Ausdehnung	Beschreibung
E1	Proktitis	Die Entzündung ist auf das Rektum begrenzt
E2	Linksseitige Colitis	Die Entzündung umfasst die Darmabschnitte distal der linken Colonflexur
E3	Extensive Colitis	Auch Darmanteile proximal der linken Colonflexur sind betroffen (eine Pancolitis fällt in diese Gruppe)

Mayo Score

Tabelle 3: Mayo Score

Quelle: Dignass A et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012;6(10):965–90; aus dem Englischen übersetzt und leicht modifiziert.

Mayo Index	0	1	2	3
Stuhlfrequenz	Normal	1-2/Tag öfter als normal	3-4/Tag mehr als normal	5/Tag mehr als normal
Blut im Stuhl	Keines	Sichtbares Blut bei weniger als 50% der Stühle	Sichtbares Blut bei mindestens 50% der Stühle	Blutaustritt auch ohne Stuhl
Endoskopischer Befund der Darmmukosa	Normal	Milde Colitis (Erythem, leicht spröde Schleimhaut)	Moderate Colitis (deutliches Erythem, Erosionen, Gefäßmuster verschwunden)	Schwere Colitis (Ulzerationen, spontane Blutungen)
Globale Einschätzung des Arztes	Normal	Leichte Erkrankung	Moderate Erkrankung	Schwere Erkrankung

Beim modifizierten Mayo Score wird der endoskopische Befund der Darmmukosa weggelassen, ansonsten errechnet er sich gleich wie der Mayo Score.

Indizes für Morbus Crohn

Crohn's Disease Activity Index (CDAI)

Der CDAI setzt sich aus acht Faktoren zusammen, die jeweils mit einem Gewichtungsfaktor multipliziert und anschließend summiert werden (vergleiche Tabelle 4).

Tabelle 4: Crohn's Disease Activity Index (CDAI)

Quelle: Mediscope (Internet). Veröffentlicht am 26.01.2010.

http://www.gastro.medline.ch/Services/_Tools/Klinische_Scores/Klinische_Scores_Gastroenterologie_Diagnose_Aktivitaet_Prognose.php. Abgerufen am 15.03.2017; leicht modifiziert

Kriterium	Gewichtungsfaktor
Anzahl ungeformte Stuhlgänge in den letzten 7 Tagen	x 2
Bauchschmerzen in den letzten 7 Tagen (0=keine, 1=leicht, 2=mittel, 3=stark)	x 5
Allgemeinbefinden in den letzten 7 Tagen (0=gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht, 4=unerträglich)	x 7
Komplikationen (pro Komplikation 1 Punkt) <ul style="list-style-type: none">• Gelenkbeteiligung• Augenbeteiligung (Iritis, Uveitis)• Hautbeteiligung (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, orale Aphthen)• Perianaler Befall (Analfissur, perianale Fistel oder perianale Abszesse)• Andere Fisteln• Erhöhte Körpertemperatur in den letzten 7 Tagen (>37,7 °C)	x20
Symptomatische Durchfallbehandlung	x30
Abdominelle Resistenz (0=nein, 2=fraglich, 5=sicher)	x10
Abweichung des Hämatokrits von 47% bei Männern und 42% bei Frauen	x6
Abweichung vom Standardgewicht in %	x1

Harvey-Bradshaw-Index

Eine vereinfachte Version des CDAI stellt der Harvey-Bradshaw-Index (vergleiche Tabelle 5) dar.

Tabelle 5: Harvey-Bradshaw-Index

Quelle: eigene Darstellung auf der Basis von Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet Lond Engl.* 8. März 1980;1(8167):514.

Kriterium	Punkte
Allgemeinbefinden	0=gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht, 4=unerträglich
Bauchschmerzen	1=leicht, 2=mittel, 3=stark
Anzahl ungeformter Stuhlgänge pro Tag	1 pro Stuhlgang
Abdominelle Resistenz	1=fraglich, 2=sicher, 3=sicher und schmerzhaft
Komplikationen: Arthralgie, Uveitis, Iritis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, orale Aphthen, Analfissur, neue Fistel, Abszess	1 pro Komplikation

1.2.4.2 Definition einer Remission

PatientInnen mit einer CED befinden sich in Remission, wenn sie völlig frei von Symptomen der Erkrankung sind und endoskopisch eine mukosale Heilung („mucosal healing“, siehe Abschnitt 2.2.2.3.) festgestellt wurde [16]. Beim zweiten europäischen evidenzbasierten Konsensus zu Diagnose und Management von Colitis ulcerosa von 2012 einigten sich die Teilnehmer darauf, dass sich der Zustand einer Remission im klinischen Setting durch eine Stuhlfrequenz von höchstens drei pro Tag in Abwesenheit von abnormem Stuhldrang (als „urgency“ bezeichnet) und blutigen Stühlen beschreiben lässt [16]. Im zweiten europäischen Konsensus zu Morbus Crohn von 2009 wurde auf den CDAI verwiesen: In der Mehrzahl der klinischen Studien wird eine Remission durch einen CDAI von unter 150 definiert [17].

1.2.4.3 Definition eines Schubes

Als Schub wird das Auftreten von Symptomen einer CED bei PatientInnen, welche sich zuvor in Remission befunden haben, bezeichnet [16,17]. Beim oben genannten Konsensus zu Diagnose und Management von Colitis ulcerosa von 2012 sahen 47 von 59 Teilnehmern blutige Stühle als eine essenzielle Komponente eines Schubes dieser Erkrankung an, 29 von 59 waren der Meinung,

dass eine Kombination von blutigen Stühlen, einem Anstieg der Stuhlfrequenz und eine im Rahmen einer Sigmoidoskopie als abnorm beurteilte Mukosa nötig ist, um einen Schub zu definieren. Bei Studien zu Morbus Crohn wird ein Schub als ein CDAI von über 150 mit einem Anstieg von mehr als 70 Punkten im Vergleich zur vorhergehenden Phase der Remission definiert [18].

1.2.4.4 Chronisch-aktiver Verlauf

Wenn Schübe einer aktiven CED persistieren und nicht durch Perioden einer Remission unterbrochen werden, spricht man von einem chronisch-aktiven Verlauf. Dieser Begriff wurde in der Vergangenheit oft verwendet, um den Krankheitsverlauf von PatientInnen zu beschreiben, welche nicht auf Steroide oder Immunmodulatoren ansprechen. Heute wird in diesem Fall eher von einem steroidabhängigen Verlauf gesprochen [16,17].

1.2.5 Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen richtet sich nach der Krankheitsaktivität (Schub/Remission), der Lokalisation und dem Schweregrad der Entzündung.

Zur Behandlung eines akuten Krankheitsschubes werden häufig Glukokortikoide eingesetzt, wie Prednisolon oder Budesonid beim Morbus Crohn, oder lokal als topische Therapie Budesonid in Form von Rektalschaum oder Klysmen bei der Colitis ulcerosa.

Bei milder bis mäßiger Symptomatik einer Colitis ulcerosa oder bei Morbus Crohn mit Colonbefall werden auch Sulfasalazin und Mesalazin (5-ASA) verwendet.

Wurde ein Schub erfolgreich behandelt, gilt es, die erreichte Remission zu erhalten. Dazu werden Immunsuppressiva wie Azathioprin, 6-Mercaptopurin und Methotrexat eingesetzt.

Einen Meilenstein in der Therapie von CED stellte die Entwicklung der sogenannten Biologika dar. 1995 wurde zum ersten Mal der monoklonale Antikörper Infliximab, welcher sich gegen den Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) richtet, zur Therapie eines Patienten mit Morbus Crohn eingesetzt [19]. Es folgten weitere anti-TNF α -Antikörper wie Adalimumab, Golimumab und Certolizumab. Eine weitere Gruppe der Biologika, welche bei CED angewendet werden, stellen

die anti-Adhäsionsmolekül-Antikörper dar, deren Vertreter Vedolizumab in Österreich zur therapeutischen Anwendung zugelassen ist.

Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa besteht die Möglichkeit einer chirurgischen Therapie, was eine Resektion von befallenen Darmabschnitten bedeutet. Indikationen dazu stellen unter anderem symptomatische Stenosen, Abszedierungen, Perforationen, Fisteln und das bei der Colitis ulcerosa als Komplikation gefürchtete toxische Megacolon dar. Auch wenn eine therapierefraktäre Colitis vorliegt, was bedeutet, dass die Erkrankung auf keine der verfügbaren medikamentösen Therapien anspricht, stellt eine chirurgische Resektion des Colon eine Behandlungsoption dar. Eine Colitis ulcerosa bedeutet je nach Ausdehnung und Schweregrad ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von colorektalen Neoplasien. Das Vorliegen von intraepithelialen Neoplasien oder Karzinomen gilt somit ebenfalls als Operationsindikation.

1.2.6 Diagnostik

Im Rahmen der Diagnosestellung bei Erstmanifestation einer CED sowie zur Verlaufskontrolle wird eine Kombination aus der Erhebung von klinischen Symptomen, Endoskopien, histologischen und bildgebenden Verfahren und der Analyse von Laborparametern angewandt.

Zum Ausschluss einer infektiösen Enteritis sollte der Stuhl auf pathogene Keime, insbesondere *Clostridium difficile*, untersucht werden.

1.2.6.1 Anamnese und körperliche Untersuchung

In der klinischen Praxis ist es von großer Wichtigkeit, jene PatientInnen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer CED leiden, zu identifizieren und von jenen PatientInnen zu unterscheiden, deren Beschwerden durch andere Ursachen ausgelöst werden. Dadurch können möglichst früh die richtigen weiterführenden diagnostischen Prozesse in die Wege geleitet werden. Den ersten Schritt dazu stellt eine eingehende und zielgerichtete Anamnese bezüglich der genauen Symptomatik und bestimmten Risikofaktoren dar.

Eine vollständige Anamnese bei Verdacht auf eine CED sollte eine detaillierte Befragung über den Beginn der Symptomatik, Episoden von blutigen oder unblutigen Durchfällen, nächtlichen Durchfällen, Tenesmen, Bauchschmerzen,

Inkontinenz, Nahrungsmittelintoleranzen, kürzlich eingenommene Medikamente, Reiseaktivitäten, Begleiterkrankungen, extraintestinale Manifestationen, Beschwerden im Analbereich, die Familienanamnese, sowie das Rauchverhalten beinhalten (16,22).

Im Rahmen der körperlichen Untersuchung sollten der Allgemeinzustand, die Herzfrequenz, der Blutdruck, die Körpertemperatur, sowie die Körpergröße und das Körpergewicht erhoben werden. Weiters sollten eine Inspektion, Auskultation und Palpation des Abdomens, eine Inspektion des Perianalbereiches, eine digital-rektale Untersuchung, eine Inspektion des Rachens und eine orientierende Untersuchung auf eine mögliche Augen-, Gelenks- und/oder Hautbeteiligung erfolgen [16,17].

1.2.6.2 Endoskopie

Vor allem bei Erstmanifestation einer CED ist eine endoskopische Beurteilung der befallenen Darmabschnitte essentiell und gilt nach wie vor als Goldstandard in der Diagnostik und Reevaluierung. Bei der Colitis ulcerosa wird meist eine Ileokoloskopie durchgeführt, bei Morbus Crohn zusätzlich eine Ösophagogastroduodenoskopie, da bei diesen Erkrankungen auch Veränderungen im oberen Gastrointestinaltrakt vorliegen können. Zur histologischen Beurteilung werden dabei aus den betroffenen Abschnitten Biopsate entnommen.

Zur Beurteilung von perianalen Abszessen und Fisteln kommt die rektale Endosonografie zum Einsatz.

Die Nachteile der Endoskopie als diagnostisches Mittel bestehen in der hohen Invasivität der Methode, welche mit unterschiedlichen Risiken und einer erhöhten Morbidität verbunden ist. Oft wird für endoskopische Verfahren eine Sedierung benötigt, was ein gewisses Risiko nach sich zieht.

1.2.6.3 Bildgebung

Als schnellste und unkomplizierteste bildgebende Diagnostik gilt die transabdominelle Sonografie. Sie ermöglicht eine rasche, nichtinvasive und risikolose Beurteilung der entzündeten Darmabschnitte und ist damit sowohl bei der Erstdiagnose als auch zur Verlaufskontrolle sehr hilfreich.

Zur Beurteilung eines Dünndarmbefalls bei Morbus Crohn ist eine Untersuchung mittels MR-Enteroklysma beziehungsweise MR-Enterografie indiziert. Alternativ kann man auf ein CT-Enteroklysma ausweichen. Die entzündliche Aktivität, Stenosen, Fisteln sowie das Befallsmuster können damit zufriedenstellend identifiziert und charakterisiert werden.

1.2.6.4 Labordiagnostik

Die in der CED-Diagnostik am häufigsten bestimmten Laborparameter sind das C-reaktive Protein (CRP), die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), sowie das Calprotectin.

Als Entzündungsmarker kommt am häufigsten das CRP zum Einsatz. Es gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine und wird als Reaktion auf akute und chronische Entzündungsprozesse in den Hepatozyten (Leberzellen) produziert.

Ein trägerer Indikator für die Entzündungsaktivität ist die BSG. Diese ist zwar ein zufriedenstellender Marker für die Akute-Phase-Reaktion, jedoch von vielen Nebenfaktoren wie Alter, Geschlecht und einer bestehenden Schwangerschaft abhängig.

Ein Nachteil von CRP und BSG besteht klar darin, dass beide nicht zwingend spezifisch für CED sind.

Calprotectin sowie Lactoferrin spielen als Neutrophilenmarker im Stuhl eine entscheidende Rolle in der Entzündungsdiagnostik, können jedoch nicht die Ätiologie der Entzündung unterscheiden [20]. Sie stellen aber ein sinnvolles Werkzeug zur Abgrenzung einer CED von nicht-entzündlichen Erkrankungen, wie dem Reizdarmsyndrom, dar.

Weitere Laborparameter, die auf eine aktive CED hinweisen, sind Thrombozytose sowie Leukozytose. Doch auch diese unterliegen Beschränkungen hinsichtlich ihrer Spezifität für diese Erkrankungen.

In den folgenden Kapiteln wird auf diese sowie weitere Biomarker genauer eingegangen.

1.3 Biomarker

1.3.1 Definition

Ein Biomarker kann als ein Charakteristikum definiert werden, welches objektiv messbar ist und als Indikator für normale biologische oder pathogene Prozesse, sowie eine pharmakologische Reaktion auf eine therapeutische Intervention dient [21].

1.3.2 Anwendungsgebiete von Biomarkern bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Anwendung von Biomarkern ist bei der Diagnose, der Verlaufskontrolle und der Evaluierung von Therapieergebnissen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen unumgänglich. Hierbei kommt vor allem jenen Markern, welche aus Blut, Stuhl oder Harn bestimmt werden können, eine besonders entscheidende Rolle zu, da sie eine nichtinvasive, risikoarme und kostengünstige Möglichkeit zur Evaluierung der intestinalen Entzündung darstellen [22].

Ein idealer Biomarker liefert ein Ergebnis, welches präzise, standardisiert, reproduzierbar und leicht zu interpretieren ist und verfügt über eine hohe Sensitivität und Spezifität. Dies trifft jedoch auf keinen der derzeit verfügbaren Marker zu [23]. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen Biomarkern, auf welche die oben genannten Eigenschaften zutreffen, von großem Interesse und stellt die Motivation für die Erstellung dieser Diplomarbeit und die damit verbundene Studie dar. Im Folgenden werden die Aufgaben von Biomarkern in der Diagnostik von CED genauer beschrieben.

1.3.2.1 Biomarker in der Diagnosefindung

Wie bereits beschrieben, sind Biomarker per definitionem objektiv messbar und reproduzierbar und stehen somit im Gegensatz zu subjektiven klinischen Parametern, welche oftmals nicht mit der eigentlichen Entzündungsaktivität korrelieren. So wurde etwa der CDAI, welcher zur Definition eines klinischen Endpunkts bei Studien zu Morbus Crohn dient, bei PatientInnen mit Reizdarmsyndrom sowie PatientInnen mit Morbus Crohn verglichen. Der CDAI enthält als einzige objektiv messbare Parameter den Hämatokrit und das

PatientInnengewicht, ansonsten werden subjektive Parameter wie Schmerzen und generelles Wohlbefinden erhoben. Es zeigte sich, dass die PatientInnen mit Morbus Crohn zwar höhere Hämatokritwerte erreichen, jedoch der durchschnittliche gesamt- CDAI-Score bei jenen PatientInnen, welche an einem Reizdarmsyndrom leiden, höher ist [24]. Dies ist vor allem auf die signifikant höheren Schmerz-Scores bei diesen PatientInnen zurückzuführen und impliziert, dass alleine durch die klinische Präsentation der Erkrankung keine Differenzierung zwischen einem Reizdarmsyndrom und einer CED gemacht werden kann[24].

