

Diplomarbeit

**PATHOPHYSIOLOGIE VON ANORGANISCHEN
POLYPHOSPHATEN BEI KINDERN UND JUGENDLICHEN MIT
CHRONISCH ENTZÜNDLICHER DARMERKRANKUNG**

eingereicht von

Alexander Meyer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde

unter der Anleitung von

Research Prof. PD Mag.rer.nat. Dr.scient.med. Axel Schlagenhauf

PD Dr.med.univ. Dr.scient.med. Benno Kohlmaier

Graz, 01.08.2024

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 01.08.2024

Alexander Meyer eh.

Vorwort

„A person often meets his destiny on the road he took to avoid it“

- Jean de La Fontaine

Eine Gemeinsamkeit, die ich mit den Patientinnen und Patienten dieser Arbeit teile, ist, dass ich auch mit 16 Jahren an Colitis Ulcerosa erkrankt bin.

Seither sprach mein Umfeld davon, dass ich mich später als Mediziner mit diesem Thema mehr beschäftigen soll. Aber ich wollte davon nichts wissen. Ich vermied das Thema im Studium bewusst und empfand es als unwichtig. Nun scheint es, als ob mich mein eigenes Schicksal eingeholt hat. Ich habe durch diese Arbeit, die beinahe als „persönliche Mission“ bezeichnet werden kann, meinen Frieden gefunden.

An dieser Stelle möchte ich jenen danken, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Zuallererst gebührt der Dank meinen Betreuern Axel Schlagenhaut und Benno Kohlmaier, die mich nicht nur vollkommen aufgenommen und betreut haben, sondern auch dazu beigetragen haben, mich selbst zu verwirklichen. Beide waren sie ehrlich und aufrichtig an meinem persönlichen Wachstum interessiert und zögerten nicht, dies auch aktiv zu fördern. Danke euch Beiden. Ebenso bedanke ich mich bei Tanja, Sandra und Alex für die Unterstützung beim Sammeln der Proben und die generelle Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

An zweiter Stelle möchte ich meinen Eltern Manuela und Gerhard danken. Sie begleiteten mich durch schwere Zeiten und dies ohne je etwas zurückzufordern. Ohne sie würde ich heute nicht an diesem Punkt stehen, wofür ich ihnen ewig dankbar sein werde.

Auch meinem Bruder Michael und meinem besten Freund Kristian möchte ich danken. Sie sind das, was man im Leben wahre Freunde nennt, und sind der buchstäbliche Fels in der Brandung meiner Welt. Danke für euer offenes Ohr und euere Aufrichtigkeit.

Zuletzt möchte ich auch meiner Partnerin Lena danken. Seit sie in früher Jugend in mein Leben getreten ist, hat sie meine Welt verändert. Sie ist der Grund, warum ich es so weit geschafft habe. Auch wenn es nicht immer einfach war, stand sie trotzdem zu mir. Danke für deine Liebe und Zuneigung.

Zusammenfassung

Einleitung

Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) haben ein sechsmal höheres Risiko venöse Thromboembolien zu erleiden als gleichaltrige gesunde Kinder. Anorganische Polyphosphate (PolyP) sind negativ geladene Polymere bestehend aus unterschiedlich langen Phosphatketten, welche zu diesem erhöhten Risiko beitragen könnten. PolyP kann sowohl von Bakterien, mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 500-1000 Monophosphaten, als auch von Thrombozyten, mit einer Kettenlänge von 70-120 Monophosphaten, produziert werden. Im Blut aktiviert PolyP das Gerinnungssystem, indem es über FXII mit dem Kallikrein-Kinin-System interagiert, wodurch das stark entzündungsfördernde Bradykinin freigesetzt wird. Andererseits entfaltet exogenes PolyP im Darmlumen eine remissionsinduzierende Wirkung und verbessert unter anderem die Barrierefunktion, Inflammation und Fibrosierung über Upregulation von Heat-Shock-Protein-27. Mesalazin, die Goldstandardmedikation zur Remissionsinduktion sowie Erhaltung, hemmt die bakterielle PolyP-Synthese, wodurch dessen antiinflammatorische Eigenschaften weiter erklärt werden könnten. Wenn bakterielles oder thrombozytäres PolyP in die Blutzirkulation gelangt, könnten Thrombosen oder vermehrte Entzündungen die Folge sein. Ziel dieser Studie war es, die endogene PolyP-Aktivität im Plasma von pädiatrischen CED-Patientinnen und Patienten bei Erstmanifestation und in Remission im Vergleich zu Kindern mit akuter bakterieller Gastroenteritis (BGE) und Gesunden zu bestimmen.

Methode

Wir verglichen zehn pädiatrische Colitis Ulcerosa (CU) Erkrankte und neun Morbus Crohn (MC) Erkrankte mit sechs pädiatrischen BGE-Patienten sowie 23 gesunden Kontrollen. CED-Patientinnen und Patienten wurden nach Therapiebeginn (3-6 Wochen nach Erstmanifestation) und in Remission erneut getestet. Die PolyP-Aktivität im Plasma wurde mithilfe einer neuen Nachweismethode basierend auf der Fähigkeit von PolyP, endogenen Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) zu hemmen, via Calibrated Automated Thrombography ermittelt. Die Parameter lag time, endogenous thrombin potential (ETP) und peak thrombin wurden aus dem mit und ohne TFPI gemessenen Thrombinsignal

berechnet. Die Differenzen zwischen Messung mit und ohne TFPI wurden in delta (Δ) ausgedrückt.