Da die Symptome einer funktionellen Darmerkrankung, wie beispielsweise eines Reizdarmsyndroms, sehr ähnlich denen einer CED sein können, ist es von immenser Wichtigkeit, diese Differenzierung schon früh in der Diagnosefindung zu machen. Mithilfe von nichtinvasiven Biomarkern können einerseits jene PatientInnen identifiziert werden, die von einer invasiveren Diagnostik wie einer Endoskopie in Verbindung mit einer histopathologischen Untersuchung profitieren könnten, da damit eine frühe Diagnosesicherung einer CED erreicht werden kann, aber auch jene PatientInnen, bei denen diese aufwändigen und nicht ganz risikolosen Untersuchungen vermieden werden könnten, da bei ihnen die Diagnose einer CED ohnehin unwahrscheinlich ist [22].

1.3.2.2 Biomarker in der Therapieplanung

Ist die Diagnose einer CED gesichert, stellt sich die Frage nach dem Schwere- und Aktivitätsgrad der Erkrankung, da davon die genaue Therapieplanung abhängig ist. Es gibt Hinweise darauf, dass für PatientInnen mit besonders ausgeprägter Entzündung eine möglichst frühe Therapie mit Immunsuppressiva und/oder Biologika insofern einen Vorteil mit sich bringt, als dass es dadurch früher zu einer Remission kommt [25,26]. Befindet sich der/die PatientIn in Remission, ist ein weiteres Ziel der medikamentösen Therapie eine Erhaltung der erreichten Remission und die damit einhergehende Verhinderung von Komplikationen der Erkrankung. Da eine immunsuppressive Therapie in seltenen Fällen jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen kann, wird diese bei weniger schweren Entzündungen bei der Erstdiagnose nicht sofort als Therapie der ersten Wahl eingesetzt, sondern zuvor auf andere Therapeutika mit geringeren Nebenwirkungen zurückgegriffen. Ein Biomarker, dessen Wert mit dem

Schweregrad der intestinalen Entzündung korreliert, könnte somit einen wichtigen Beitrag zu einer raschen und individuellen Therapieentscheidung leisten.

1.3.2.3 Biomarker und Therapieerfolg

In den letzten Jahren ist das sogenannte „mucosal healing“ (mukosale Heilung) zu einem zentralen Begriff im Zusammenhang mit CED geworden. Es gibt keine genau festgelegten Kriterien, die diesen Begriff definieren, jedoch lässt sich der Fachliteratur entnehmen, dass es sich dabei um eine -endoskopisch diagnostizierte- Form der Wundheilung an der Mukosa handelt. Demnach ist der Begriff „mucosal healing“ mit dem Wort „Remission“ assoziiert [27]. Das Konzept der „deep remission“ (tiefe Remission) beschreibt eine Normalisierung der klinischen Symptome, verbunden mit Biomarkern im Referenzbereich und „mucosal healing“. „Deep remission“ wird in zahlreichen Studien als harter Endpunkt angenommen und gilt mittlerweile als zu erreichendes Therapieziel in der Behandlung von CED [28–30].

In der 2014 veröffentlichten SONIC-Studie von Peyrin-Biroulet et al. zeigte sich, dass bei der Hälfte jener PatientInnen, deren CED mit Infliximab und/oder Azathioprin behandelt wurde, und sich in klinischer Remission (CDAI<150) befanden, eine Krankheitsaktivität mittels Endoskopie und/oder erhöhtem CRP festgestellt werden konnte [31]. Dies impliziert, dass das klinische Zustandsbild alleine nicht suffizient für eine genaue Evaluierung der Krankheitsaktivität ist, und auch mithilfe von derzeitigen Biomarkern nicht eruiert werden kann, ob eine bestimmte Therapie erfolgreich war.

1.3.2.4 Voraussehen und Diagnose eines neuerlichen Krankheitsschubes mittels Biomarkern

Eine 2005 veröffentlichte Studie von Costa et al. beobachtete 83 PatientInnen mit Morbus Crohn und 41 mit Colitis ulcerosa zwölf Monate lang nach Messung von Calprotectin. Alle PatientInnen befanden sich zu Beginn der Studie in klinischer Remission. Es zeigte sich, dass PatientInnen, bei denen das Calprotectin bei der initialen Messung einen Wert von 150mg/g überstiegen hatte, ein deutlich erhöhtes Risiko für einen erneuten Schub innerhalb der folgenden zwölf Monate hatten. Bei PatientInnen, welche an Colitis ulcerosa litten, war dieses Risiko

vierzehnmal höher als bei PatientInnen mit einem Calprotectin-Wert unter 150 mg/g, bei Morbus Crohn-PatientInnen war es zweimal so hoch [32].

Wenn Biomarker zur Verfügung stünden, mit denen eine Aussage über das Risiko eines neuerlichen Schubes getroffen werden könnte, hätte das eine erhebliche Auswirkung auf die Planung der Therapie und die Engmaschigkeit der Kontrollen.

Wenn ein erneuter Krankheitsschub aufträte, könnten Biomarker einen ersten Hinweis darauf geben. Wie bereits anhand der SONIC-Studie erläutert, korrelieren die klinische Präsentation einer CED und die derzeitigen Biomarker oftmals nicht mit der tatsächlichen Entzündungsaktivität. Im Rahmen einer Verlaufskontrolle könnte somit eine Krankheitsaktivität übersehen werden. Da dies mit erheblichen Langzeitkomplikationen, wie einem erhöhten Karzinomrisiko und einer erhöhten Hospitalisierungsrate einher gehen kann, ist es von größter Wichtigkeit, eine bestehende Entzündung möglichst früh zu erkennen und zu behandeln. Fallen bei einer Verlaufskontrolle veränderte Werte von Biomarkern auf, kann eine weiterführende Diagnostik wie eine Endoskopie oder Bildgebung initiiert werden.



Abbildung 1: Schematisch dargestellter Behandlungsverlauf bei CED unter Verwendung von Biomarkern

Quelle: Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1275–1285.e2.

1.3.2.5 Biomarker für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

In diesem Abschnitt werden die derzeit verwendeten Biomarker näher beschrieben sowie näher auf ihre Vorteile und Limitationen eingegangen. Anschließend werden jene Parameter, deren Potenzial als Biomarker für CED im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht wurde, vorgestellt.

Derzeitige systemische Biomarker

Serummarker der Akuten-Phase-Reaktion

C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP ist eines der zuerst entdeckten Akute-Phase-Proteine und wohl der im klinischen Alltag am häufigsten verwendete Entzündungsmarker [33]. Die Produktion dieses Proteins in den Hepatozyten wird durch Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), IL-1 β und TNF- α getriggert.

Laut neueren Erkenntnissen ist die Leber jedoch nicht der einzige Syntheseort für CRP: Beim Morbus Crohn wird CRP auch in den mesenterialen Fettzellen exprimiert, was eine Erklärung dafür darstellen könnte, dass bei dieser Erkrankung höhere CRP-Werte erreicht werden als bei der Colitis ulcerosa [34].

CRP bindet an Phosphocholin, welches sich an der Oberfläche von toten oder absterbenden Zellen (und einigen Arten von Bakterien) findet. Das gebundene CRP aktiviert das Komplementsystem, bindet an Makrophagen und setzt so humorale und zelluläre Effektormechanismen der unspezifischen Immunabwehr in Gang [35].

Ein Vorteil des CRP besteht in dessen raschem Anstieg und ähnlich raschem Abfall, welcher durch seine relativ kurze Halbwertszeit von 48 Stunden erklärbar ist.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften dient das CRP als Marker für die Aktivität und den Schweregrad der Entzündung und wird somit in der CED-Diagnostik vor allem zur Verlaufskontrolle angewendet. Außerdem eignet es sich zur Unterscheidung eines Reizdarmsyndroms von einer CED, da es sich beim Reizdarmsyndrom um eine funktionelle und keine entzündliche Erkrankung handelt [36].

Allerdings ist dieser Biomarker nicht nur bei CED erhöht, sondern auch bei einer Vielzahl anderer akuter und chronischer Entzündungsprozesse im gesamten Körper wie etwa bei Atherosklerose, nach einem Herzinfarkt, im Zuge von Infektionen, rheumatischen Erkrankungen aber auch bei malignen Tumoren [36]. Dies resultiert in einer niedrigen Spezifität des CRP für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. Ein weiterer Nachteil dieses Markers besteht darin, dass er deutlichen interindividuellen Schwankungen unterliegt, was auf

Genpolymorphismen zurückzuführen ist [37,38]. Es wird abgeschätzt, dass es bei etwa 15% der gesunden Individuen zu keinem CRP-Anstieg kommt, wenn sie Entzündungsreizen ausgesetzt sind [39,40].

Der Referenzbereich für CRP liegt bei Kindern und Erwachsenen bei 0,068-8,2 mg/l, der Median bei 0,58 mg/l [36].

Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)

Im Ablauf eines entzündlichen Geschehens nimmt die Konzentration an Akute-Phase-Proteinen, Fibrinogen und Immunglobulinen im Plasma zu. Dies führt zu einer verstärkten Aggregation der Erythrozyten und die schwereren Aggregate sinken in einem senkrechten Röhrchen schneller ab. Die Sedimentation der Erythrozyten in Millimetern wird nach einer Stunde und bei einigen Untersuchungen zusätzlich nach zwei Stunden abgelesen. Wie das CRP, ist auch die BSG ein recht unspezifischer Entzündungsparameter. Der Anstieg erfolgt relativ träge (frühestens 24 Stunden nach Ingangsetzung der Entzündung), der Abfall erfolgt nach Beendigung der Akute-Phase-Antwort mit einer Halbwertszeit von 96 bis 144 Stunden [36]. Durch den späten Anstieg der BSG kann eine entzündliche Aktivität erst mit einiger Verzögerung festgestellt werden, was einen Nachteil gegenüber dem CRP-Nachweis darstellt.

Der Referenzbereich beträgt ≤ 20 mm für Frauen unter 50 Jahren, ≤ 30 mm für Frauen über 50 Jahren, ≤ 15 mm für Männer unter 50 Jahren und ≤ 20 mm für Männer über 50 Jahren. Neben Alter und Geschlecht sind beispielsweise auch der Hämatokrit, eine bestehende Schwangerschaft, der Zeitpunkt der Probennahme im Menstruationszyklus oder die Einnahme von Kontrazeptiva Einflussgrößen der BSG, was sich schließlich negativ auf die Spezifität dieses Biomarkers auswirkt [36].

Im Rahmen einer 2015 publizierten Metaanalyse von Menees et al. wurde der Frage nachgegangen, ob bestimmte Biomarker für die Unterscheidung zwischen einer CED und einem Reizdarmsyndrom eingesetzt werden können. Es zeigte sich, dass PatientInnen mit einem CRP von $\leq 0,5$ mg/dl mit einer Wahrscheinlichkeit von unter einem Prozent an einer CED erkrankt waren, also dass ein niedriges CRP eine solche Erkrankung fast ausschließt. Für die BSG konnte eine solch ausschließende Aussagekraft nicht nachgewiesen werden [41]. In den letzten Jahren verlor die BSG in der klinischen Praxis immer mehr an

Bedeutung und wurde durch andere, potentere Biomarker wie das CRP oder das Calprotectin (s. Abschnitt 1.2.3.2.1.5) weitestgehend abgelöst.

Leukozytenzahl

Ebenfalls Teil der Akute-Phase-Reaktion ist ein Anstieg der Leukozytenzahl.

Leukozyten werden im Knochenmark und den Lymphorganen gebildet und können in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, sowie Monozyten und Lymphozyten unterteilt werden. Der Referenzbereich für Erwachsene liegt zwischen $3,6 \times 10^9$ Zellen/l und 10×10^9 Zellen/l [36]. Eine erhöhte Leukozytenzahl kann ein Hinweis auf eine entzündliche Aktivität im Rahmen einer CED sein, diesem Biomarker fehlt es jedoch an Spezifität, da eine Leukozytose auch im Rahmen von anderen entzündlichen Prozessen wie beispielsweise Infektionen, aber auch bei Tumorerkrankungen oder physiologisch während der Schwangerschaft auftreten kann.

Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kernlose Abkömmlinge der im Knochenmark gebildeten Megakaryozyten und haben einen Durchmesser von 1-6 μm . Ihre primäre Aufgabe liegt in der Hämostase. Wird eine Gefäßwand verletzt, sorgen sie durch Adhäsion und Aggregation dafür, dass die Integrität des Gefäßendothels gewahrt ist.

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass Thrombozyten auch bei chronisch-entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Bei CED kommt es zu Veränderungen von Anzahl (Thrombozytose), Form und Funktion der Thrombozyten [42]. Aktivierte Blutplättchen setzen verschiedene proinflammatorische und prokoagulative Moleküle frei und exprimieren ihrerseits Entzündungsrezeptoren an ihrer Oberfläche [42]. Somit kann die Thrombozytenzahl als Biomarker bei CED angesehen werden, wobei nicht nur der Entzündungsvorgang als Trigger für die Produktion von Blutplättchen angesehen werden darf, sondern auch ein Eisenmangel, welcher bei CED-PatientInnen gehäuft auftritt.

Der Referenzbereich für die Thrombozytenzahl liegt für Erwachsene bei zwischen 140×10^9 Zellen/l und 360×10^9 Zellen/l [36].

Es gibt auch Hinweise dafür, dass neben der Anzahl der Thrombozyten deren mittleres Volumen als Marker für die Krankheitsaktivität herangezogen werden könnte. Dieses verhält sich indirekt proportional zu CRP und BSG, die Ursache dafür ist jedoch noch nicht geklärt [43].

Serum-Antikörper

Antikörper, die im Serum von CED-PatientInnen detektierbar sein können, können in drei Gruppen eingeteilt werden: Autoantikörper, mikrobielle Antikörper und Peptid-Antikörper [44].

Autoantikörper sind Antikörper, welche ein körpereigenes Antigen binden. Die bekanntesten Antikörper dieser Gruppe, welche bei CED eine Rolle spielen, sind die anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies (ANCA). ANCA sind bei 20% bis 85% der Colitis ulcerosa- PatientInnen nachweisbar, jedoch nur bei 2% bis 28% der PatientInnen mit Morbus Crohn [45,46]. Weitere Autoantikörper, die bei CED nachweisbar sein können, sind die pankreatischen Antikörper (pancreatic antibodies, PAB, oder nach ihren Antigenen als anti-CUZD1/anti-GP2 benannt). PAB ist bei 20% bis 40% der Fälle von Morbus Crohn und bei 5% der Fälle von Colitis ulcerosa nachweisbar [47].

Unter dem Begriff mikrobielle Antikörper werden jene Antikörper zusammengefasst, welche gegen Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Pilze gerichtet sind. So sind beispielsweise anti-*Saccharomyces cerevisiae*-Antikörper (ASCA) Antikörper gegen Mannan, welches sich an der Zellwandoberfläche von Backhefe (*S. cerevisiae*) befindet. ASCA können bei 39% bis 69% der Morbus Crohn-PatientInnen und bei 5% bis 15% der PatientInnen mit Colitis ulcerosa positiv sein [48]. Weitere Vertreter dieser Gruppe von Antikörpern sind die neuen Anti-Glycan-Antikörper namens IgG Anti-Laminaribiosid Kohlenhydrat-Antikörper (ALCA), IgA Anti-Chitobiosid Kohlenhydrat-Antikörper (ACCA), und IgG Anti-Mannobiosid Kohlenhydrat-Antikörper (AMCA). Auch die Antigene dieser Antikörper sind Bestandteile der Zellwände von Mikroorganismen. ALCA und ACCA sind nur in 20% bis 40% der Fälle von Morbus Crohn und in 10% der Fälle von Colitis ulcerosa nachweisbar, es wird jedoch angedacht, diese Antikörper in Zukunft in der Diagnostik von Morbus Crohn in Kombination mit ASCA einzusetzen [44].

Als Peptid-Antikörper bezeichnet man Antikörper, welche gegen Peptide gerichtet sind. Saito et al. entdeckten vier verschiedene Peptide (cocktail multiple antigenic peptides, cocktail MAP), welche mit den Seren von Morbus Crohn-PatientInnen reagierten. Die Positivitätsrate für Morbus Crohn beträgt 55%, bei Colitis ulcerosa ist diese jedoch vernachlässigbar niedrig [49].

Da keiner der beschriebenen Antikörper eine hohe Sensitivität besitzt, können diese derzeit nur zusätzlich zu anderen diagnostischen Methoden und nicht als alleinige Diagnostik angewendet werden.

Darmspezifische Biomarker

Biomarker für die Überprüfung der Darmwandintegrität

Aufbau der Darmwand

Der Aufbau der Darmwand ist in Abbildung 2 illustriert.

Die innerste Schicht der Darmwand ist die Tunica mucosa, die Schleimhaut. Sie wird durch die Lamina epithelialis mucosae, die darunter liegende Lamina propria und die Lamina muscularis mucosae gebildet.

Unter der Schleimhaut befindet sich die Tela submucosa, eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, welche auch Fettzellen, größere Blut- und Lymphgefäße, sowie einen Nervenplexus, den Meixner-Plexus enthält.

Unterhalb der Tela submucosa liegt die Tunica muscularis, welche aus glatter Muskulatur aufgebaut und für die Peristaltik zuständig ist.

Die äußerste Schicht des Darms bildet das Peritoneum (Bauchfell) [50].

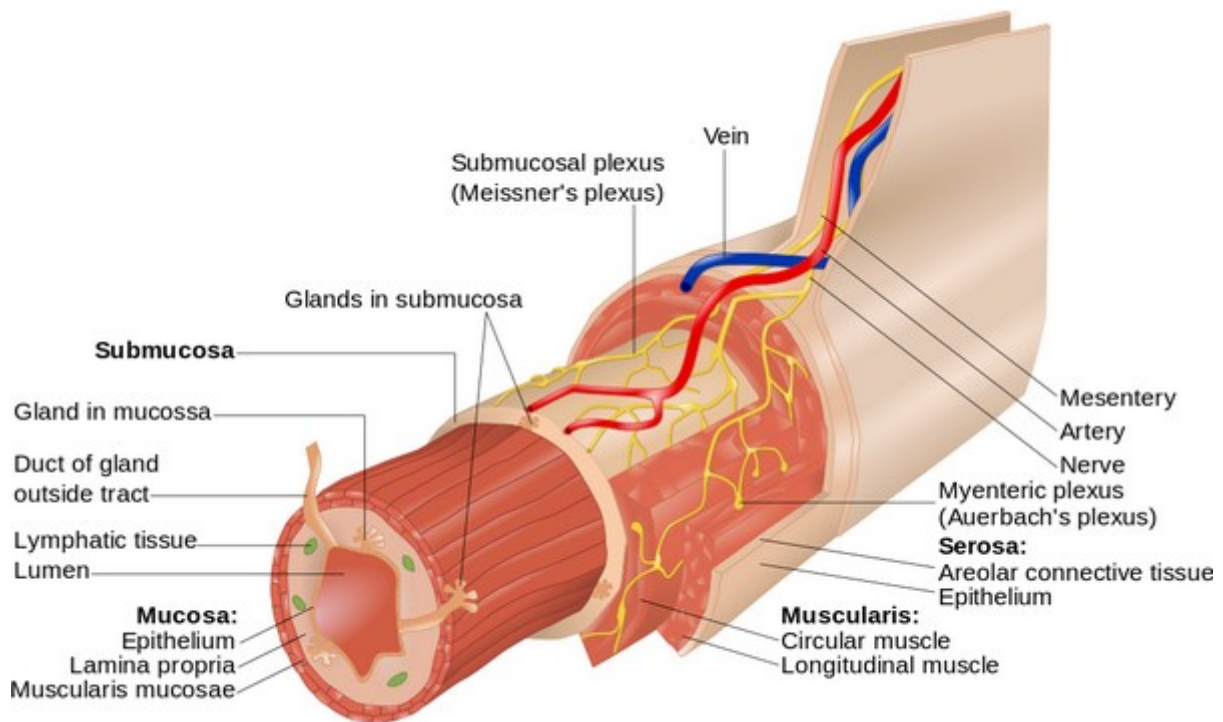


Abbildung 2: Aufbau der Darmwand

Quelle: Goran tek-en. "Layers of the Alimentary Canal". Wikimedia Commons (Internet).
 Veröffentlicht am 2.3.2014.
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/31/Layers_of_the_GI_Tract_english.svg.
 Abgerufen am 12.3.2017

Permeabilitätsmarker

Die Zellen der Lamina epithelialis der Darmschleimhaut, welche durch Tight-Junctions miteinander verbunden sind, erfüllen eine Barrierefunktion. Ist diese gestört, können luminal Antigenen, Darmbakterien und deren zum Teil toxische Stoffwechselprodukte in den Blutkreislauf gelangen (Abbildung 3) [51].

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2. erwähnt, spielt eine erhöhte Darmwandpermeabilität bei der Pathogenese von CED eine wichtige Rolle. Es zeigte sich, dass einige proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Interferon- γ zu einer erhöhten Permeabilität von Tight-Junctions führen und Zellen des intestinalen Schleimhautepithels in die Apoptose leiten können [52–54]. Neben den Tight-Junctions spielt auch der Schleim, welcher in den Becherzellen des Schleimhautepithels gebildet wird und dieses bedeckt, eine zentrale Rolle in der epithelialen Barrierefunktion [55]. In einem Experiment, bei dem Mäuse untersucht wurden, denen das *Muc2*-Gen, welches für die Schleimbildung essentiell ist,

fehlte, zeigten sich bei diesen Mäusen eine deutlich reduzierte Schleimschicht, erhöhte Level proinflammatorischer Zytokine sowie die Entwicklung einer spontanen Colitis [56].

Ein weiterer Faktor, welcher zur Barrierefunktion des Schleimhautepithels beiträgt, ist die Bildung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) durch spezialisierte Epithelzellen, die Paneth'schen Körnerzellen. Die AMPs befinden sich dann in der Schleimschicht und hindern Bakterien daran, das Epithel zu durchdringen und mit den darunterliegenden Immunzellen zu interagieren [55].

Ist die Integrität des Schleimhautepithels gestört, ist dessen Barrierefunktion gegenüber luminalen Antigenen nicht mehr gegeben. Als Folge dessen kommt es zur Auseinandersetzung des körpereigenen Immunsystems mit diesen Antigenen, was schließlich in einer Entzündungsreaktion resultiert [57].

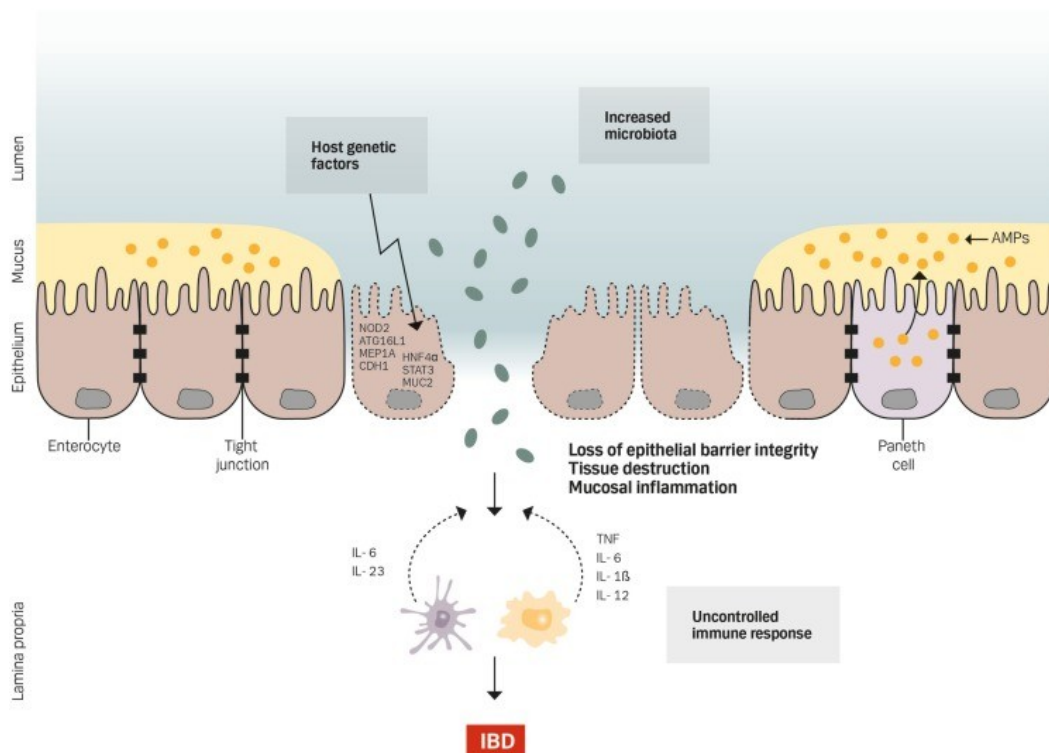


Abbildung 3: Pathogenese einer erhöhten Darmwandpermeabilität bei CED

Die Lamina epithelialis der Darmschleimhaut, deren Zellen durch Tight Junctions miteinander verbunden und von einer Schleimschicht bedeckt sind, bildet eine Barriere gegenüber luminalen Antigenen. Genetische Faktoren sowie proinflammatorische Zytokine führen zu einer Störung der Darmwandpermeabilität, was eine mukosale Entzündungsreaktion hervorruft.

Quelle: Coskun M. *Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease*. *Front Med*. 2014;1:24

Die erhöhte Darmwandpermeabilität bei CED kann man sich in der Diagnostik derer zunutze machen. Um den Permeabilitätsgrad festzustellen, und in weiterer Folge dadurch auf den Grad der Entzündung zu schließen, können Tests angewendet werden, bei denen Probemoleküle wie beispielsweise Laktulose oral eingenommen und nach einer festgelegten Zeitspanne quantitativ im Urin bestimmt werden [58,59]. Aufgrund der überaus aufwändigen Harnsammlung und unzuverlässiger Ergebnisse werden diese Tests in der klinischen Routine derzeit nicht eingesetzt.

β-D-Glukan

An der Universitätsklinik für Innere Medizin des LKH Graz wurden bei einigen PatientInnen mit entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Werte von β-D-Glukan beobachtet.

β-D-Glukan ist ein Polysaccharid, bei dem die D-Glukose-Bausteine β-glykosidisch miteinander verbunden sind (vergleiche Abbildung 4). Dieses Polysaccharid ist Bestandteil der Zellwände von Pflanzen (wie beispielsweise Roggen und Weizen) und Pilzen (wie etwa *S.cerevisiae*). In der Medizin wird es als Biomarker zur Diagnose invasiver Pilzkrankungen eingesetzt. Hierbei gilt ein Wert von 80pg/ml als positiv.

β-D-Glukan ist in diversen Lebensmitteln enthalten, als Beispiele seien Bier, Kefir, Kombucha und auch Speisepilze genannt. Es wird über eine intakte Darmschleimhaut nicht aufgenommen.

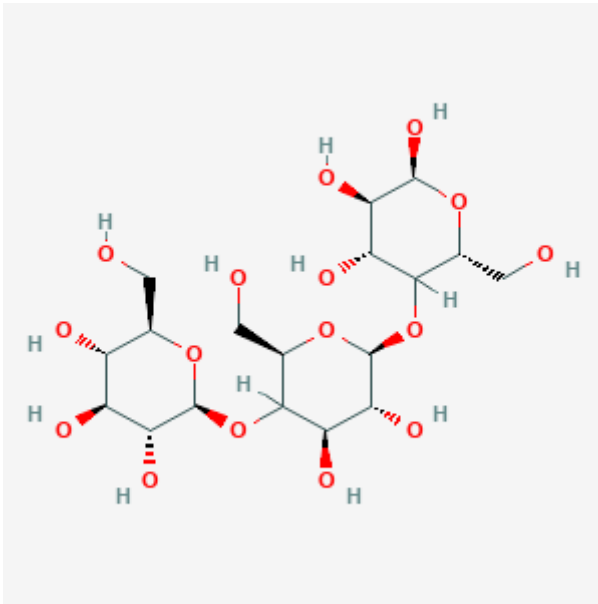


Abbildung 4: Strukturformel von β -D-Glukan

Quelle: *beta-Glucan* | C₁₈H₃₂O₁₆ - PubChem [Internet]. [zitiert 2. Mai 2017]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439262#section=Top>

Aus den oben erwähnten klinischen Beobachtungen ergab sich die Idee, β -D-Glukan als potentiellen Permeabilitätsmarker zu untersuchen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die β -D-Glukan-Konzentration im Serum von PatientInnen mit CED, sowie von gesunden Vergleichspersonen ermittelt.

D-Laktat

Liegt eine Störung der intestinalen Barrierefunktion vor, können Bestandteile oder Stoffwechselprodukte von Bakterien, welche normalerweise nur im Darmlumen zu finden sind, im Plasma oder Harn nachgewiesen werden [51]. Ein solcher Biomarker ist D-Laktat, ein Produkt der bakteriellen Fermentation.

Es existieren zwei Enantiomere von Laktat: L-Laktat, welches im Rahmen der anaeroben Glykolyse entsteht und somit physiologisch im Menschen auftritt, und D-Laktat, welches einerseits im Glyoxalase-System, einem Enzymsystem, aus Methylglyoxal entsteht und andererseits von intestinalen Bakterien produziert wird. Die Strukturformeln von D- und L-Laktat sind in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

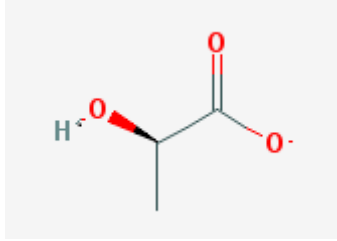


Abbildung 5: Strukturformel von D-Laktat

Quelle: (2R)-2-hydroxypropanoate | C₃H₅O₃⁻ - PubChem [Internet]. [zitiert 2. Mai 2017].

Verfügbar unter:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5460179#section=Top>

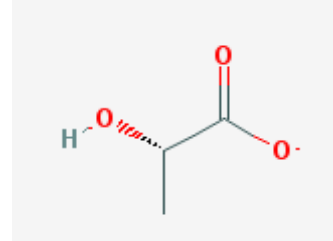


Abbildung 6: Strukturformel von L-Laktat

L-lactate | C₃H₅O₃⁻ - PubChem [Internet]. [zitiert 2. Mai 2017]. Verfügbar unter:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5460161#section=Top>

Physiologisch wird D-Laktat von den Darmbakterien zu Acetat abgebaut. Deshalb trägt jenes D-Laktat, welches im Darmlumen produziert wird, nicht signifikant zum D-Laktat-Spiegel bei, welcher im Blut und/oder Harn gemessen werden kann [60]. Unter pathologischen Umständen kann jedoch der systemische D-Laktat-Spiegel, durch eine erhöhte bakterielle Produktion dessen, stark ansteigen. Bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa, Darmischämie und Appendizitis wurden erhöhte D-Laktat-Spiegel bereits nachgewiesen [61–63]. Im Rahmen eines Kurzdarmsyndroms kann es sogar zu einer D-Laktat-Azidose mit neurologischen Symptomen wie Verwirrtheit, zerebellärer Ataxie, Amnesien und verwaschener Sprache kommen [60].

In dieser Diplomarbeit wird die D-Laktat-Konzentration im Harn von PatientInnen, welche an einer CED leiden, mit jenen von gesunden Vergleichspersonen verglichen.

I-FABP

Ein Biomarker, welcher spezifisch für die Schädigung von Enterozyten ist, ist das „intestinal fatty acid binding protein“ (I-FABP). Es handelt sich dabei um ein intrazelluläres Protein mit einem niedrigen Molekulargewicht von 15kDa, welches eine Rolle beim Transport und Metabolismus von Fettsäuren spielt [64]. Kommt es, beispielsweise durch Entzündungsvorgänge im Rahmen einer CED, zu einer Enterozytenschädigung, wird I-FABP freigesetzt und ist im Harn, sowie im Serum detektierbar. Wiercinska-Drapalo et al. zeigten eine Korrelation zwischen dem Schweregrad einer Colitis ulcerosa und I-FABP [65]. Eine Studie von Sarikaya et al. lieferte ähnliche Ergebnisse für PatientInnen mit Morbus Crohn [65,66].

Citrullin

Ein weiteres Molekül, welches als spezifischer Marker für eine Schädigung, beziehungsweise einen Verlust von Enterozyten dienen kann, ist Citrullin. Es handelt sich dabei um eine Aminosäure, welche in den Enterozyten des Dünndarms aus anderen Aminosäuren, allen voran Glutamin, gebildet wird [67]. Der Normwert für Citrullin im Plasma von gesunden Individuen liegt zwischen 30 und 50 µmol/L [68]. Liegt der gemessene Wert darunter, kann dies ein Hinweis für eine Abnahme der Enterozytenzellmasse sein, wie sie beispielsweise bei einem Kurzdarmsyndrom, bei Darmerkrankungen, welche mit einer Zottenatrophie einhergehen, bei einer stattgefundenen Dünndarmtransplantation oder beim Morbus Crohn auftreten kann [69].

Immunologische Marker für eine Darmwandentzündung

Jede Störung der intestinalen Barrierefunktion führt aufgrund der bakteriellen Besiedelung des Darms früher oder später zu einer Entzündungsreaktion. Dabei kommt es zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, welche in die Mukosa einwandern [70]. Produkte des granulozytären Zellstoffwechsels werden dabei in das intestinale Lumen abgegeben und sind somit im Stuhl detektierbar. Solche immunologischen Marker sind folglich spezifisch für die Detektion von entzündlichen Darmerkrankungen [51].

Der vielversprechendste Biomarker aus dieser Gruppe ist Calprotectin, ein Protein aus dem Zytosol der neutrophilen Granulozyten. Das Protein wird im Rahmen der Zellaktivierung oder des Zelltods freigesetzt und hat antiproliferative, antimikrobielle und immunmodulierende Funktionen [70,71].

Das fäkale Calprotectin wird im klinischen Alltag zur Evaluierung der Krankheitsaktivität im Rahmen von Verlaufskontrollen angewendet.

Der Referenzbereich liegt bei Personen jedes Alters und Geschlechts bei <50 µg/g [72].

2 Methoden

2.1 Studiendesign und Zeitraum

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine prospektive Single-Center-Studie, welche im Zeitraum vom 4. April 2016 bis 30. Januar 2017 an der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie des LKH-Universitätsklinikum Graz durchgeführt wurde.

Im Rahmen der Studie wurden Blut- und Harnproben von PatientInnen mit einer CED sowie gesunden ProbandInnen gesammelt und anschließend analysiert und mit klinischen Scores sowie weiteren Laborwerten verglichen.