Ergebnisse

Es wurden weder longitudinal noch zwischen den Gruppen statistisch signifikante Unterschiede in den Δ -Werten der Thrombinparameter gefunden. Jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede in den absoluten Werten von lag time, ETP sowie peak Thrombin zwischen den einzelnen Studiengruppen ($p < .001$). Die relativen Parameter zeigten keinen Unterschied in Abhängigkeit der Mesalazintherapie. Bei MC-Patientinnen und Patienten war die lag time zwischen Erstmanifestation und Remission signifikant kürzer ($p < .001$). Zuletzt korrelierte der Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) signifikant positiv mit der lag time und der time to peak ($r_s = .67, p = .012$). Der entsprechende Disease Score bei Patientinnen und Patienten mit CU (PUCAI) wies keine statistisch signifikanten Korrelationen auf.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals die endogene PolyP-Aktivität im Plasma von CED-Patientinnen und Patienten überprüft. PolyP scheint in der Pathophysiologie von CED keinen oder nur einen zu vernachlässigenden Effekt auf die Gerinnung auszuüben. Ebenso beeinflusst eine Therapie mit Mesalazin die PolyP-Aktivität im Plasma vermutlich nicht. Jedoch zeigte sich während der aktiven Krankheitsphase einer CED sowie bei BGE ein prothrombotischer Zustand im Plasma im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dieser war charakterisiert durch erhöhtes ETP und peak Thrombin sowie verkürzter lag time. Dieses Ergebnis weist auf eine erhöhte Gerinnungsbereitschaft in Patientinnen und Patienten mit CED und BGE hin. Andererseits scheint ein höherer PCDAI die lag time zu verlängern, wodurch der ursprüngliche prothrombotische Effekt geringer ausfallen könnte. Da im Blut zirkulierendes PolyP demnach keine negativen Effekte bei CED hat, sollte zukünftige Untersuchungen die Rolle von exogenem PolyP in der Pathophysiologie von CED weiter untersuchen, um die Möglichkeiten neuer Therapieformen voranzutreiben.

Abstract

Introduction

Children with inflammatory bowel disease (IBD) have a sixfold higher risk of developing venous thromboembolism compared to healthy age matched children. Inorganic polyphosphates (PolyP) are negatively charged linear polymers that may contribute to this thrombotic risk. Microbial PolyP, especially that of the gut microbiome typically consists of 500 to 1000 phosphate monomers. PolyP is also stored in dense granules of human platelets with a chain length of about 70 to 120 monomers. In blood circulation PolyP activates the coagulation system via factor XII activation and interaction with the kallikrein-kinin-system, which releases the highly proinflammatory bradykinin further downstream. Conversely, exogenously administered PolyP within the intestinal lumen ameliorates inflammation and fibrosis as well as improves barrier function via upregulation of Heat-Shock-Protein-27. Additionally, mesalamine, a popular first line therapy for IBD, seems to inhibit the bacterial PolyP-synthesis. If PolyP leaks into circulation either by shedding from platelets or via an impaired gut barrier it could drive inflammation and thrombosis in pediatric IBD-patients. PolyP could play a pivotal role in upholding the vicious cycle of inflammation in IBD and therefore could be a potential target for future therapies. Aim of this study was to assess the activity of circulating endogenous PolyP in pediatric IBD-patients during the acute phase and in clinical remission in comparison to patients with bacterial gastroenteritis (BGE) and healthy individuals.

Methods

We compared ten pediatric patients with ulcerative colitis (UC) and nine with Crohn's Disease (CD) at initial manifestation, with six pediatric BGE-patients and 23 healthy controls. IBD-patients were retested after treatment onset (3-6 weeks after initial manifestation) and in remission. PolyP-activity was assessed in sampled plasma using a newly developed assay that employed calibrated automated thrombography, leveraging PolyP's distinctive capacity to antagonize exogenous tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Lag time, endogenous thrombin potential (ETP) and peak height of generated thrombin were calculated from the thrombin trace obtained both with and without addition of exogenous TFPI. Differences between the parameters with and without TFPI were expressed as delta (Δ).

Results

No statistically significant differences in the Δ values of thrombin parameters were found, either longitudinally or between groups. However, there were significant differences in the absolute values of lag time, ETP and peak thrombin between the study groups ($p < .001$, respectively). There were no significant differences in relative thrombin parameters depending on mesalamine therapy. Lag time was reduced significantly ($p < .001$) in CD-patients between initial manifestation and remission. The disease activity score in patients with CD (PCDAI) correlated significantly positive with lag time and time to peak ($r_s = .67$, $p = .012$, respectively). No significant correlations with the Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) were found.

Discussion

Our study was the first to evaluate PolyP-activity in plasma of IBD patients. It seems that endogenous PolyP does not significantly affect coagulation in these individuals. Equivalently, mesalamine appears to not significantly affect PolyP-activity in circulation. Nonetheless a prothrombotic shift was observed, characterized by elevated ETP, increased peak thrombin and shorter lag time during the active phase of IBD and in acute BGE compared to controls. This finding indicates a prothrombotic shift in these patients. Paradoxically a higher IBD disease score appears to prolong the lag time, which in turn could mitigate the effects of increased ETP. Since circulating endogenous PolyP does not appear to have harmful effects in IBD, further research should investigate the potential therapeutic benefits of exogenously administered PolyP in the treatment of IBD.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract	V
Abkürzungen	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Finanzielle Aspekte bei CED	2
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	2
1.2.1 Diagnostik	4
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	6
1.2.3 Therapie	9
1.3 CED in der Pädiatrie	13
1.4 Zusammenspiel zwischen Gerinnung und Entzündung	15
1.5 Gerinnung bei CED	20
1.6 PolyP in der Gerinnung und Inflammation	24
1.7 Potenzielle Rolle von PolyP bei CED	26
2 Methoden	32
2.1 Studiendesign	32
2.1.1 Inklusionskriterien	34
2.1.2 Exklusionskriterien	34
2.2 Variablen	34
2.2.1 Routineparameter	35
2.2.2 PolyP-Messmethodik	35
2.3 Statistik	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Stichprobe	40
3.1.1 Messzeitpunkte	41
3.1.2 Demographische Daten	42

3.2	Gruppenunterschiede	44
3.3	Unterschiede im Verlauf der Erkrankung	49
3.4	Einfluss von Mesalazin auf PolyP-Aktivität	52
3.5	Zusammenhänge zwischen Krankheitsaktivität und CAT-Parameter	53
4	Diskussion	56
4.1	Interpretation und Einordnung in die derzeitige Literatur.....	57
4.3	Limitationen	59
4.4	Ausblick	61
4.5	Fazit	62
	Literaturverzeichnis	63
	Anhang	84

Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ANCA	Anti-Neutrophile-cytoplasmatische-Antikörper
ASCA	Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
B2R	Bradykinin B2-Rezeptor
BGE	Bakterielle Gastroenteritis
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAT	Calibrated Automated Thrombography
CD40L	Cluster of Differentiation 40 Ligand
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
CU	Colitis Ulcerosa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran Sulfat-Natriumsalz
ETP	Endogenous Thrombin Potential
FIX	Faktor IX
FMT	Fäkale Mikrobiota-Transplantation
FV	Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FX	Faktor X
FXI	Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIII	Faktor XIII
GIT	Gastrointestinaltrakt
GP	Glykoprotein

HMWK	Hochmolekulares Kininogen
HSP27	Heat-Shock-Protein-27
IBDU	Inflammatory Bowel Disease-Unclassified
ICAM-1	Intercellular-cell-adhesion-molecule-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-12	Interleukin-12
IL-23	Interleukin-23
JAK	Januskinase
JAM	Junctional Adhesion Molecules
KKS	Kinin-Kallikrein-System
KRK	Kolorektales Karzinom
MC	Morbus Crohn
MRE	Magnetresonanzenzterographie
MPO	Myeloperoxidase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PAE	Pulmonalarterienembolie
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PolyP	Anorganische Polyphosphate
PUCAI	Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

TTP	time to peak
tPA	Tissue Plasminogen Activator
VCAM-1	vascular-cell-adhesion-molecule-1
VelIndex	Velocity Index
VTE	Venöse Thrombembolien
vWF	von-Willebrand-Faktor
WFDC2	whey acidic protein four-disulfide core domain 2

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rolle von PolyP in Abhängigkeit der Lokalisation	29
Abbildung 2: Studiendesign	33
Abbildung 3: Thrombingeneration bei TFPI und PolyP-Zugabe.....	35
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Thrombingeneration	38
Abbildung 5: Gruppenverteilung.....	41
Abbildung 6: TeilnehmerInnen mit vollständigen Messzeitpunkten	42
Abbildung 7: Gruppenunterschiede in lag time, ETP und peak height.....	47
Abbildung 8: Thrombinkurven von repräsentativen StudienteilnehmerInnen	47
Abbildung 9: Gruppenunterschiede in Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height.....	48
Abbildung 10: Unterschiede in lag time zwischen Erstmanifestation und Remission	51
Abbildung 11: Korrelation zwischen PCDAI mit lag time und time to peak.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologikatherapie bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	11
Tabelle 2: Small molecules bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	12
Tabelle 3: Demographische Daten der Stichprobe	43
Tabelle 4: Deskriptive Statistik und ANOVA-Ergebnisse der Gruppenvergleiche	45
Tabelle 5: Deskriptive Statistik und ANOVA-Ergebnisse der longitudinalen Vergleiche.....	49
Tabelle 6: t-Test Ergebnisse der CAT-Parameter von Erstmanifestation zu Remission.....	50
Tabelle 7: t-Test Ergebnisse in Abhängigkeit der Mesalazineinnahme.....	52
Tabelle 8: Korrelation zwischen Disease-Scores und absoluten CAT-Parametern	54

1 Einleitung

Immer mehr Menschen erkranken weltweit an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Mehrere Studien beschreiben einen dramatischen Zuwachs der Inzidenz bzw. Prävalenz von CED bei Kindern und Jugendlichen in Europa sowie weltweit (1–4): Ein Review von Kuenzig et al. zur weltweiten epidemiologischen Entwicklung aus dem Jahr 2022 berichtet eine steigende Prävalenz sowie Inzidenz der CED-Diagnosen bei unter 21-jährigen in den Jahren 2000-2020 (5). Laut den Daten des sächsischen CED-Registers wird sich die Zahl der pädiatrischen CED-Erkrankungen in Deutschland vom Jahr 2000 bis zum Jahr 2030 mehr als verdreifachen (325%) (2). Auch außerhalb Europas ist eine steigende Anzahl von CED-Betroffenen zu beobachten: Schätzungen zufolge leidet 1% der kanadischen Bevölkerung bis zum Jahr 2030 an einer CED-Erkrankung (6).

Die Altersgruppe der 15–29-Jährigen weist die höchste Inzidenz bei CED-Erkrankungen auf (7). Hier zeigt der Inzidenzgipfel für Colitis Ulcerosa (CU) eine Verzögerung um fünf Jahre gegenüber Morbus Crohn (MC). 20% der CED-Fälle wurden in der Kindheit oder Jugend diagnostiziert (8).

Das Gerinnungssystem spielt bei diversen Vorgängen im Körper eine wichtige Rolle und hat nicht nur die Aufgabe der Blutstillung inne. Eine zentrale Verbindung zwischen der Gerinnung und entzündlichen Prozessen stellt das Kinin-Kallikrein-System (KKS) dar (9). Auch bei CED ist die Gerinnung mitbetroffen und verändert. CED-Patientinnen und Patienten weisen ein zwei- bis dreifach höheres Risiko auf thromboembolische Ereignisse zu erleiden als gesunde Personen (10). Zudem finden sich auch mehrere Veränderungen von Blutkomponenten, die zu einer höheren Gerinnungsbereitschaft beitragen können (11–13).

Die steigende Prävalenz sowie Inzidenz von CED, besonders bei Kindern und Jugendlichen, kombiniert mit den negativen Folgen durch thromboembolische Komplikationen, zeigen wie wichtig ein genaueres Verständnis der Pathophysiologie von CED ist.

1.1 Finanzielle Aspekte bei CED

Die Behandlung von Patientinnen und Patienten mit CED hat einen deutlichen ökonomischen Einfluss auf das Gesundheitssystem und die Betroffenen. Eine im Jahr 2020 veröffentlichte Studie der Crohn's & Colitis Foundation beschrieb mehr als dreimal so hohe Kosten für das amerikanische Gesundheitssystem bei CED-Patienten im Gegensatz zu anderen Patienten (22 987\$ vs. 6956\$) (14). Diese setzen sich aus Kosten für stationäre Aufenthalte, Ambulanzbesuche, Notaufnahmen und Ausgaben für Medikamente (vor allem Biologika) zusammen. Weiters haben CED-Patienten doppelt so hohe selbstbezahlte Ausgaben (2213\$ vs. 979\$). Die Kosten sind am deutlichsten im ersten Jahr nach der Diagnose zu spüren und Betroffene, die in ihrer Kindheit an CED erkrankt sind, haben 50% höhere Ausgaben als andere CED-Erkrankte (14).