2.2 Ethikvotum

Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt (EK-Nummer 28-224). Alle Personen, die an der Studie teilnahmen, unterschrieben nach erfolgter Aufklärung eine Einwilligungserklärung.

2.3 PatientInnenkollektiv und gesunde Vergleichspersonen

Bei den in die Studie eingeschlossenen PatientInnen handelt es sich um Personen über 18 Jahren, welche an der klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie des LKH-Universitätsklinikums vorstellig wurden und an Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn leiden.

Ausschlusskriterien stellten das Vorliegen einer Schwangerschaft, einer akuten Infektion, einer schweren Grunderkrankung wie etwa einer Tumorerkrankung, sowie eine regelmäßige Einnahme von Arzneimitteln aus der Gruppe der NSAR (nicht-steroidale Antirheumatika) dar.

Von den 42 PatientInnen, welche ursprünglich in die Studie eingeschlossen wurden, wurden 3 Patienten im Nachhinein ausgeschlossen, da bei einem Patienten eine Tumorerkrankung festgestellt wurde, eine Patientin nicht an einer CED, sondern einer anderen Darmerkrankung litt und die Proben einer Patientin nicht im Labor einlangten.

Von den übrigen 39 PatientInnen besteht bei 14 eine Colitis ulcerosa und bei 25 ein Morbus Crohn.

In die Kontrollgruppe wurden 44 Personen über 18 Jahre aufgenommen, welche an keiner CED leiden. Die Ausschlusskriterien entsprachen jenen der PatientInnengruppe.

Bei einer Probandin aus dieser Gruppe stellte sich heraus, dass sie bereits zum Zeitpunkt der Probenabnahme an einem schweren Atemwegsinfekt gelitten hatte, bei einer weiteren Probandin bestand eine Schwangerschaft. Beide wurden aus der Studie ausgeschlossen, die Anzahl der Probanden in der Vergleichsgruppe beträgt somit 42.

2.4 Studienablauf

Bei den ProbandInnen fanden eine Blutabnahme, sowie das Sammeln einer Harnprobe statt.

Die Analyse der Proben erfolgte am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Graz.

Im Rahmen der Studie wurde bei den ProbandInnen aus der Patientengruppe β -D-Glukan, Citrullin und I-FABP aus dem Serum, sowie D-Laktat aus dem Harn bestimmt. Die aktuellen Werte von BSG, CRP, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Hämoglobin-Wert (Hb) sowie der aus dem Stuhl bestimmte Calprotectin-Wert wurden, soweit vorhanden, retrospektiv dem Krankenhausinformationssystem open Medocs entnommen.

Ebenfalls retrospektiv mittels Befunden, Arztbriefen und Anamnesebögen erfolgte die Erhebung von Informationen über die Krankheitsaktivität (Einteilung in Remission oder aktive Erkrankung), die Lokalisation der Entzündung (Dünndarm und/oder Dickdarm), durchgeführte Darmoperationen, das Vorliegen einer perianal disease (PAD) bei PatientInnen mit Morbus Crohn, eventuelle Begleiterkrankungen und aktuelle medikamentöse Therapien. Aus diesen Informationen wurde für PatientInnen mit Colitis ulcerosa der partielle Mayo-Score und für PatientInnen mit Morbus Crohn der Harvey-Bradshaw-Index errechnet.

Bei den ProbandInnen der Kontrollgruppe wurden β -D-Glukan, Citrullin, i-FABP, BSG, CRP, Leukozyten- und Thrombozytenzahl und Hb-Wert aus dem Serum sowie die D-Laktat-Konzentration im Harn bestimmt.

2.5 Labormethodik

Die Blut- und Harnproben wurden in das Klinische Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik des LKH Graz transferiert. Die Bestimmungen von β -D-Glukan aus dem Serum, sowie D-Laktat aus dem Harn erfolgten im Rahmen der Routine.

β -D-Glukan wurde mittels „automated protocol Fungitell assay“ (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA) analysiert [73]. Die Bestimmung von D-Laktat erfolgte laut Herstellerangaben mittels „D-Lactic Acid assay procedure, Megazyme“. Für diese Studie wurde D-Laktat aus dem Harn bestimmt. Damit die Harnkonzentration keine Störgröße darstellt, wurde D-Laktat in der Einheit $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin angegeben. Für die Bestimmung der restlichen Parameter wurden Aliquote tiefgefroren. Daraus erfolgte die Bestimmung von I-FABP mittels ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) Tests („Human FABP2/I-FABP, R&D Systems“) nach den Herstellerangaben. Citrullin wurde ebenfalls aus tiefgefrorenen Proben mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) aus Serumproben bestimmt.

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde das Programm R Version 3.3.2. verwendet. Es wurde von allen getesteten Biomarkern der Medianwert, sowie das Intervall, in dem sich die Werte befanden, erhoben. Gruppenvergleiche wurden mittels einer Version des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests, die besonders für kleine Stichproben geeignet ist, durchgeführt [74]. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zusammenhänge zwischen β -D-Glukan, Citrullin, D-Laktat und I-FABP mit dem CRP und dem partiellen Mayo-Score beziehungsweise dem Harvey-Bradshaw-Index wurden mittels der Spearman-Korrelationsanalyse ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Demografische und klinische Daten

Tabelle 6 beschreibt die demografischen Merkmale der in die Studie eingeschlossenen Personen. Für die PatientInnengruppe liefert sie darüber hinaus Informationen über deren Erkrankungen und Therapien.

Die PatientInnengruppe umfasste annähernd gleich viele Frauen wie Männer (49% vs. 51%), die Kontrollgruppe umfasste geringfügig mehr Frauen als Männer (62% vs. 38%).

Das Medianalter der PatientInnen war um 6 Jahre höher als jenes der Kontrollpersonen.

36% der PatientInnengruppe machten Personen mit Colitis ulcerosa aus, 64% waren Personen mit Morbus Crohn.

Bei 54% der PatientInnen befand sich die Erkrankung im aktiven Stadium, 46% befanden sich in Remission.

Von den PatientInnen mit Colitis ulcerosa wiesen 43% eine Krankheitsausdehnung auf, welche nach der Montréal-Klassifikation als E2, und 57% eine Ausdehnung, welche als E3 bezeichnet werden kann.

Bei 31% der PatientInnen hatte zu einem früheren Zeitpunkt eine chirurgische Resektion von Darmanteilen stattgefunden.

Zur Therapie der CED erhielten 10% der PatientInnen Steriode, 18% 5-Aminosalicylsäure (5-ASA), 3% Tacrolimus, 36% Immunsuppressiva, 54% Biologika und 18% eine Kombinationstherapie aus Immunsuppressiva und Biologika. 8% erhielten keinerlei medikamentöse Therapie.

Tabelle 6: Demografische und klinische Daten

Die Daten repräsentieren, falls nicht anders angegeben, die Absolutzahlen plus Prozentanteile in Klammern.

Parameter	CED-PatientInnen	Kontrollen
n	39	42
Geschlecht w/m	19 (49)/20 (51)	26 (62)/16 (38)
Medianalter in Jahren (Range)	35 (19-73)	29 (20-58)
Erkrankung		
CU	14 (36)	
Lokalisation		
E1	0 (0)	
E2	6 (43)	
E3	8 (57)	
MC	25 (64)	
Lokalisation		
Dünndarm	14 (56)	
Colon	3 (12)	
Dünndarm + Colon	8 (32)	
PAD	5 (20)	

Tabelle 7: Daten zur Krankheitsaktivität, stattgefundenen Operationen und der aktuellen Therapie

Die Daten repräsentieren, falls nicht anders angegeben, die Absolutzahlen plus Prozentanteile in Klammern.

* medianer Score, Range in Klammern

**Als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Therapeutika

Parameter	PatientInnen mit MC	PatientInnen mit CU
Krankheitsaktivität		
Remission	13 (52)	5 (36)
aktive Erkrankung	12 (48)	9 (64)
Harvey-Bradshaw-Index*	3 (0-12)	
Mayo-Score*		3 (0-8)
OP		
Ileozökalresektion	12 (31)	0 (0)
Dünndarmteilresektion	6 (15)	
Hemicolektomie	1 (3)	
Colektomie mit Ileostoma	2 (5)	
	3 (8)	
Therapie		
Steroide**	2 (8)	2 (14)
5-ASA**	3 (12)	4 (29)
Immunsuppressiva**	9 (36)	5 (36)
Tacrolimus**	0 (0)	1 (7)
Biologika**	14 (56)	7 (50)
Immunsuppressiva + Biologika	4 (16)	3 (21)
keine	2 (8)	1 (7)

3.2 Routineparameter

Die aus den Messergebnissen errechneten Medianwerte der für CED etablierten Biomarker BSG, CRP und Calprotectin, sowie Thrombozyten- und Leukozytenzahlen und Hämoglobin sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 zusammengefasst.

3.2.1 Vergleich der PatientInnengruppe mit der Kontrollgruppe

Wie in Tabelle 8 und Abbildung 7a ersichtlich ist, lagen die Werte der BSG der PatientInnengruppe deutlich über denen der Kontrollgruppe [9 (2-59) vs. 3 (1-13)]. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0$).

Auch das CRP war in der PatientInnengruppe signifikant höher als in der Vergleichsgruppe [2,1 (<0,6-242,9) vs. 0,7 (<0,6-25,6), $p = 0,001$]. Hierbei fällt vor allem der deutlich höhere Maximalwert in der PatientInnengruppe ins Auge (Abbildung 7b).

Die Leukozytenzahl war bei den PatientInnen signifikant höher als bei den Kontrollpersonen [7,8 (4,5-21,0) vs. 6,3 (4,4-14,8), $p = 0,031$], bei der Thrombozytenzahl konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden [284 (178-628) vs. 265 (164-352), $p = 0,084$].

Das Hb war bei den PatientInnen niedriger als bei den Kontrollen [13,6 (10,1-16,5) vs. 14,0 (12,1-16,5)], mit einem p -Wert von 0,249 dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen jedoch nicht statistisch signifikant.

Der errechnete Medianwert von Calprotectin in der PatientInnengruppe betrug 355, der minimale Wert befand sich unter der Nachweisgrenze von 20, der maximale Wert bei 3075. Für die Kontrollgruppe wurden keine Calprotectinwerte erhoben.

Tabelle 8: Vergleich der Routineparameter zwischen PatientInnen und Kontrollen

Die Daten repräsentieren die Medianwerte plus die Intervalle in Klammern

*von 3 ProbandInnen der jeweiligen Gruppe kein Probenmaterial vorhanden

**von 5 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

***von 14 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

****von 1 ProbandIn kein Probenmaterial vorhanden

Parameter	Einheit	PatientInnen	n	Kontrollen	n	p
BSG	mm	9 (2-59)	36*	3 (1-13)	37**	0
CRP	mg/l	2,1 (<0,6-242,9)	39	0,7 (<0,6-25,6)	39*	0,001
Calprotektin	µg/g	355 (<20-3075)	25***			
Hb	g/dl	13,6 (10,1-16,5)	39	14,0 (12,1-16,5)	41****	0,249
Leukozyten	x10 ⁹ /l	7,8 (4,5-21,0)	39	6,3 (4,4-14,8)	41****	0,031
Thrombozyten	G/l	284 (178-628)	39	265 (164-352)	41****	0,084

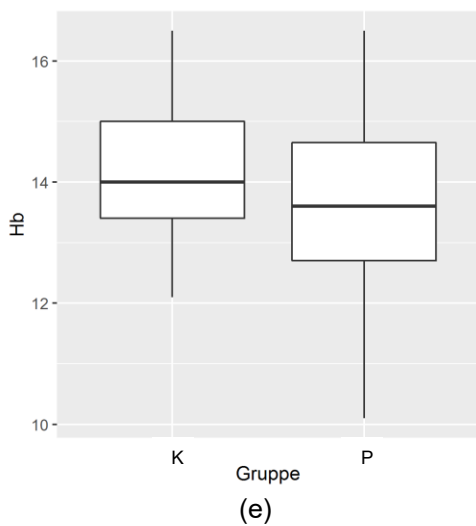
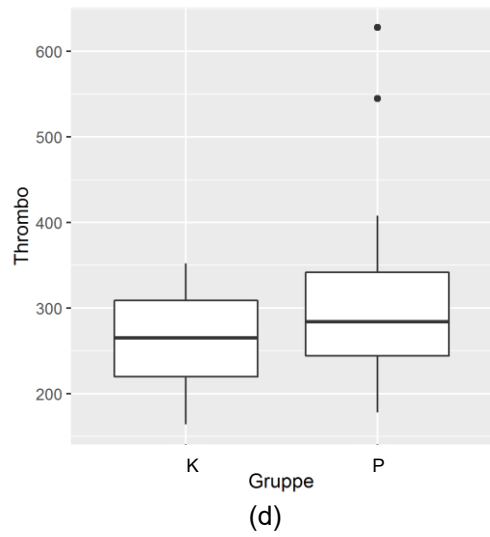
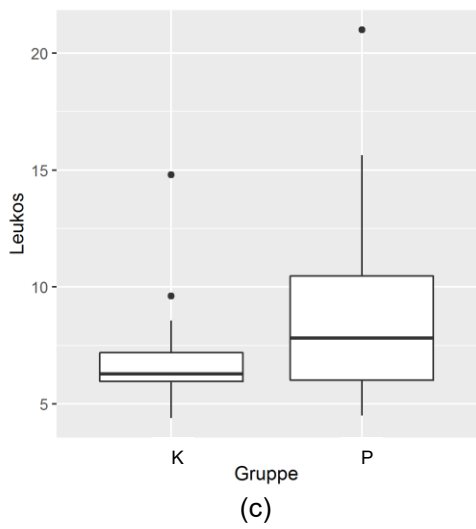
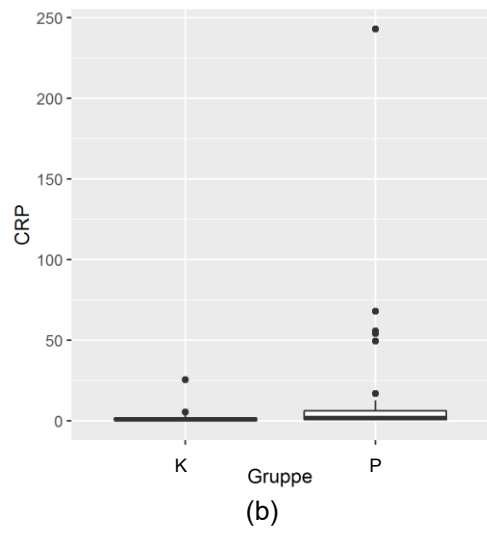
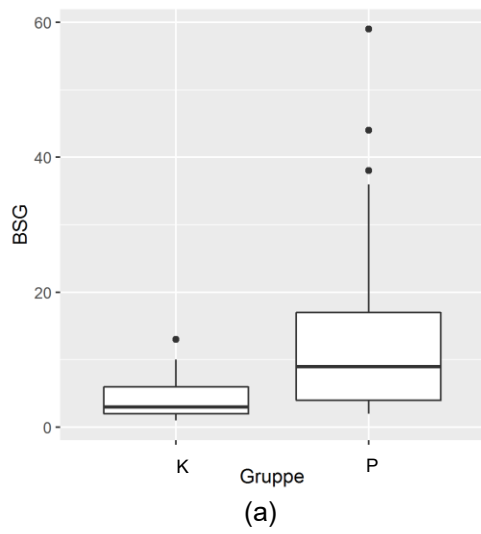


Abbildung 7 a-e: Grafische Darstellung der Routineparameter bei CED-PatientInnen (P) und Kontrollen (K). (a) Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) in mm. (b) C-reaktives Protein (CRP) in mg/l. (c) Leukozytenzahl in $10^9/l$. (d) Thrombozytenzahl in G/l. (e) Hämoglobin (Hb) in g/dl.

3.2.2 Vergleich von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Tabelle 9 zeigt die Werte der Routineparameter für die PatientInnen mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

Die BSG war bei Morbus Crohn höher als bei Colitis ulcerosa [9 (2-59) vs. 5 (2-38)], mit einem p-Wert von 0,253 ist dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant. Beim CRP zeigte sich ein umgekehrtes Bild- hier waren die Werte bei Colitis ulcerosa höher als bei Morbus Crohn [3,1 (<0,6-54,3) vs. 1,8 (<0,6-242,9)], dieser Unterscheid ist ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p = 0,807$). Der Maximalwert von 242,9 wurde bei einer Person, welche an Morbus Crohn erkrankt ist, gemessen.

Die Leukozytenzahl [8,4 (5,0-21,0) vs. 6,5 (4,5-15,6)] sowie die Thrombozytenzahl [284 (178-545) vs. 273 (194-628)] waren bei den PatientInnen mit Morbus Crohn höher als bei jenen mit Colitis ulcerosa, da der p-Wert für beide Parameter größer als 0,05 ist, ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

Ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte für den Hb-Wert festgestellt werden [273 (194-628)] vs. 284 (178-545), $p = 0,518$].

Das Calprotectin war bei Colitis ulcerosa erheblich höher als bei Morbus Crohn [1265 (108-3075)] vs. 114 (<20-2124)] ($p = 0,005$).

Tabelle 9: Vergleich der Routineparameter zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Die Daten repräsentieren die Medianwerte plus die Intervalle in Klammern.

* von 1 ProbandIn kein Probenmaterial vorhanden

** von 2 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

*** von 4 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

**** von 10 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

Parameter	Einheit	CU	n	MC	n	p
BSG	mm	5 (2-38)	13*	9 (2-59)	23**	0,253
CRP	mg/l	3,1 (<0,6-54,3)	14	1,8 (<0,6-242,9)	25	0,807
Calprotectin	µg/g	1265 (108-3075)	10***	114 (<20-2124)	15****	0,005
Hb	g/dl	13,4 (11,1-16,3)	14	13,7 (10,1-16,5)	25	0,518
Leukozyten	$\times 10^9/l$	6,5 (4,5-15,6)	14	8,4 (5,0-21,0)	25	0,173
Thrombozyten	G/l	273 (194-628)	14	284 (178-545)	25	0,638

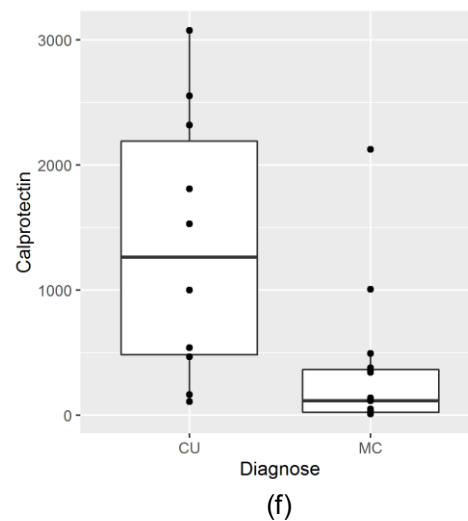
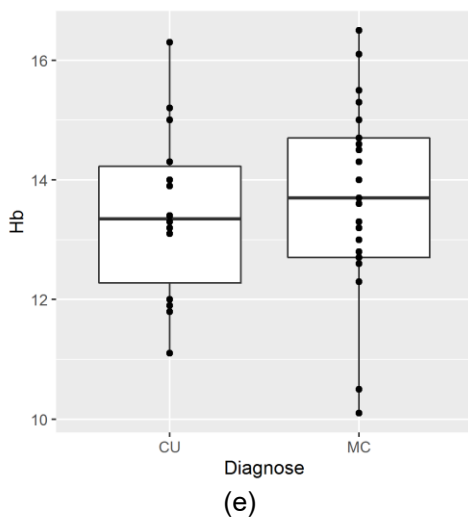
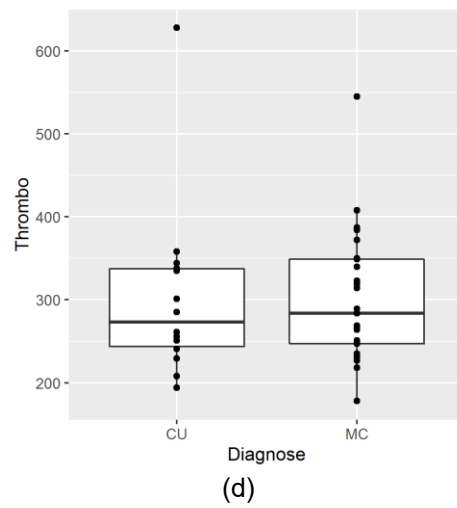
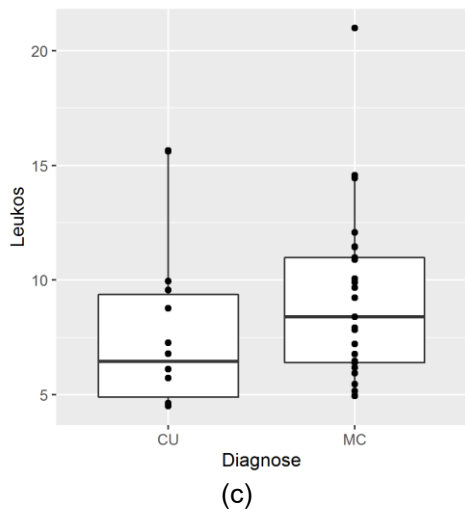
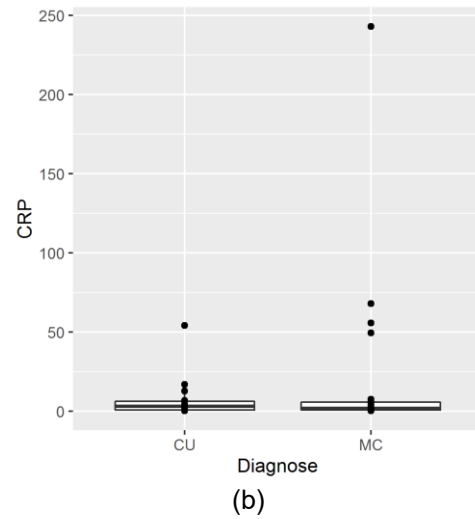
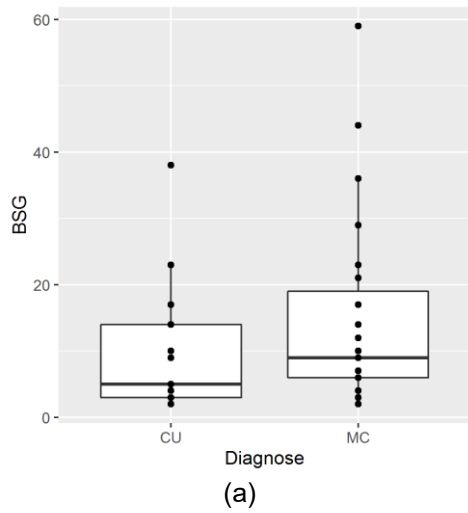


Abbildung 8 a-f: Grafische Darstellung der Routineparameter bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC). (a) Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) in mm. (b) C-reaktives Protein (CRP) in mg/l. (c) Leukozytenzahl in $10^9/l$. (d) Thrombozytenzahl in G/l. (e) Hämoglobin (Hb) in g/dl. (f) Calprotectin in $\mu g/g$.

3.2.3 Korrelationsanalysen der Routineparameter mit klinischen Scores

Tabelle 11 enthält die Spearman-Korrelationskoeffizienten, welche die Stärke der Korrelation der Routineparameter mit dem partiellen Mayo-Score, sowie dem Harvey-Bradshaw-Index angeben.

Der Korrelationskoeffizient r_{Sp} nimmt Werte zwischen -1 und +1 an, wobei Werte >0 einen positiven Zusammenhang und Werte <0 einen negativen Zusammenhang beschreiben. Je näher r_{Sp} bei 0 liegt, desto schwächer ist der Zusammenhang, je dichter r_{Sp} bei -1 oder +1 liegt, desto stärker ist er. Ist $r_{Sp} = 0$, liegt kein Zusammenhang vor [75]. Es gibt in der Literatur keine einheitlichen Richtlinien zur Interpretation der Korrelationskoeffizienten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Spearman-Korrelationskoeffizienten wurden wie in Tabelle 10 angegeben, bewertet.

Tabelle 10: Interpretation des Spearman-Korrelationskoeffizienten r_{Sp}

Quelle: Hehn medistat-U von. Medizinische Statistik | Datenanalyse & Statistische Beratung für Fachbereiche der Medizin [Internet]. [zitiert 3. Mai 2017]. Verfügbar unter: <https://www.medistat.de/glossar/korrelation-assoziation/rangkorrelationskoeffizient-nach-spearman/>

Bewertung	
$0,0 \leq r_{Sp} \leq 0,2$	kein bis geringer Zusammenhang
$0,2 < r_{Sp} \leq 0,5$	schwacher bis mäßiger Zusammenhang
$0,5 < r_{Sp} \leq 0,8$	deutlicher Zusammenhang
$0,8 < r_{Sp} \leq 1,0$	hoher bis perfekter Zusammenhang

Für die BSG konnte mit dem Harvey-Bradshaw-Index eine schwache positive Korrelation ($r_{Sp} = 0,209$) festgestellt werden, mit dem partiellen Mayo-Score eine schwach negative ($r_{Sp} = -0,323$).

Das CRP korrelierte etwas stärker mit dem Harvey-Bradshaw-Index ($r_{Sp} = 0,326$), mit dem partiellen Mayo-Score konnte keine Korrelation festgestellt werden.

Die stärkste Korrelation eines Routineparameters mit einem klinischen Score stellte jene von Calprotectin mit dem partiellen Mayo-Score dar ($r_{Sp} = 0,506$). Mit dem Harvey-Bradshaw-Index korrelierte Calprotectin mäßig ($r_{Sp} = 0,349$).

Der Hb-Wert korrelierte positiv mit dem partiellen Mayo-Score ($r_{Sp} = 0,317$) und negativ mit dem Harvey-Bradshaw-Index ($r_{Sp} = -0,317$).

Die Leukozytenzahl sowie die Thrombozytenzahl korrelierten jeweils schwach mit dem partiellen Mayo-Score, mit dem Harvey-Bradshaw-Index konnte für beide Parameter keine Korrelation nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Korrelationsanalysen der Routineparameter mit dem partiellen Mayo-Score, sowie dem Harvey-Bradshaw-Index

Die Daten repräsentieren die jeweiligen Spearman- Korrelationskoeffizienten rSp

	Partieller Mayo-Score	Harvey-Bradshaw-Index
BSG	-0,323	0,292
CRP	-0,071	0,326
Calprotectin	0,506	0,349
Hb	0,317	-0,317
Leukozyten	0,176	0,055
Thrombozyten	0,261	0,048

3.3 β -D-Glukan

Die gemessenen Werte für β -D-Glukan sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Keine(r) der ProbandInnen überschritt den vom Hersteller angegebenen Referenzwert von 80 pg/ml. Die Nachweisgrenze für β -D-Glukan betrug 15,38 pg/ml. In der PatientInnengruppe wurden bei 18%, in der Kontrollgruppe bei 12% Werte über der Nachweisgrenze von 15,38 gemessen. Bei einer Person aus der Kontrollgruppe wurde ein Wert von 2206,96 pg/ml ermittelt, hierbei handelte es sich jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Verunreinigung der Probe, da man diese Werte nur im Rahmen einer Pilzsepsis beobachten würde, die Versuchsperson jedoch zum Zeitpunkt der Probenabnahme und danach völlig beschwerdefrei war. Dieser Wert wurde aufgrund dessen von der statistischen Auswertung exkludiert.

Wie in Tabelle 12 ersichtlich, lag der Median der gemessenen β -D-Glukan-Werte sowohl in der PatientInnen- als auch in der Kontrollgruppe unter der Nachweisgrenze. Der Maximalwert von 61,44 wurde bei einer Person aus der Kontrollgruppe gemessen (vergleiche Tabelle 12 und Abbildung 9).

Die Korrelationsanalyse zeigte bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa eine schwache bis mäßige Korrelation von β -D-Glukan mit dem CRP (rSp = 0,287) und dem Calprotectin (rSp = 0,321). Bei PatientInnen mit Morbus Crohn konnte nur eine

schwache Korrelation festgestellt werden (vergleiche Tabelle 13). Mit dem Harvey-Bradshaw-Index für Morbus Crohn und dem Mayo-Score für Colitis ulcerosa zeigte sich keine Korrelation (vergleiche Tabelle 13).

Tabelle 12: Vergleich von β -D-Glukan bei Kontrollen, CED-PatientInnen, Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC)

Angaben in in pg/ml

p für Kontrollen vs. CU = 0,238

p für Kontrollen vs. MC = 0,972

*verunreinigte Probe bei 1 ProbandIn

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
n	41*	39	14	25
Median	<15,38	<15,38	<15,38	<15,38
Intervall	<15,38-61,44	<15,38-54,83	<15,38-47,13	<15,38-54,83
p		0,485		0,269

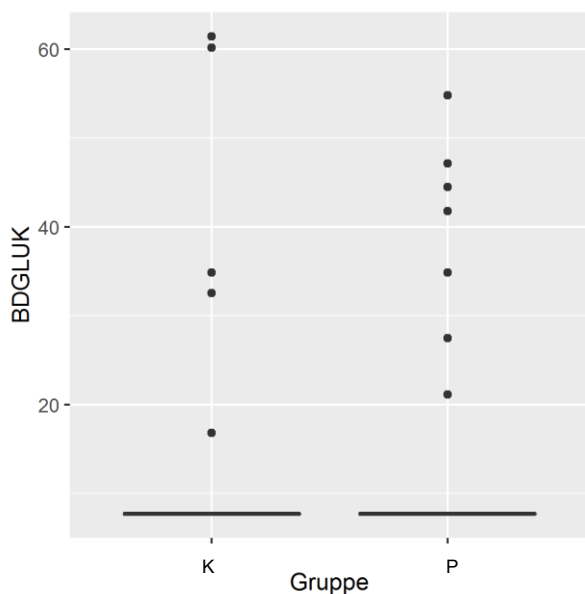


Abbildung 9: β -D-Glukan (BDGLUK) in pg/ml bei CED-PatientInnen (P) und Kontrollen (K)

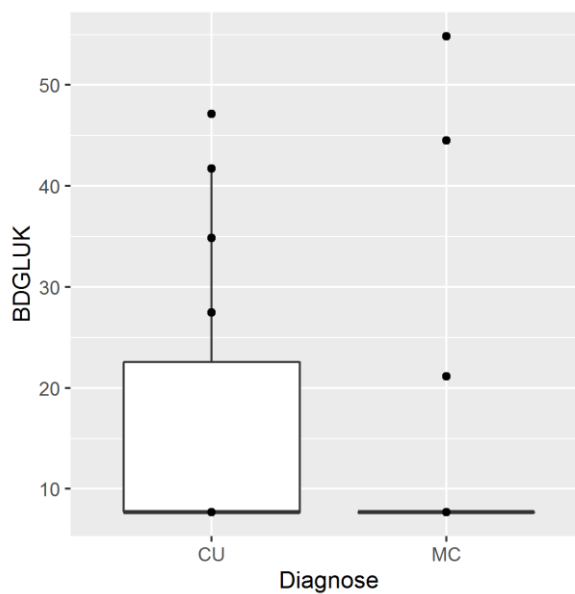


Abbildung 10: β -D-Glukan (BDGLUK) in pg/ml bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC)

Tabelle 13: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan mit Calprotectin, CRP sowie der Krankheitsaktivität

Die Daten repräsentieren die jeweiligen Spearman- Korrelationskoeffizienten rSp.

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
Calprotectin		0,102	0,321	-0,172
CRP	0,076	0,222	0,287	0,196
Partieller Mayo-Score			-0,038	
Harvey-Bradshaw-Index				0

3.4 Citrullin

Tabelle 14, sowie die Abbildungen 11 und 12 zeigen die Messergebnisse für Citrullin. In der PatientInnengruppe lag der Medianwert unter jenem der Kontrollgruppe [25,98 (6,92-52,57) vs. 28,71 (11,76-46,41)]. Dieser Unterschied ist jedoch mit einem p-Wert von 0,253 nicht statistisch signifikant.

Innerhalb der PatientInnengruppe war der Medianwert bei Personen mit Morbus Crohn geringfügig niedriger als bei jenen mit Colitis ulcerosa [25,70 (18,27-52,57) vs. 27,96 (6,92-38,48)]. Ein p-Wert von 0,699 zeigt aber, dass dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ist. Der niedrigste Wert von 18,27 μ mol/l wurde bei einer Patientin mit einem akuten Schub einer Pancolitis ulcerosa gemessen.

Mittels deskriptiver Statistik wurde analysiert, ob ein Unterschied im Serum-Citrullin zwischen PatientInnen mit einer aktiven Erkrankung und PatientInnen in Remission bestehe. Wie in Tabelle 15 und Abbildung 13 verdeutlicht wird, zeigten sich bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa im akuten Stadium deutlich niedrigere Serum-Citrullinspiegel als bei PatientInnen mit derselben Erkrankung in Remission. Bei PatientInnen mit Morbus Crohn fiel diese Differenz in den Citrullinspiegeln etwas schwächer aus (vergleiche Tabelle 15 und Abbildung 14).

Weiters wurden die Citrullinspiegel von PatientInnen mit Morbus Crohn, bei welchen zu einem früheren Zeitpunkt eine Resektion von Darmabschnitten stattgefunden hatte, mit jenen PatientInnen verglichen, bei welchen keine solche Operation erfolgt war. Tabelle 16 und Abbildung 15 zeigen höhere mediane Citrullinspiegel bei operierten PatientInnen als bei nicht operierten.

Die Korrelationsanalysen, welche in Tabelle 17 und Abbildungen 21 bis 23 dargestellt sind, zeigten in der PatientInnengruppe eine mittelstarke negative Korrelation zwischen Citrullin und dem CRP (rSp = -0,415). Interessanterweise bestand hier aber eine stärkere negative Korrelation bei PatientInnen mit Colitis

ulcerosa als bei jenen mit Morbus Crohn ($r_{Sp} = -0,726$ vs. $r_{Sp} = -0,215$). Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Korrelationsanalyse mit dem Calprotectin, auch hier bestand eine stärkere negative Korrelation zwischen Citrullin und Calprotectin bei Patienten mit Colitis ulcerosa als bei jenen mit Morbus Crohn ($r_{Sp} = -0,750$ vs. $r_{Sp} = -0,223$).