Die Zahlen in Europa ähneln denen in Nordamerika: Ein systematisches Review von van Linschotten et al. untersuchte die Kosten für das europäische Gesundheitssystem durch CED (15). Die jährlichen Ausgaben belaufen sich auf 12 439\$ für MC und 7224\$ für CU. Dieses Review befasste sich auch mit den Kosten, die durch eingeschränkte Produktivität am Arbeitsplatz entstehen. Hier wurde, wie auch in vielen anderen Studien, zwischen Präsentismus, also die reduzierte Leistungsfähigkeit am Arbeitsplatz durch eine Krankheit, und Absentismus, das Fernbleiben wegen einer Krankheit, unterschieden (16,17). Weiters wurden die Kosten durch Frühpension und Behinderung untersucht. Die Kosten für Präsentismus und Absentismus bei CED betragen 7124\$ pro Jahr in Europa und 20 074\$ in Nordamerika (15).

Die hohen Ausgaben des Gesundheitssystems und der Betroffenen selbst unterstreichen nochmals welchen Stellenwert die Diagnose CED in der Gesellschaft und fürs Individuum hat.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Patientinnen und Patienten mit CED leiden an einer chronischen Entzündung des Magen-Darm-Traktes. Generell kann dies viele individuelle Formen annehmen und ist auch häufig mit Begleitscheinungen, sogenannten extraintestinalen Manifestationen, vergesellschaftet. Zu diesen extraintestinalen Manifestationen zählen unter anderem Arthritis, Uveitis, Erythema nodosum und die primär

sklerosierende Cholangitis (18). Im Wesentlichen lassen sich zwei Ausprägungen von CED im Erwachsenenalter unterscheiden: MC und CU. Eine zusätzliche Entität, die häufiger im Kindesalter auftritt, stellt die Inflammatory Bowel Disease-Unclassified (IBDU) dar (19). CED sind geprägt von einem typischen schubförmigen Verlauf mit abwechselnd entzündungsfreien Intervallen (Remission) und Schüben mit erhöhter Krankheits- und Entzündungsaktivität. Bei CU ist die Entzündung auf die Mucosa und Submucosa beschränkt und betrifft für gewöhnlich nur das Colon (20). Ausgehend vom Rektum breitet sich die Entzündung nach proximal über das Colon aus. Bei 40% der Betroffenen beschränkt sich die Entzündung nur auf das Rektum (Proktitis), bei 30% reicht sie bis zur linken Flexur (linksseitige Colitis) und bei wiederum 30% ist der gesamte Dickdarm entzündet (Pancolitis) (21). Eine Beteiligung des terminalen Ileums oder des Duodenums bei CU wurde ebenfalls berichtet (22–24). MC hingegen kann im gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) vom perianalen Bereich bis zum Mund auftreten und verursacht eine transmurale Entzündung (25). Bei jeweils 25% der Betroffenen beschränkt sich die Entzündung auf das terminale Ileum (Ileitis) oder auf das Colon. Weiters leiden 50% unter einer Ileocolitis. Orale oder gastroduodenale Beteiligung tritt bei 5-15% der MC-Erkrankten auf. Rund ein Drittel der Betroffenen weist perianale Symptome auf. Häufige Symptome bei CED sind Diarrhoe und abdominelle Schmerzen (26). Eine Proktitis, wie sie gehäuft bei CU auftritt, führt zu Urgency-Symptomatik und Inkontinenz (27). Hier ist der Stuhl oft normal geformt bis hin zur Obstipation. Abdominelle Schmerzen im Zusammenhang mit Stuhldrang werden Tenesmen genannt und lösen sich meist erst nach Defäkation. Rektale Blutungen sind häufiger bei CU, während Gewichtsverlust und perianale Symptome wie Fisteln und Abszesse bei MC häufiger auftreten. Eisen- und Vitamin B12-Mangel können Anämien verursachen und treten vorwiegend bei MC auf (25). Laut einer türkischen Studie leiden bis zu 92,1% der CED-Patientinnen und Patienten an Malnutrition (28). Häufig sind hier Zink-, Folsäure-, Calcium-, Vitamin D- und Vitamin B12-Mangel. Je nach Ausmaß der Erkrankung und Schwere des Schubes können auch Fieber und Fatigue auftreten. Fatigue ist ein krankhaftes dauerhaftes Müdigkeitsgefühl und betrifft in etwa 50% der Patientinnen und Patienten in Remission und über 80% während eines Schubes (29).

1.2.1 Diagnostik

Die Diagnostik von CED umfasst bildgebende Verfahren, histologische Begutachtung und Laboruntersuchungen in Kombination mit einer umfangreichen Anamnese (30). Bei Verdacht auf CED sollte mittels Stuhlprobe und mikrobiologischer Untersuchung eine gastrointestinale Infektion vorerst ausgeschlossen werden. Eine Stuhlkultur zum Nachweis von Shigellen, Yersinien, Salmonellen und Campylobacter jejuni, sowie eine PCR-Untersuchung auf enterale Viren (Rotavirus, Norovirus) sollte durchgeführt werden. Bei positiver Reiseanamnese ist eine erweiterte Diagnostik bezüglich Parasiten, wie z.B. Giardia lamblia, sinnvoll. Zu den Laboruntersuchungen zählen ein kleines Blutbild, Albumin, Seruminflammationsmarker, Transaminasen und γ -Glutamyltransferase. Zusätzlich sollte bei MC der Vitamin B12- und D-Spiegel überprüft werden (25). Als Seruminflammationsmarker fungieren das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Fäkale Inflammationsmarker, allen voran fäkales Calprotectin, weisen eine höhere Sensitivität bei gastrointestinalen Entzündungen auf als Inflammationsmarker im Serum. Neben Calprotectin kann man im Stuhl auch Lactoferrin, S100A12 und Lysozym nachweisen. Bei pädiatrischen CED-Patientinnen und Patienten haben sich fäkales Calprotectin und Lactoferrin als sensitivste Marker bewiesen (31,32). Fäkales Calprotectin weist in Bezug auf CED keine hohe Spezifität auf, da es auch bei gastrointestinalen Infektionen, Zöliakie oder bei der Einnahme von Diclofenac erhöht sein kann (30,33). Jedoch weist es einen hohen negativ prädiktiven Wert auf, wodurch ein fäkaler Calprotectin-Wert im Normbereich ($<50 \mu\text{g/g}$) eine CED mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt (34).

In der Labordiagnostik von CED ist die serologische Antikörperbestimmung den anderen Markern untergeordnet und wenig spezifisch, dennoch sollen sie kurz beschrieben werden. Zwei Antikörper, die auch am Univ.-Klinikum für Kinder- und Jugendheilkunde routinemäßig bei CED-Verdacht bestimmt werden, sind Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper (ASCA) und Anti-Neutrophile-cytoplasmatische-Antikörper (ANCA). ANCA sind Autoantikörper gegen Zytoplasma oder Zytoplasmabestandteile von Granulozyten. Wenn sich die Granulozyten in der Immunfluoreszenz perinukleär anfärben, spricht man von pANCA (35). Färbt sich hingegen das Zytoplasma, spricht man von cANCA. Autoantikörper mit pANCA-

Anfärbung richten sich hauptsächlich gegen Myeloperoxidase (MPO), Elastase, und Cathepsin G. Bei Letzteren binden die Antikörper vorwiegend an die Proteinase 3. Zwischen CU und MC gibt es Unterschiede im serologischen Bild: Während bei MC häufiger ASCA auftreten, findet man bei CU häufiger pANCA (36–38).

Zur bildgebenden Diagnostik gehören unbedingt eine Ileocoloskopie und Ösophagoduodenoskopie (ÖGD). Weitere bildgebende Verfahren, die durchgeführt werden können, sind eine Magnetresonanztomographie (MRE), Abdomensonographie sowie eine Kapselendoskopie. Mittels MRE können eine Dünndarmbeteiligung, Entzündungen der Darmwand und Komplikationen wie Stenosen, Fisteln, Abszesse oder Wandverdickungen nachgewiesen werden. Sie ist besonders wichtig bei MC, atypischer CU oder IBDU und kann daher bei Kindern mit eindeutigen makroskopischen und histologischen CU-Zeichen ausbleiben (30). Handelt es sich um sehr junge Kinder kann die Kapselendoskopie eine Alternative zur MRE sein. Ebenso kann eine Kapselendoskopie zusätzlich durchgeführt werden, wenn mittels MRE und endoskopischen Verfahren keine eindeutige Diagnose erreicht wurde. Typischerweise präsentiert sich CU makroskopisch mit einer kontinuierlichen, vom Rektum nach proximal verlaufenden, Entzündung der Darmwand ohne Dünndarmbeteiligung (39). Die entzündete Darmwand ist oft gerötet, granuliert, vulnerabel und weist eine vermehrte Gefäßzeichnung auf. Weiters findet man häufig die namensgebenden Ulcera entlang der entzündeten Bereiche. Durch die kontinuierliche chronische Entzündung können aufgrund von übermäßiger Regeneration inflammatorische Pseudopolypen entstehen (40). Diese sind jedoch nicht neoplastischer, sondern inflammatorischer Genese. Bei CU gestaltet sich die Diagnose, aufgrund von mehreren atypischen Varianten, oft schwierig (30). Da MC im gesamten GIT auftreten kann, reicht das makroskopische Bild von oralen Aphten bis hin zu Ulcera im Colon und Ileum. Diese Ulcera sind zu Beginn eher aphtös konfiguriert und können bei zunehmender Krankheitsaktivität immer tiefer und größer werden, bis sie in der Endoskopie als große, lineare und schlangenförmige Ulcera auffallen (25,30). Hier besteht auch ein Unterschied zu CU, wo die Ulcera eher oberflächlich auftreten (39). Typisch für MC sind diskontinuierliche Entzündung, Fistelbildung, Strikturen sowie Stenosen.

Zur histologischen Abklärung sollen mindestens zwei Biopsien an fünf verschiedenen Stellen im Colon inklusive Rektum entnommen werden (30,39,41).

Ebenso soll das terminale Ileum an zwei Stellen biopsiert werden. Während der ÖGD werden an zwei Stellen im Ösophagus, Magen und Duodenum ebenfalls Biopsien entnommen.

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Ein vollständiges Verständnis der Ätiologie und Pathophysiologie von CED fehlt derzeit noch. Neben genetischen Veranlagungen, Ernährung und Lifestyle spielt auch das Mikrobiom, also die natürliche bakterielle Darmflora, und die Darmbarriere eine Rolle in der Krankheitsentstehung.

Eine positive Familienanamnese für CED besteht bei bis zu 15% der MC- und bei 8-14% der CU-Erkrankten (21,42). Wenn beide Elternteile von CED betroffen sind, beträgt das Risiko selbst zu erkranken über 30%. Auf genetischer Ebene fand man bereits mehrere Varianten von Genen, die mit MC oder CU vergesellschaftet sind. Neben dem NOD2-Gen, welches Rezeptoren zur Bakterienerkennung codiert, sind ATG16L1 und IL23R stark mit MC assoziiert (25,43). Heterozygote TrägerInnen des NOD2/CARD15-Gens haben ein doppelt bis viermal so hohes Risiko an MC zu erkranken, homozygote sogar ein 20- bis 40-mal so hohes Risiko (44).

Westliche Ernährungsformen, bestehend aus viel Fleisch, tierischen Milchprodukten und hohem Gehalt an raffinierten Kohlenhydraten, sind mit einem höheren Risiko an CED zu erkranken assoziiert (45). Hoher Verzehr von Fett, insbesondere tierische Fette und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, korrelieren mit einer hohen CU-Inzidenz (46). Ananthakrishnan et al. zeigten, dass eine ballaststoffreiche Ernährung das Risiko MC zu entwickeln reduzierte, wobei der Effekt am größten bei Ballaststoffen aus Obst war (47).