Citrullin korrelierte in geringem Maße mit dem Harvey-Bradshaw-Index ($r_{Sp} = -0,194$), mit dem Mayo-Score konnte keine Korrelation festgestellt werden ($r_{Sp} = -0,061$).

Tabelle 14: Vergleich von Serum-Citrullin bei Kontrollen, CED-PatientInnen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Angaben in $\mu\text{mol/l}$

p für Kontrollen vs. CU = 0,617p für Kontrollen vs. MC = 0,216

* von 2 ProbandInnen der jeweiligen Gruppe kein Probenmaterial vorhanden

**von 1 ProbandIn der jeweiligen Gruppe kein Probenmaterial vorhanden

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
n	40*	37*	13**	24**
Median	28,71	25,98	27,96	25,70
Intervall	11,76-46,41	6,92-52,57	6,92-38,48	18,27-52,57
p		0,253		0,699

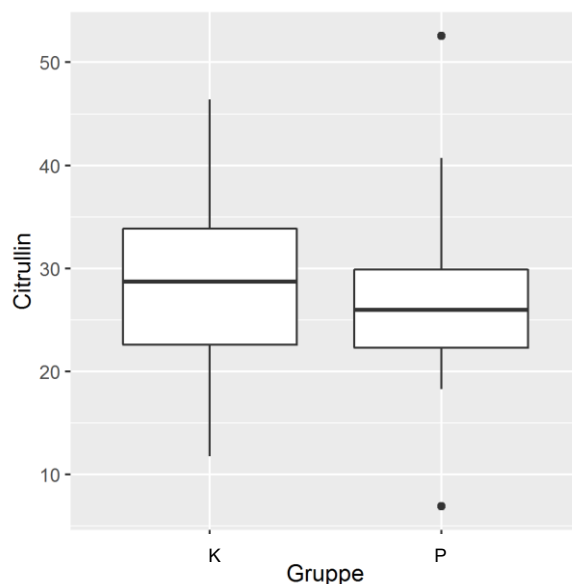


Abbildung 11: Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei CED-PatientInnen (P) und Kontrollen (K)

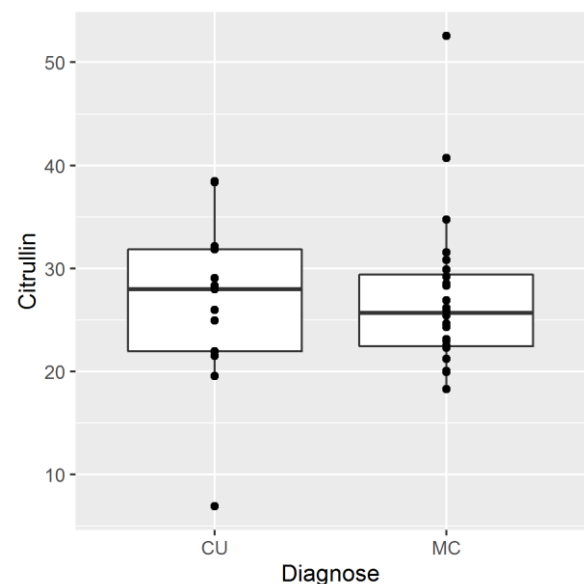


Abbildung 12: Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC)

Tabelle 15: Vergleich von Serum-Citrullin bei PatientInnen mit aktiver Colitis Ulcerosa (CU) und Colitis Ulcerosa in Remission, sowie PatientInnen mit aktivem Morbus Crohn (MC) und PatientInnen mit Morbus Crohn in Remission

Angaben in $\mu\text{mol/l}$

	PatientInnen mit CU		PatientInnen mit MC	
	aktive Erkrankung	Remission	aktive Erkrankung	Remission
n	9	5	12	13
Median	25,98	30,45	24,33	25,95
Range	6,92-38,48	21,54-38,38	18,27-40,72	19,95-52,57

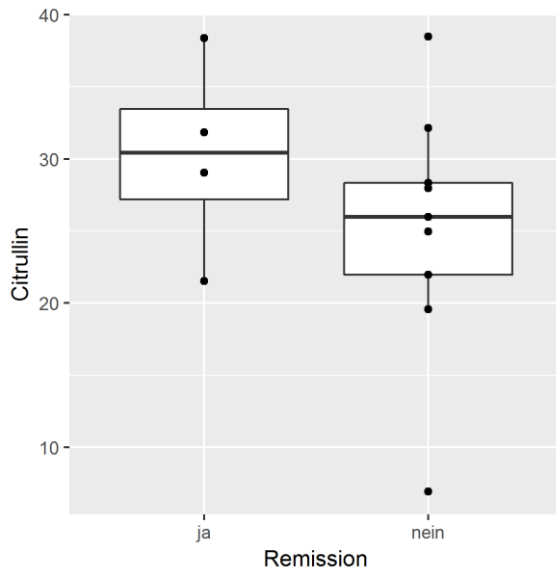


Abbildung 13: Unterschiede im Serum-Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei PatientInnen mit Colitis Ulcerosa in Remission (Remission-ja) und mit aktiver Erkrankung (Remission-nein)

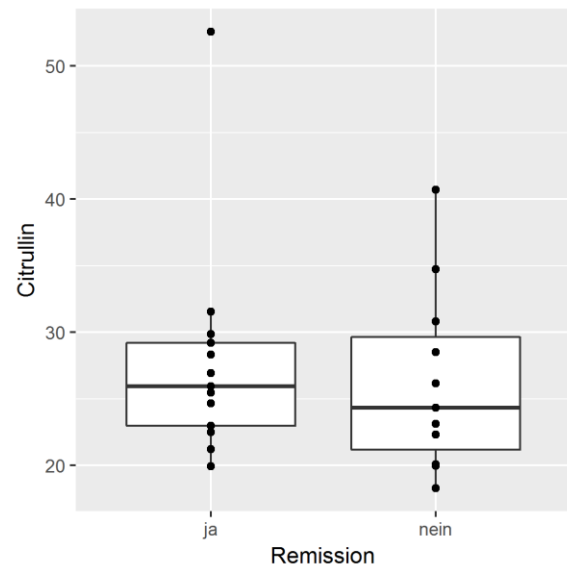


Abbildung 14: Unterschiede im Serum-Citrullin in $\mu\text{mol/l}$ bei PatientInnen mit Morbus Crohn in Remission (Remission-ja) und mit aktiver Erkrankung (Remission-nein)

Tabelle 16: Vergleich von Serum-Citrullin von PatientInnen mit Morbus Crohn (MC), bei welchen eine Resektion von Darmabschnitten stattgefunden hat (mit OP), mit jenen, bei denen keine solche Operation stattgefunden hat (ohne OP) Angaben in $\mu\text{mol/l}$

	PatientInnen mit MC	
	ohne OP	mit OP
n	13	11
Median	24,65	28,50
Range	18,27-31,56	19,95-52,57

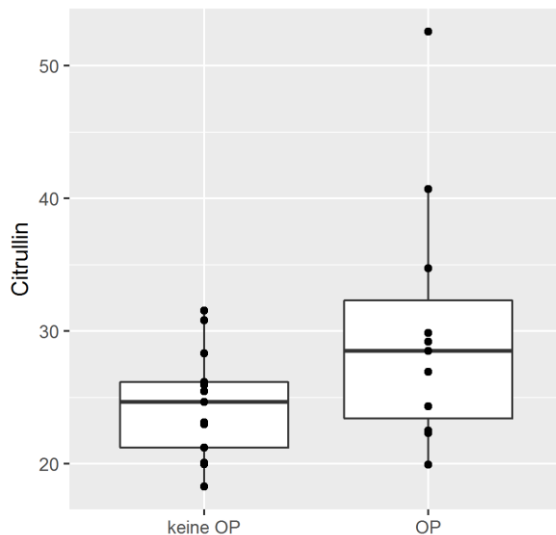


Abbildung 15: Unterschiede im Serum-Citrullin in µmol/l bei PatientInnen mit Morbus Crohn, bei denen eine Resektion von Darmabschnitten stattgefunden hat (OP) und jenen, bei denen keine solche Operation durchgeführt wurde (keine OP)

Tabelle 17: Korrelationsanalysen von Citrullin mit Calprotectin, CRP und der Krankheitsaktivität

Die Daten repräsentieren die jeweiligen Spearman- Korrelationskoeffizienten rSp.

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
Calprotectin		-0,312	-0,750	-0,223
CRP	-0,152	-0,415	-0,762	-0,215
Partieller Mayo-Score			-0,061	
Harvey-Bradshaw-Index				-0,194

D-Laktat

In Tabelle 18 und den Abbildungen 16 und 17 sind die im Harn von PatientInnen und Kontrollen gemessenen D-Laktat-Werte zusammengefasst. Die Medianwerte sind in der PatientInnengruppe höher als in der Kontrollgruppe [8,5 (2,0-35,0) vs. 5,5 (0,0-37,0)]. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant, da der p-Wert bei 0,828 liegt. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch zwischen ProbandInnen mit Colitis ulcerosa und jenen mit Morbus Crohn festgestellt werden [9,5 (3,0-35,0) vs. 4,0 (2,0-10,0), p = 0,041].

Jene PatientInnen mit Colitis ulcerosa in Remission hatten nur geringfügig niedrigere D-Laktat-Werte als jene mit Colitis ulcerosa im akuten Stadium [9,0 (3,0-35,0) vs. 10,0 (4,0-23,0)] (vergleiche Tabelle 19 und Abbildung 18).

Mit dem CRP, sowie dem Calprotectin konnte in keiner der untersuchten Gruppen eine Korrelation festgestellt werden (vergleiche Tabelle 20, sowie Abbildungen 21

und 22). Mit den Aktivitätsindices ergaben sich sogar schwach negative Korrelationen (vergleiche Tabelle 20 und Abbildung 23).

Tabelle 18: Vergleich von D-Laktat im Harn bei Kontrollen, PatientInnen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Angaben in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin

p für Kontrollen vs. CU = 0,245

p für Kontrollen vs. MC = 0,224

*Für 18 Proben konnte kein Ergebnis errechnet werden, da die Werte in mg/dl unterhalb der Nachweisgrenze von 0,6 liegen.

Von 1 ProbandIn kein Probenmaterial vorhanden

Von 1 Probe konnte kein Ergebnis errechnet werden, da der Kreatininspiegel aus unbekannter Ursache nicht erhoben wurde

** Für 15 Proben konnte kein Ergebnis errechnet werden, da die Werte in mg/dl unterhalb der Nachweisgrenze von 0,6 liegen.

Von 8 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

*** Für 1 Probe konnte kein Ergebnis errechnet werden, da der Wert in mg/dl unterhalb der Nachweisgrenze von 0,6 liegt.

Von 3 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

**** Für 14 Proben konnte kein Ergebnis errechnet werden, da die Werte in mg/dl unterhalb der Nachweisgrenze von 0,6 liegen.

Von 5 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
n	22*	16**	10***	6****
Median	5,5	8,5	9,5	4,0
Range	0,0-37,0	2,0-35,0	3,0-35,0	2,0-10,0
p		0,828		0,041

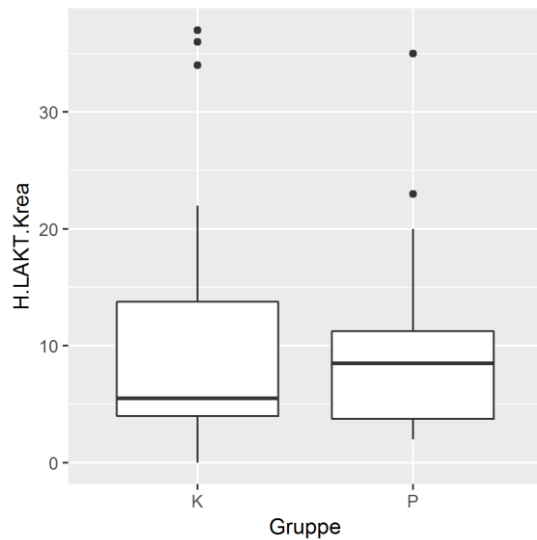


Abbildung 16: D-Laktat (H.LAKT.Krea) in µmol/mmol Kreatinin im Harn von PatientInnen (P) und Kontrollen (K)

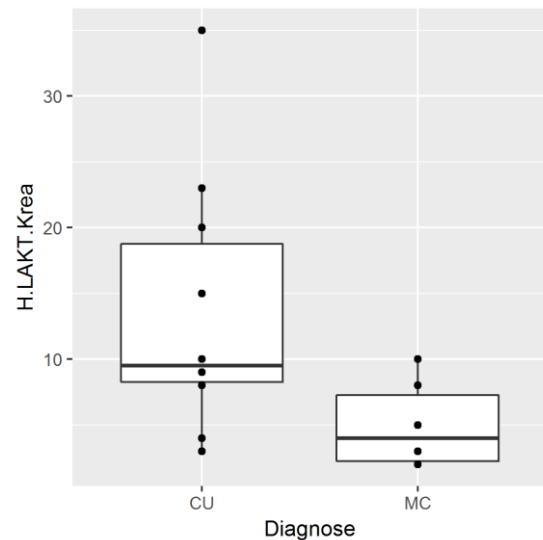


Abbildung 17: D-Laktat (H.LAKT.Krea) in µmol/mmol Kreatinin im Harn bei Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC)

Tabelle 19: Vergleich von D-Laktat im Harn bei PatientInnen mit aktiver Colitis ulcerosa (CU) und PatientInnen von CU in Remission

Angaben in µmol/mmol Kreatinin

	PatientInnen mit CU	
	aktive Erkrankung	Remission
n	7	3
Median	10,0	9,0
Range	4,0-23,0	3,0-35,0

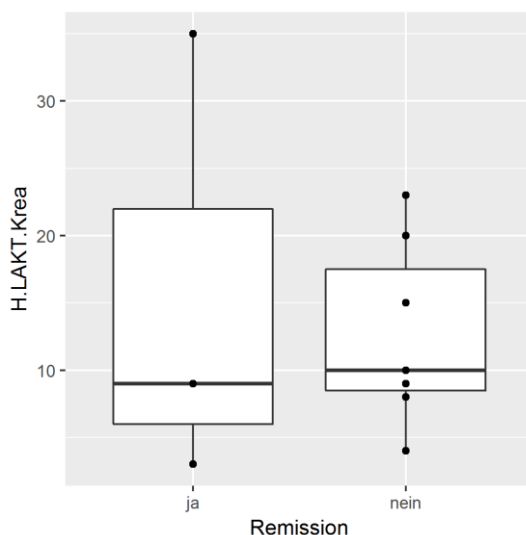


Abbildung 18: Unterschiede im D-Laktat in µmol/mmol Kreatinin im Harn von PatientInnen mit aktiver Colitis ulcerosa (Remission-nein), sowie PatientInnen mit Colitis ulcerosa in Remission (Remission-ja)

Tabelle 20: Korrelationsanalysen von D-Laktat mit Calprotectin, CRP sowie der Krankheitsaktivität

Die Daten repräsentieren die jeweiligen Spearman- Korrelationskoeffizienten rSp.

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
Calprotectin		-0,078	-0,6	-0,522
CRP	0,156	0,068	0,030	0,145
Part. Mayo-Score			-0,285	
Harvey-Bradshaw-Index				-0,324

3.5 I-FABP

Wie in Tabelle 21 und Abbildung 19 ersichtlich ist, wurde im Rahmen dieser Studie kein signifikanter Unterschied der I-FABP-Werte zwischen PatientInnen und Kontrollen festgestellt [382,4 (177,6-1192,2) vs. 394,7 (92,7-811,1), $p = 0,070$]. Innerhalb der PatientInnengruppe ist der Medianwert bei ProbandInnen mit Colitis ulcerosa höher als bei jenen mit Morbus Crohn [455,8 (311,3-967,4 vs. 345,55 (177,6-1192,2)], mit einem p-Wert von 0,279 ist dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant (vergleiche Tabelle 21 und Abbildung 20). Der maximale Wert von 1192,2 pg/ml wurde bei einem Patienten mit Morbus Crohn gemessen, welcher sich nach einer Ileozökalresektion unter einer Therapie mit TNF- α -Blockern in Remission befindet.

Die Spearman-Korrelationsanalyse ergab für PatientInnen mit Colitis ulcerosa keinen Zusammenhang zwischen I-FABP und dem CRP ($r_{Sp} = 0,041$), bei Morbus Crohn zeigte sich eine schwache Korrelation ($r_{Sp} = 0,253$) (vergleiche Tabelle 22, sowie Abbildung 21). Die Korrelation mit dem Calprotectin fiel bei Morbus Crohn ebenfalls geringfügig stärker aus als bei Colitis ulcerosa ($r_{Sp} = 0,236$ vs. $r_{Sp} = 0,150$) (vergleiche Abbildung 22).

Mit den erhobenen Aktivitätsscores bestand keine Korrelation (vergleiche Tabelle 22 und Abbildung 23).