Rauchen hat unterschiedliche Auswirkungen im Vergleich zwischen CU und MC. Während Rauchen bei MC mit einer Verdopplung des Erkrankungsrisikos, früherer Erstmanifestation und häufigerem Gebrauch von Immunsuppressiva assoziiert ist, besitzt es bei CU eher einen protektiven Effekt (48–51). Bei CU ist Rauchen mit späterer Erstmanifestation, milderem Verlauf und niedrigerer Verwendung von Immunsuppressiva assoziiert. Rauchen führte in der Metaanalyse von Mahid et al. zu einer Risikoreduktion von 42% an CU zu erkranken (49–51).

Oberflächen des menschlichen Körpers, wie z.B. Haut, Respirationstrakt oder GIT, die Kontakt zur Außenwelt haben, sind von vielen Mikroorganismen besiedelt, die wesentlich zur Barrierefunktion beitragen (52,53). Neben der wichtigen Rolle in der Barrierefunktion produziert das Darmmikrobiom essenzielle Stoffe wie kurzkettige Fettsäuren, die intestinalen Epithelzellen Energie liefern und antiinflammatorisch wirken, sowie Vitamin K, ohne dessen keine physiologische Blutgerinnung möglich wäre (43,54). Bei pathologischen Prozessen im Darm wird die empfindliche körpereigene Flora gestört und es kommt zu einer bakteriellen Dysbiose. Das Darmmikrobiom von CU- und MC-Erkrankten weist eine reduzierte Diversität sowie Anzahl an Mikroorganismen auf (43,55,56). Diese Veränderungen können in Kombination mit einer gestörten Darmbarriere zu einer Fehlregulation in der Immunantwort gegen die körpereigene Darmflora führen.

Die Darmbarriere ist keine starre Grenze, die den Darminhalt vom Blutkreislauf abgrenzt. Sie ist ein Verband aus Zellen und Mikroorganismen die zum einen Nährstoffe in den Blutkreislauf aufnehmen kann und zum anderen pathogene Viren und Bakterien abwehrt. Im Colon liegt dem Epithel eine zweischichtige Mucusschicht bestehend aus Muzinen auf (57). Die innere Schicht haftet auf dem Epithel und ist frei von Bakterien, die äußere hingegen bildet den Lebensraum für das Mikrobiom. Diese Mucusschicht leistet einen wesentlichen Beitrag zur Barrierefunktion. Eine veränderte erhöhte Permeabilität dieser Barriere findet sich auch bei CED (58–60). Derzeit herrscht noch Diskussion darüber, ob eine gestörte Darmbarriere der Auslöser oder die Folge von Entzündungen in der Darmwand ist (61). Eine Studie von Parikh et al. entdeckte, dass es während einer aktiven Entzündung bei CU zu einer verminderten Expression von whey acidic protein four-disulfide core domain 2 (WFDC2) kommt, was zu einer geschädigten Mucusschicht, erhöhter Kolonisation und Invasion durch Bakterien, sowie Störungen in der Darmbarriere führt (62). WFDC2 wird von den Becherzellen des intestinalen Epithels produziert und ist essenziell für die Sterilität und Integrität der inneren Mucusschicht. Neben Störungen in der Mucusproduktion finden sich auch Abnormalitäten in den Zellverbindungen. Tight junctions, das sind Zellkontakte bestehend aus den Transmembranproteinen Claudin und Occludin, die eine selektiv permeable Barriere formen, sind bei CED verändert und führen so zu einer Barrieredysfunktion (63–65).

Ebenso wie die intestinale Barriere und das Mikrobiom, ist auch das Immunsystem bei CED verändert. Durch eine initiale Verletzung der Darmwand aufgrund von Infektionen oder Umwelteinflüssen entsteht eine Entzündung. Eine Fehlregulation des Immunsystems verhindert das Abklingen dieser Entzündung, wodurch weitere Schäden entstehen (66,67). Neutrophile Granulozyten sind die häufigsten Leukozyten im Menschen und sind Teil des unspezifischen Immunsystems. Sie spielen eine große Rolle in der Pathogenese von CED und sind auch das Ziel von mehreren Therapien. Sowohl die Aktivität von Neutrophilen als auch ihre Produktion von Reactive Oxygen Species (ROS), welche die Darmbarriere stören und inflammatorisch wirken, sind bei CED erhöht (68,69). Zur Abwehr von Krankheitserregern produzieren sie neben ROS auch Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Diese extrazellulären Faserstrukturen bestehen hauptsächlich aus DNA, Histonen, MPO, sowie den antimikrobiellen Stoffen Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 (66). Li et. al. untersuchten den NETs-Gehalt bei CED-Erkrankten und im Mausmodell (70). Während eines aktiven Schubes wurde im Vergleich zu Erkrankten in Remission sowie gesunden Kontrollen erhöhte NETs-Spiegel im Plasma nachgewiesen. Ebenso wurden NETs im Colon von CED-Patientinnen und Patienten nachgewiesen. Eine Studie von Bennike et. al. kam zu ähnlichen Ergebnissen: Sie fanden elf NETs-Proteine mit erhöhten Werten in Colonbiopsien von CU-Erkrankten (71). In Mäusen induziert Dextran Sulfat-Natriumsalz (DSS) eine akute Colitis. Im DSS-Mausmodell von Li et. al. waren die NETs-Spiegel im Blut erhöht. Eine Degradation von NETs mittels DNase, einem Enzym zur Spaltung von DNA, senkte die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (70). Zudem verbesserten sich durch DNase-Gabe die Colitissymptome der Mäuse. Zytokine wie TNF- α , welche von neutrophilen Granulozyten selbst produziert werden, sorgen dafür, dass weitere Immunzellen an den Entzündungsort gelockt werden (72). TNF- α führt zur Apoptose von Enterozyten, blockiert die Verteilung von tight junctions und führt somit direkt zu einer Schwächung der Barriere (73–75).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Entstehung von CED eine Kombination aus verschiedenen Umwelteinflüssen, geschwächter Darmbarriere, verändertem Mikrobiom und einer Fehlregulation des Immunsystems zusammen mit einer genetischen Komponente ist.

1.2.3 Therapie

Die Behandlung von CED ist vielschichtig und weist eine große Menge an Therapien von Glukocorticoiden über Biologika bis hin zu exotischen Verfahren wie Stammzell- und Mikrobiomtransplantation auf. Zu Beginn seien hier die klassischen Medikamente 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) und Corticosteroide erwähnt. Die beiden heute noch in Österreich verwendeten Vertreter der 5-ASA Gruppe sind Sulfasalazin und Mesalazin, wobei im klinischen Alltag Mesalazin gebräuchlicher ist. Bei oraler Einnahme müssen, aufgrund der Resorption von 5-ASA im oberen GIT, Prodrugs oder retardierte Formen eingesetzt werden (76). Sulfasalazin (Salazopyrin®) wird als Prodrug bestehend aus 5-ASA und Sulfapyridin oral verabreicht (77). Im Colon wird Sulfasalazin durch Bakterien der Darmflora gespalten, wodurch es zur Freisetzung der aktiven Komponente 5-ASA kommt (78). Das ebenso freigesetzte Sulfapyridin wird resorbiert und ist vermutlich der Auslöser der starken Nebenwirkungen von Sulfasalazin. Orales Mesalazin (Mesagran®, Pentasa®, Salofalk®) wird hingegen als retardierte Form verabreicht. Diese Präparate sind mit Stoffen wie Eudragit L oder Cellulosederivate überzogen, die sich ab einem pH >6 auflösen und so den Wirkstoff erst im distalen Ileum bzw. Colon freisetzen (76,79). Bei Pentasa® funktioniert die Freisetzung aufgrund eines speziellen Überzugs aus Ethylcellulose sogar unabhängig vom pH, wodurch eine kontinuierliche Wirkung vom distalen Magen bis zum Colon gewährleistet wird. Nahrungsaufnahme, verminderte Peristaltik oder pH-Veränderungen können zu verfrühter Freisetzung von Mesalazin im oberen GIT führen. Daher gibt es auch Präparate, die lokal in Form von Zäpfchen, Klysmen oder Schaum verabreicht werden können. Eine ausreichend hohe Konzentration in den entzündeten Darmabschnitten ist deshalb relevant, weil 5-ASA seine Wirkung hauptsächlich lokal im Bereich der entzündeten Mukosa entfaltet. Unter Anderem fungiert 5-ASA als Scavenger für ROS und hemmt die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen (80,81). Die genaue Wirkweise ist derzeit noch unbekannt. 5-ASA ist Mittel der ersten Wahl zur Lokalthherapie bei leichter bis mittelschwerer CU-Proktitis (21). Bei Linksseitencolitis soll die Lokalthherapie zusätzlich noch mit einem oralen 5-ASA Präparat kombiniert werden. Generell kann 5-ASA zur Remissionsinduktion sowie zur Remissionserhaltung bei CU eingesetzt werden. Der Nutzen von 5-ASA zur MC-Therapie ist zur Zeit umstritten (25,77).

Glukocorticoide werden neben CED auch bei vielen anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes oder rheumatoide Arthritis eingesetzt. Sie wirken über spezielle, im Zytoplasma von beinahe allen Zellen des Körpers vorkommenden, Glukocorticoid-Rezeptoren (82). Der daraus entstehende Komplex hemmt die Transkription direkt oder bindet im Zytoplasma an Transkriptionsfaktoren, wodurch diese nicht in den Zellkern gelangen. Nukleärer Faktor κB ist ein proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, der durch Glukocorticoide beeinflusst wird, was zu einer Regulation des Immunsystem führt. Glukocorticoide werden bei CED nur zur Remissionsinduktion, nicht aber in der Remissionserhaltung verwendet (21,25). Um systemische Nebenwirkungen wie opportunistische Infektionen oder Osteoporose zu vermeiden, können, analog zu 5-ASA, lokale Präparate gegeben werden. Rektal werden Schäume sowie Zäpfchen mit Budesonid einzeln oder in Kombination mit 5-ASA angewendet (21). Jedoch ist die lokale 5-ASA Therapie in der CU-Behandlung den topischen Glukocorticoiden laut Marshall et al. überlegen (83).

Immunmodulatoren sind Medikamente, die das Immunsystem beeinflussen oder unterdrücken sollen. Die erste Gruppe in dieser Medikamentenklasse bilden die Thiopurine. Zu ihnen gehören Azathioprin (Imurek®), 6-Mercaptopurin (Purinethol®) und 6-Thioguanin (77). Als inaktive Prodrugs werden sie im Körper in ihre aktive Form metabolisiert, wodurch die DNA-Synthese gestört wird. Daraus resultiert eine verminderte Lymphozytenproliferation sowie ein immunsuppressiver Effekt. Der Nutzen von Thiopurinen liegt eher in der Remissionserhaltung als in der Remissionsinduktion, wobei sie im klinischen Alltag aufgrund der hohen Nebenwirkungsrate immer seltener verwendet werden (77,84). Ohnehin stehen seit dem Aufkommen der Biologika eine Reihe anderer Wirkstoffe als Alternative zur Verfügung. Der Folsäure-Antagonist Methotrexat (Methofill®, Nordimet®) gehört ebenfalls zur Klasse der Immunmodulatoren. Es wird einmal wöchentlich parenteral oder oral verabreicht und dient hauptsächlich der Remissionserhaltung (25).

Biologika, die bei CED zum Einsatz kommen, sind vorwiegend monoklonale Antikörper. Einen Überblick über diese Biologika gibt die Tabelle 1. Sie werden von einer einzigen Zelllinie produziert und richten sich gegen bestimmte Epitope. Sie werden intravenös oder subcutan in unterschiedlichen zeitlichen Abständen, von 2-wöchentlich bis monatlich, verabreicht. Ein beliebtes Ziel von monoklonalen

Antikörpern bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen ist das proinflammatorische Zytokin TNF- α . Zu den TNF- α -Blockern, die bei CED eingesetzt werden, gehören Infliximab (Remicade®, Inflectra®), Adalimumab (Humira®), Certolizumab pegol (Cimzia®) und Golimumab (Simponi®) (25,77). Die Interleukine 12 (IL-12) und 23 (IL-23) werden von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen ausgeschüttet und spielen eine große Rolle in der Pathophysiologie von CED (85,86). Analog zu den TNF- α -Blockern existieren auch hier Antikörper, die diese Interleukine hemmen können. Ustekinumab (Stelara®) hemmt sowohl IL-12 als auch IL-23 über die gemeinsame Beta-Untereinheit p40 (77). Mirikizumab (Omvoh®) und Risankizumab (Skyrizi®) binden jeweils nur an die p19 Untereinheit von IL-23. Ein Ansatz, der die Immunantwort auf lokaler Ebene beeinflusst, ist die Inhibierung von Integrinen, wodurch die Einwanderung von Leukozyten gehemmt wird. Hierfür steht bei CU und MC der monoklonale Antikörper Vedolizumab (Entyvio®) zur Verfügung. Vedolizumab bindet an das α 4 β 7-Integrin und verhindert so dessen Interaktion mit dem auf Endothelzellen im Darm vorkommenden mukosalen Adressin-Zelladhäsionsmolekül-1. Alle Antikörper können bei mittelschwerer bis schwerer CU bzw. MC zur Remissionsinduktion und Erhaltung eingesetzt werden. Die Indikation liegt besonders bei Patientinnen und Patienten mit therapierefraktärem und steroidabhängigem Verlauf (21,25).