Tabelle 21: Vergleich von I-FABP bei CED-PatientInnen, Kontrollen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Angaben in pg/ml

p für Kontrollen vs. CU = 0,056

p für Kontrollen vs. MC = 0,070

* von 3 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

** von 2 ProbandInnen kein Probenmaterial vorhanden

*** von 1 ProbandIn kein Probenmaterial vorhanden

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
n	39*	37**	13***	24****
Median	394,7	382,4	455,8	345,55
Range	92,7-811,1	177,6-1192,2	311,3-967,4	177,6-1192,2
p		0,070		0,279

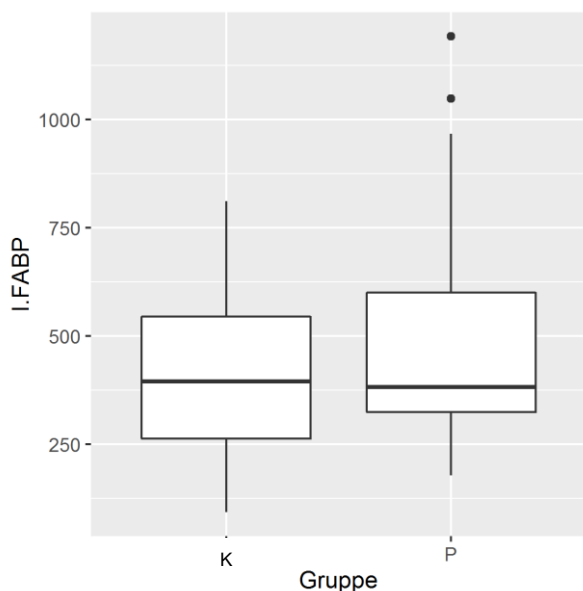


Abbildung 19: I-FABP in pg/ml bei CED-PatientInnen und Kontrollen

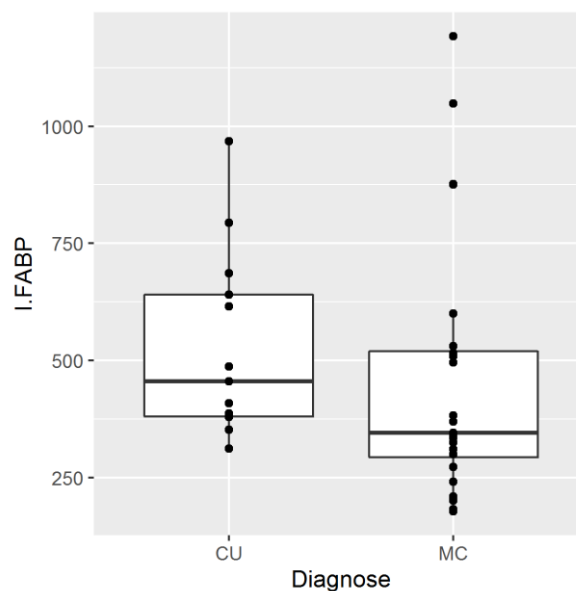


Abbildung 20: I-FABP in pg/ml bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Tabelle 22: Korrelationsanalysen von I-FABP mit Calprotectin, CRP sowie der Krankheitsaktivität

Die Daten repräsentieren die jeweiligen Spearman-Korrelationskoeffizienten rSp.

	Kontrollen	CED-PatientInnen	CU	MC
Calprotectin		0,376	0,150	0,236
CRP	-0,029	0,160	0,041	0,253
Part. Mayo-Score			0,166	
Harvey-Bradshaw-Index				-0,001

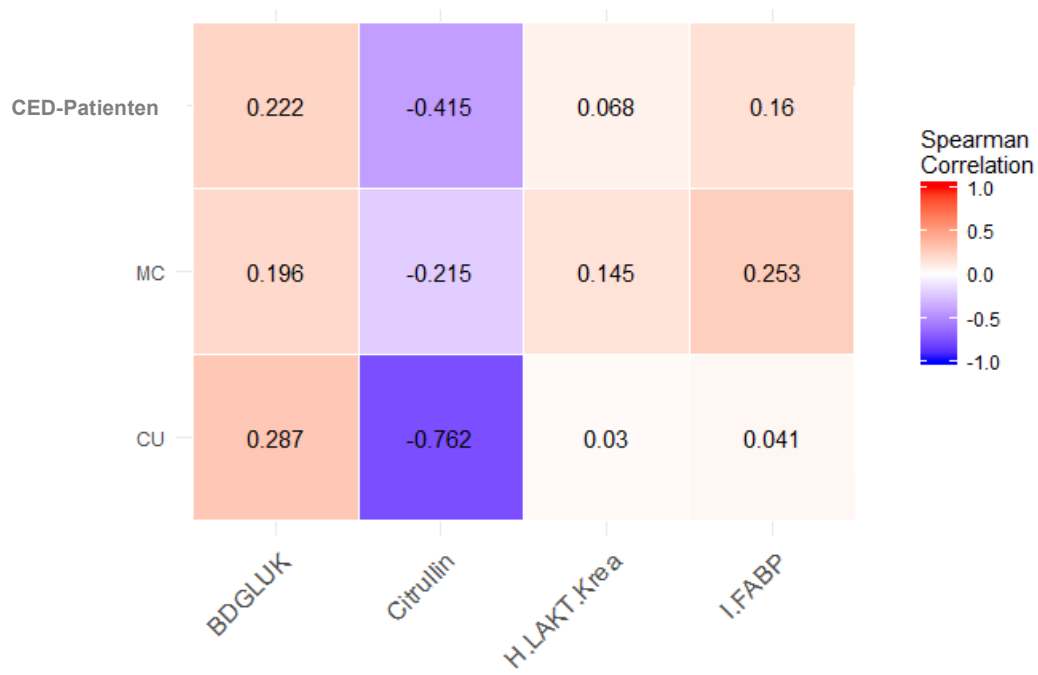


Abbildung 21: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan (BDGLUK), Citrullin, D-Laktat im Harn (H.LAKT.Krea) und I-FABP mit CRP

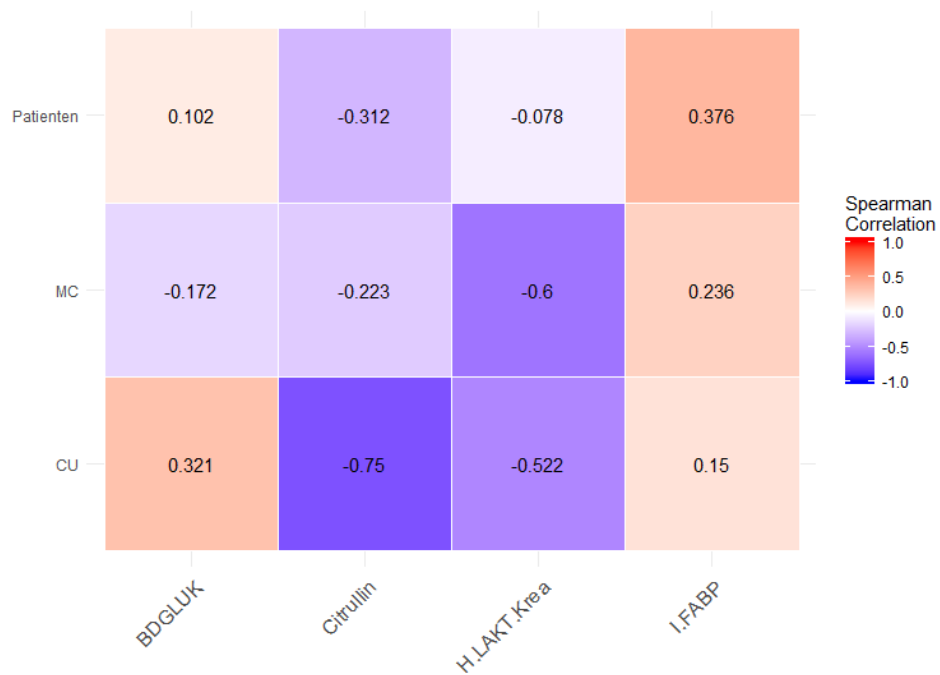


Abbildung 22: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan (BDGLUK), Citrullin, D-Laktat im Harn (H.LAKT.Krea) und I-FABP mit Calprotectin

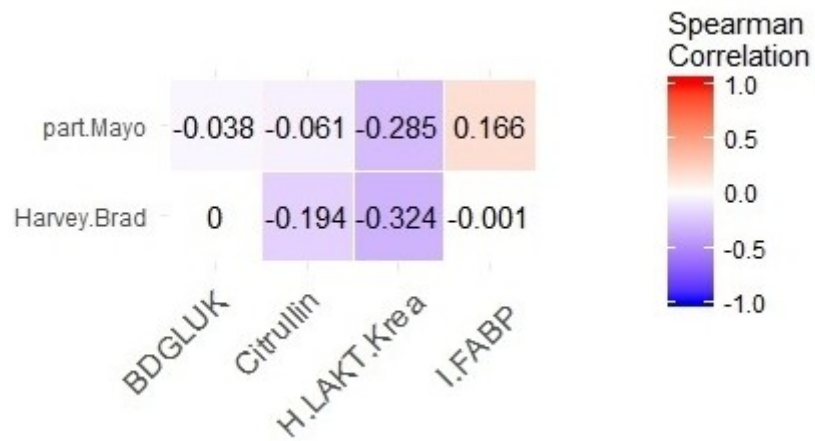


Abbildung 23: Korrelationsanalysen von β -D-Glukan (BDGLUK), Citrullin, D-Laktat im Harn (H.LAKT.Krea) und I-FABP mit dem partiellen Mayo-Score, sowie dem Harvey-Bradshaw-Index

4 Diskussion

Je rascher, akkurater und zielgerichteter die Diagnostik bei CED erfolgt, desto eher kann mittels individueller therapeutischer Interventionen die Lebensqualität der PatientInnen verbessert und eventuelle Langzeitkomplikationen verhindert werden.

Biomarker, welche aus Blut-, Harn- oder Stuhlproben von PatientInnen analysiert werden, spielen hierbei eine entscheidende Rolle, da sie simple, kostengünstige, risikolose und präzise diagnostische Mittel darstellen.

Die derzeit in der klinischen Praxis als Biomarker für CED verwendeten Laborparameter sind vorwiegend CRP, BSG und Calprotectin. Da jeder dieser Parameter Limitationen bezüglich seiner Anwendungsgebiete, Sensitivität und/oder Spezifität unterliegt, wurde in den letzten Jahren intensiv nach neuen, potenteren Biomarkern für CED geforscht.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die etablierten Biomarker CRP, BSG und Calprotectin, sowie die Parameter Citrullin, D-Laktat und I-FABP, welche in der Fachliteratur als potentielle Biomarker für CED diskutiert werden, bei CED-PatientInnen und gesunden Vergleichspersonen analysiert. Darüber hinaus wurde erstmals β -D-Glukan auf sein Potenzial als Permeabilitätsmarker für CED getestet.

Wie erwartet, waren die Werte von CRP und BSG in der PatientInnengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Ein unerwartetes Ergebnis stellt jedoch die Tatsache dar, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CRP-Werten von PatientInnen mit Colitis ulcerosa und jenen, welche an Morbus Crohn leiden, aufgezeigt werden konnte. Grundlage der ursprünglichen Annahme war, dass andere Studien ergaben, dass CRP bei Morbus Crohn in signifikant höherem Maße exprimiert wird als bei Colitis ulcerosa [76–78]. Die relativ geringen Fallzahlen dieser Studie könnten eine Erklärung dafür darstellen, dass kein signifikanter Unterschied in den CRP-Werten zwischen den beiden Erkrankungen festgestellt wurde.

Dass CRP weitaus stärker mit dem Harvey-Bradshaw-Index als mit dem Mayo-Score korreliert, kann insofern gedeutet werden, als dieser Biomarker besser für die Verlaufskontrolle bei PatientInnen mit Morbus Crohn geeignet ist, als für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes von Colitis ulcerosa.

Bezüglich der BSG wurde ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Erkrankungen aufgezeigt, diese Erkenntnis steht im Einklang mit einer Untersuchung von Saverymuttu et al., welche ebenfalls keinen Unterschied bezüglich der BSG zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa feststellte [78]. Dies impliziert, dass BSG kein zweckmäßiger Biomarker für die Unterscheidung zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sein kann.

Die in dieser Studie ermittelten Calprotectin-Werte der PatientInnen mit Colitis ulcerosa waren erheblich höher als jene von PatientInnen mit Morbus Crohn. Dieses Ergebnis korreliert mit der bereits in Kapitel 1.2.3.4. erwähnten Studie von Costa et al., im Zuge welcher der Calprotectin-Wert auf dessen Potenzial als prädiktiver Marker für das Auftreten eines neuerlichen Schubes bei CED-PatientInnen in Remission untersucht wurde, wobei ebenfalls höhere Calprotectin-Werte bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa als bei PatientInnen mit Morbus Crohn gemessen wurden [32]. Die Ursache für die niedrigeren Calprotectin-Werte bei PatientInnen mit Morbus Crohn im Vergleich zu PatientInnen mit Colitis ulcerosa könnte im unterschiedlichen Befallsmuster dieser beiden Erkrankungen liegen. Die Tatsache, dass der Dickdarm im Rahmen einer Colitis ulcerosa weitaus häufiger von der entzündlichen Reaktion betroffen ist als bei PatientInnen mit Morbus Crohn, könnte eine Erklärung für die höhere Calprotectinkonzentration im Stuhl von Colitis ulcerosa-PatientInnen darstellen.

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit ermittelten Spearman-Korrelationsparameter zeigten, dass Calprotectin stark mit dem partiellen Mayo-Score für Colitis ulcerosa, sowie in geringerem Ausmaß mit dem Harvey-Bradshaw-Index für Morbus Crohn korrelierte. Eine ähnliche Analyse von Jang et al. zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation von Calprotectin-Werten mit dem Mayo-Score, sowie mit dem CDAI [79].

Die Analysen des Hb-Werts, sowie der Thrombozytenzahl bei PatientInnen und Kontrollpersonen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen und auch innerhalb der PatientInnengruppe konnten keine Unterschiede zwischen den Hb-Werten beziehungsweise Thrombozytenzahlen zwischen den an Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Erkrankten festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass diese beiden Parameter keine geeigneten Marker für die Diagnostik bei CED sind.

Die Leukozytenzahlen waren bei den CED-PatientInnen signifikant höher als bei den Kontrollpersonen, zwischen Personen mit Colitis ulcerosa und jenen mit Morbus Crohn bestand jedoch kein Unterschied in den Leukozytenzahlen. Da dieser Parameter jedoch äußerst unspezifisch ist, ist sein Nutzen in der Diagnostik von CED relativ gering. Auch die relativ schwache Korrelation mit den klinischen Aktivitätsscores spricht gegen die Zweckdienlichkeit der Verwendung der Leukozytenzahl als Biomarker für CED.

Citrullin, welches aufgrund seines Vorkommens in den Epithelzellen des Dünndarms als Marker für die funktionelle Enterozytenmasse gilt, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht. PatientInnen, welche an einer CED erkrankt waren, zeigten zwar etwas niedrigere Citrullin-Werte als gesunde Kontrollpersonen, wobei dieser Unterschied sich jedoch als nicht statistisch signifikant herausstellte. Auch zwischen PatientInnen mit Colitis ulcerosa und Personen mit Morbus Crohn wurde kein signifikanter Unterschied in den Citrullin-Werten festgestellt. Es konnten allerdings deutliche negative Korrelationen von Citrullin mit dem CRP, sowie dem Calprotectin ermittelt werden. Diese Korrelationen waren in der Gruppe der PatientInnen mit Colitis ulcerosa stärker ausgeprägt als in jener mit Morbus Crohn. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu jener von Lee et al., welche für pädiatrische PatientInnen mit Morbus Crohn eine negative, für jene mit Colitis ulcerosa hingegen keine Korrelation zwischen Citrullin und CRP feststellten [80].

Für PatientInnen mit Colitis ulcerosa ergab diese Diplomarbeitsstudie, dass jene PatientInnen, deren Erkrankung zum Zeitpunkt der Blutabnahme aktiv war, deutlich niedrigere Citrullinspiegel im Serum aufwiesen als jene PatientInnen, welche sich in Remission befanden. Bei PatientInnen mit Morbus Crohn war dieser Unterschied weniger stark ausgeprägt. Kann diese Erkenntnis durch größer angelegte Studien bestätigt werden, könnte Citrullin in Zukunft als Biomarker in der Verlaufskontrolle von PatientInnen mit Colitis ulcerosa Anwendung finden.

Für I-FABP, welches in den letzten Jahren als potenzieller Marker für eine Enterozytenschädigung in Folge von ischämischen und entzündlichen Prozessen bekannt wurde, konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit kein Zusammenhang mit CED festgestellt werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den I-FABP-Werten aus dem Serum von CED-PatientInnen und von gesunden Kontrollen nachgewiesen, und auch zwischen den I-FABP-Werten von

PatientInnen mit Colitis ulcerosa und jenen mit Morbus Crohn bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Es bestand lediglich eine positive Korrelation von I-FABP mit CRP- sowie Calprotectin-Werten bei PatientInnen mit Morbus Crohn, nicht jedoch bei PatientInnen, welche an Colitis Ulcerosa leiden. Mit den für alle PatientInnen erhobenen klinischen Scores bestand keinerlei Korrelation. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu anderen Studien. Wiercinska-Drapalo et al. etwa konnten bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa erhöhte Werte von I-FABP in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität feststellen und Sarikaya et al. fanden eine positive Korrelation zwischen I-FABP und dem CDAI [65,66]. Eine Erklärung dafür, dass die Erkenntnisse aus dieser Diplomarbeitsstudie nicht mit jenen der oben genannten Autoren übereinstimmen, könnte sein, dass diese über deutlich höhere Fallzahlen verfügten. Mit den Erkenntnissen aus dieser Diplomarbeit stimmt jedoch der Nachweis einer positiven Korrelation von I-FABP mit CRP bei PatientInnen mit Morbus Crohn, welcher in der Studie von Sarikaya et al. ebenfalls mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,253 beschrieben wurde, überein [66].

Ein weiterer Parameter, welcher in dieser Studie analysiert wurde, ist D-Laktat. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen D-Laktat im Harn von CED-PatientInnen und gesunden ProbandInnen festgestellt werden. Die D-Laktat-Konzentration im Harn von PatientInnen mit Colitis ulcerosa war allerdings signifikant höher als in jenem von PatientInnen mit Morbus Crohn. Daraus lässt sich ableiten, dass D-Laktat einen sinnvollen Marker zur Unterscheidung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa darstellen könnte. Eine Erklärung dafür, dass die D-Laktat-Werte bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa höher sind als bei jenen mit Morbus Crohn, wäre, dass der Dickdarm stärker bakteriell besiedelt ist als der Dünndarm. Im Dünndarm befinden sich 10^3 bis 10^7 Mikroorganismen pro Gramm Kot, im Dickdarm sind es sogar weitaus mehr mit 10^{11} bis 10^{12} Mikroorganismen pro Gramm Kot [81]. Ist die Darmwandbarriere, etwa aufgrund einer Entzündungsreaktion, gestört, kann das von den Darmbakterien produzierte D-Laktat in den Blutkreislauf gelangen und ist somit im Serum oder Harn messbar. Ist der entzündete Darmabschnitt Teil des Colon, gelangt folglich mehr D-Laktat in die Zirkulation, als wenn ein Teil des Dünndarms betroffen ist.

Song et al. führten eine ähnliche Studie mit CED-PatientInnen und gesunden Kontrollpersonen durch, diese ergab jedoch ein umgekehrtes Bild. Die D-Laktat-

Werte der PatientInnen waren signifikant höher als jene der Kontrollgruppe. Weiters konnte zwischen PatientInnen mit Colitis ulcerosa und jenen mit Morbus Crohn kein Unterschied in der D-Laktat-Konzentration gemessen werden [63]. Ein bedeutender Unterschied zwischen der Studie von Song et al. und dieser Diplomarbeitstudie ist jedoch, dass D-Laktat dabei aus dem Plasma und nicht wie in dieser Studie aus dem Harn bestimmt wurde. Eine neuerliche Studie mit Plasma-D-Laktat wäre somit eine Möglichkeit, eine genauere Aussage über die Möglichkeiten von D-Laktat als Biomarker für CED treffen zu können.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde erstmals β -D-Glukan auf sein Potenzial als Biomarker bei CED getestet. Der Referenzwert von 80 pg/ml wurde bei keiner der gemessenen Proben überschritten, dabei handelt es sich jedoch um jenen Wert, ab dem von einer invasiven Pilzinfektion ausgegangen werden muss, da der Test normalerweise standardisiert in der Pilzdiagnostik angewendet wird. Somit hat der Referenzwert für diese Studie keine Bedeutung.

In der PatientInnengruppe wurden mehr β -D-Glukan-Werte über der Nachweisgrenze als in der Kontrollgruppe gemessen. Bei PatientInnen mit Colitis ulcerosa konnte eine schwache Korrelation mit CRP und Calprotectin ermittelt werden. Die Tatsache, dass β -D-Glukan über die Nahrung aufgenommen und somit abhängig von den eingenommenen Lebensmitteln in unterschiedlicher Menge im Darmlumen vorhanden ist, stellt eine Limitation bezüglich der Aussagekraft dieser Studie dar. Ein Belastungstest mit einem β -D-Glukan-haltigen Nahrungsmittel oder Getränk wäre eine weitere Möglichkeit, diese Substanz auf ihr Potenzial als Biomarker für CED zu testen.

Eine weitere Limitation dieser Studie stellen die relativ geringen Fallzahlen dar. Vor allem für die Analyse von D-Laktat waren nur von wenigen ProbandInnen Harnproben vorhanden.

Für die Korrelationsanalysen mit der Krankheitsaktivität standen in dieser Studie lediglich klinische Scores zur Verfügung. Diese sind stark vom subjektiven Krankheitsempfinden der PatientInnen beeinflusst. Einen interessanten Aspekt würde der Vergleich der im Rahmen dieser Studie analysierten Parameter mit endoskopischen Aktivitätsscores darstellen.

Bezüglich der statistischen Analysen stellt der Verzicht einer Korrektur für multiples Testen eine Limitation dar. Die in dieser Studie angeführten p-Werte

sollten daher nur als grobe Anhaltspunkte für eventuelle Gruppenunterschiede interpretiert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bisher kein Biomarker gefunden wurde, der spezifisch und sensitiv genug ist, um als einziger Parameter in der CED-Diagnostik Anwendung zu finden. Vielmehr existiert eine Reihe von Laborparametern, von denen jeder in bestimmten Situationen ein wertvolles diagnostisches Mittel darstellt. So eignet sich das CRP beispielsweise aufgrund seiner geringen Spezifität wenig zur Diagnosefindung bei Verdacht auf eine CED, dafür stellt es einen sinnvollen Parameter zur Verlaufskontrolle von PatientInnen mit Morbus Crohn dar. Calprotectin ist ein wertvoller Biomarker in der CED-Diagnostik und kann sowohl für die Erstdiagnose als auch bei Verlaufskontrollen wichtige Hinweise über die Krankheitsaktivität liefern. Es ist als Neutrophilenmarker im Stuhl spezifisch für entzündliche Prozesse im Darm, allerdings kann keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei einer Erhöhung von Calprotectin um eine CED oder einen Entzündungsvorgang anderer Ätiologie handelt.

Für die noch weniger erforschten Laborparameter wie I-FABP, Citrullin, D-Laktat und β -D-Glukan hat diese Studie interessante Ergebnisse geliefert, dennoch sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um eine verlässliche Aussage über deren Potenzial als Biomarker für CED treffen zu können. Die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte Citrullin, welches vor allem in der Verlaufskontrolle von PatientInnen mit Colitis ulcerosa angewendet werden könnte.

Laborparameter, welche aus Harn, Blut und Stuhl bestimmt werden, können einen Nutzen in der Diagnostik von CED ergeben, und sind aufgrund ihrer Praktikabilität und geringen Invasivität von unschätzbarem Wert für PatientInnen und BehandlerInnen. Deren weitergehende Untersuchung ist eine der wichtigsten Aufgaben im künftigen Wissensgewinn bezüglich CED.

5 Literaturverzeichnis

1. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, ECCO -EpiCom. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohns Colitis*. 2013;7:322–37.
2. Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun. Rev.* 2010;9:A372-378.
3. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307–17.
4. Bosca-Watts MM, Tosca J, Anton R, Mora M, Minguez M, Mora F. Pathogenesis of Crohn's disease: Bug or no bug. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2015;6:1–12.
5. Fava F, Danese S. Crohn's disease: bacterial clearance in Crohn's disease pathogenesis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010;7:126–8.
6. Juste C, Kreil DP, Beauvallet C, Guillot A, Vaca S, Carapito C, u. a. Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut*. 2014;63:1566–77.
7. Scribano ML, Prantera C. Antibiotics and inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Basel Switz.* 2013;31:379–84.
8. Quezada SM, Langenberg P, Cross RK. Cigarette smoking adversely affects disease activity and disease-specific quality of life in patients with Crohn's disease at a tertiary referral center. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2016;9:307–10.
9. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124:40–6.
10. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006;130:1588–94.
11. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm. Bowel Dis.* 2002;8:277–86.
12. Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Seagroatt V. Appendectomy, tonsillectomy, and inflammatory bowel disease: a case-control record linkage study. *J. Epidemiol. Community Health.* 2002;56:551–4.
13. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, u. a. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2002;51:808–13.
14. de Saussure P, Clerson P, Prost P-L, Truong Tan N, Bouhnik Y, Gil-Rch null. Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2007;31:493–7.

15. Wang Y-F, Ou-Yang Q, Xia B, Liu L-N, Gu F, Zhou K-F, u. a. Multicenter case-control study of the risk factors for ulcerative colitis in China. *World J. Gastroenterol.* 2013;19:1827–33.
16. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, u. a. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis.* 2012;6:965–90.
17. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, u. a. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J. Crohns Colitis.* 2010;4:28–62.
18. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Löfberg R, Modigliani R, u. a. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;122:512–30.
19. van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, u. a. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology.* 1995;109:129–35.
20. Koop I. *Gastroenterologie compact: Alles für Klinik und Praxis.* 3., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013.
21. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001;69:89–95.
22. Sands BE. Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2015;149:1275–1285.e2.
23. Cioffi M, Rosa AD, Serao R, Picone I, Vietri MT. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2015;6:13–22.
24. Lahiff C, Safaie P, Awais A, Akbari M, Gashin L, Sheth S, u. a. The Crohn's disease activity index (CDAI) is similarly elevated in patients with Crohn's disease and in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2013;37:786–94.
25. Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Lesser M, Daum F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2000;119:895–902.
26. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, u. a. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 2008;371:660–7.
27. Florholmen J. Mucosal healing in the era of biologic agents in treatment of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2015;50:43–52.

28. De Cruz P, Kamm MA, Prideaux L, Allen PB, Moore G. Mucosal healing in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm. Bowel Dis.* 2013;19:429–44.
29. Zallot C, Peyrin-Biroulet L. Deep remission in inflammatory bowel disease: looking beyond symptoms. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2013;15:315.
30. Rogler G, Vavricka S, Schoepfer A, Lakatos PL. Mucosal healing and deep remission: what does it mean? *World J. Gastroenterol.* 2013;19:7552–60.
31. Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel J-F, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Diamond R, u. a. Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut.* 2014;63:88–95.
32. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, u. a. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut.* 2005;54:364–8.
33. Tillett WS, Francis T. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J. Exp. Med.* 1930;52:561–71.
34. Peyrin-Biroulet L, Gonzalez F, Dubuquoy L, Rousseaux C, Dubuquoy C, Decourcelle C, u. a. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut.* 2012;61:78–85.
35. C-reaktives Protein [Internet]. Wikipedia. 2016 [zitiert 5. Dezember 2016]. Verfügbar unter: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=C-reaktives_Protein&oldid=156520161
36. Thomas L, Ansorg R, Arndt T, Barlage T. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 6. Aufl. Th-Books; 2005.
37. Jones J, Loftus EV, Panaccione R, Chen L-S, Peterson S, McConnell J, u. a. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2008;6:1218–24.
38. Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, Guo C-Y, Gona P, Keaney JF, u. a. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation.* 2006;113:1415–23.
39. Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, Miller DT, Zee RYL, Kozlowski P, u. a. Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia. *Ann. Hum. Genet.* 2006;70:705–16.
40. Henderson P, Kennedy NA, Van Limbergen JE, Cameron FL, Satsangi J, Russell RK, u. a. Serum C-reactive protein and CRP genotype in pediatric inflammatory bowel disease: influence on phenotype, natural history, and response to therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015;21:596–605.

41. Menees SB, Powell C, Kurlander J, Goel A, Chey WD. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am. J. Gastroenterol.* 2015;110:444–54.
42. Voudoukis E, Karmiris K, Koutroubakis IE. Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: A clinical approach. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2014;20:3180–90.
43. Kapsoritakis AN, Koukourakis MI, Sfiridaki A, Potamianos SP, Kosmadaki MG, Koutroubakis IE, u. a. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am. J. Gastroenterol.* 2001;96:776–81.
44. Mitsuyama K, Niwa M, Takedatsu H, Yamasaki H, Kuwaki K, Yoshioka S, u. a. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2016;22:1304–10.
45. Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J, Chamaillard M. IBD serological panels: facts and perspectives. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007;13:1561–6.
46. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, u. a. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101:2410–22.
47. Desplat-Jégo S, Johanet C, Escande A, Goetz J, Fabien N, Olsson N, u. a. Update on Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, anti-nuclear associated anti-neutrophil antibodies and antibodies to exocrine pancreas detected by indirect immunofluorescence as biomarkers in chronic inflammatory bowel diseases: results of a multicenter study. *World J. Gastroenterol.* 2007;13:2312–8.
48. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2004;10:661–5.
49. Saito H, Fukuda Y, Katsuragi K, Tanaka M, Satomi M, Shimoyama T, u. a. Isolation of peptides useful for differential diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2003;52:535–40.
50. Hartmann M. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas ; [inkl. Übungs-CD]. facultas.wuv / maudrich; 2009.
51. Derikx JPM, Luyer MDP, Heineman E, Buurman WA. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World J. Gastroenterol.* 2010;16:5272–9.
52. Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, u. a. TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:8366–71.
53. Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, u. a. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-

- mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology*. 2013;145:407–15.
54. Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, u. a. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity*. 2010;32:392–402.
55. Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front. Med*. 2014;1:24.
56. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, u. a. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006;131:117–29.
57. Mankertz J, Schulzke J-D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2007;23:379–83.
58. Soeters PB, Luyer MD, Greve JWM, Buurman WA. The significance of bowel permeability. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2007;10:632–8.
59. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology*. 1995;108:1566–81.
60. Halperin ML, Kamel KS. D-lactic acidosis: turning sugar into acids in the gastrointestinal tract. *Kidney Int*. 1996;49:1–8.
61. Duzgun AP, Bugdayci G, Sayin B, Ozmen MM, Ozer MV, Coskun F. Serum D-lactate: a useful diagnostic marker for acute appendicitis. *Hepatogastroenterology*. 2007;54:1483–6.
62. Murray MJ, Gonze MD, Nowak LR, Cobb CF. Serum D(-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *Am. J. Surg*. 1994;167:575–8.
63. Song W-B, Lv Y-H, Zhang Z-S, Li Y-N, Xiao L-P, Yu X-P, u. a. Soluble intercellular adhesion molecule-1, D-lactate and diamine oxidase in patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol*. 2009;15:3916–9.
64. Pelsers MMAL, Hermens WT, Glatz JFC. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem*. 2005;352:15–35.
65. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Siwak E, Pogorzelska J, Prokopowicz D. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regul. Pept*. 2008;147:25–8.
66. Sarikaya M, Ergül B, Doğan Z, Filik L, Can M, Arslan L. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a promising test for Crohn's disease: a preliminary study. *Clin. Lab*. 2015;61:87–91.
67. Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr*. 1998;128:1249–52.

68. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124:1210–9.
69. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marin O, u. a. Serum citrulline and rejection in small bowel transplantation: a preliminary report. *Transplantation*. 2001;72:1212–6.
70. Lundberg JO, Hellström PM, Fagerhol MK, Weitzberg E, Roseth AG. Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol*. 2005;2:96–102.
71. Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet Lond. Engl*. 2000;356:1783–4.
72. Calprotectin/Stuhl (CALPR) [Internet]. Gesundheitsportal. [zitiert 22. Dezember 2016]. Verfügbar unter: <https://www.gesundheit.gv.at/labor/laborwerte/magen-darm/labor-calprotectin-stuhl-calpr1>
73. Prüller F, Wagner J, Raggam RB, Hoenigl M, Kessler HH, Truschnig-Wilders M, u. a. Automation of serum (1→3)-beta-D-glucan testing allows reliable and rapid discrimination of patients with and without candidemia. *Med. Mycol*. 2014;52:455–61.
74. Brunner E, Munzel U. The nonparametric Behrens-Fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation. *Biom. J.* 1:17–21.
75. Hehn medistat-U von. Medizinische Statistik | Datenanalyse & Statistische Beratung für Fachbereiche der Medizin [Internet]. [zitiert 3. Mai 2017]. Verfügbar unter: <https://www.medistat.de/glossar/korrelations-assoziation/rangkorrelationskoeffizient-nach-spearman/>
76. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, u. a. C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut*. 2008;57:1518–23.
77. Fagan EA, Dyck RF, Maton PN, Hodgson HJ, Chadwick VS, Petrie A, u. a. Serum levels of C-reactive protein in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur. J. Clin. Invest*. 1982;12:351–9.
78. Saverymuttu SH, Hodgson HJ, Chadwick VS, Pepys MB. Differing acute phase responses in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 1986;27:809–13.
79. Jang HW, Kim HS, Park SJ, Hong SP, Kim TI, Kim WH, u. a. Accuracy of three different fecal calprotectin tests in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Intest. Res*. 2016;14:305–13.
80. Lee EH, Ko JS, Seo JK. Correlations of plasma citrulline levels with clinical and endoscopic score and blood markers according to small bowel involvement in pediatric Crohn disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2013;57:570–5.

81. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet Lond. Engl.* 2003;361:512–9.