Tabelle 1

Biologikatherapie bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Wirkstoff	Handelsname	Zulassungsinhaber	Wirkmechanismus	Zugelassen
Infliximab	Remicade®/Inflectra®	Centocor B.V./Pfizer	TNF- α -Inhibitor	ab 6 Jahren
Adalimumab	Humira®	AbbVie	TNF- α -Inhibitor	Ab 6 Jahren
Certolizumab pegol	Cimzia®	UCB Pharma SA	TNF- α -Inhibitor	keine Zulassung ^b
Golimumab ^a	Simponi®	Janssen Biologics B.V.	TNF- α -Inhibitor	ab 18 Jahren
Vedolizumab ^a	Entyvio®	Takeda Pharma A/S	α 4 β 7-Integrin-Inhibitor	ab 18 Jahren
Ustekinumab ^a	Stelara®	Janssen-Cilag International	IL-12/23-Inhibitor	ab 18 Jahren
Mirikizumab ^a	Omvoh®	Eli Lilly Nederland B.V.	IL-23-Inhibitor	ab 18 Jahren
Risankizumab ^a	Skyrizi®	AbbVie	IL-23-Inhibitor	ab 18 Jahren

Anmerkung. TNF- α = Tumornekrosefaktor- α , IL-12 = Interleukin-12, IL23 = Interleukin-23. CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankung

^a Können aufgrund fehlender Zulassung im pädiatrischen Bereich nur Off-Label verwendet werden.

^b Trotz Wirksamkeit zur Remissionserhaltung ist Cimzia® in Österreich nicht für die Therapie von CED zugelassen (87).

Small molecules sind immunmodulatorische Medikamente, die oral eingenommen werden können. Sie umfassen die Januskinase(JAK)-Inhibitoren und Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor(S1PR)-Modulatoren (siehe Tabelle 2). Die JAK-Familie umfasst die Subtypen JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosinkinase-2 (88). Sie tragen einen wichtigen Teil zur Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren bei und beeinflussen so unter anderem die Hämostase und das Immunsystem. Filgotinib (Jyseleca®) und Upadacitinib (Rinvoq®) sind selektive JAK1-Inhibitoren, wohingegen Tofacitinib (Xeljanz®) grundsätzlich alle JAK inhibieren kann (77). Zu den S1PR-Modulatoren zählen zurzeit lediglich zwei Substanzen. Im Unterschied zu den anderen Medikamentengruppen besitzen beide S1PR-Modulatoren nur eine Zulassung zur CU-Therapie. Ozanimod (Zeposia®) wirkt auf S1PR-1 und S1PR-5 wodurch es zu einer Erniedrigung der zirkulierenden Lymphozyten im Blut kommt (89). Das in diesem Jahr neu zugelassene Präparat Etrasimod (Velsipity®) ist ein selektiver S1PR-1, S1PR-4 und S1PR-5 Agonist mit ähnlicher Wirkung zu Ozanimod (90).

Tabelle 2

Small molecules bei Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Wirkstoff	Handelsname	Zulassungsinhaber	Wirkmechanismus	Zugelassen
Filgotinib ^a	Jyseleca®	Galapagos NV	JAK1-Inhibitor	ab 18 Jahren
Upadacitinib ^a	Rinvoq®	AbbVie	JAK1-Inhibitor	ab 18 Jahren
Tofacitinib ^a	Xeljanz®	Pfizer	JAK1/JAK3-Inhibitor ^b	ab 18 Jahren
Ozanimod ^a	Zeposia®	Bristol-Myers Squibb Pharma	S1PR-1/5-Agonist	ab 18 Jahren
Etrasimod	Velsipity®	Pfizer	S1PR-1/4/5-Agonist	ab 16 Jahren

Anmerkung. JAK = Januskinase, S1PR = Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor

^a Können aufgrund fehlender Zulassung im pädiatrischen Bereich nur Off-Label verwendet werden.

^b Tofacitinib hemmt bevorzugt JAK1 und JAK3, kann aber grundsätzlich alle JAK inhibieren (77).

Jede Therapie sollte möglichst individuell auf die Betroffenen zugeschnitten sein und eine Verbesserung der Symptome sowie einen Rückgang der Entzündung fördern. Neben den medikamentösen Therapiemöglichkeiten gibt es auch unkonventionelle Methoden wie Stammzelltherapie, Leukapherese oder mikrobielle Verfahren (77). Zu letzteren zählen der probiotische Bakterienstamm E. coli Nissle 1917 (Mutaflor®) und die fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT). Die Wirkung der FMT ist bei Clostridium difficile Infektion bereits nachgewiesen und zeigt auch bei CED positive Ergebnisse (91,92). Auch eine Heilung der CU mittels totaler Proktokolektomie ist möglich und sollte bei entsprechender Indikation in Betracht gezogen werden (21).

1.3 CED in der Pädiatrie

Viele Krankheiten, wie z.B. COVID-19, weisen Unterschiede zwischen pädiatrischer und adulter Manifestation auf, so auch CED (93). Die Mortalität von Patientinnen und Patienten mit Erstmanifestation einer CED in der Kindheit oder Jugend ist dreimal höher als in der Normalbevölkerung (94). Wie zuvor erwähnt können bei CED extraintestinale Manifestationen wie Arthritis und Uveitis auftreten. 22% der Kinder mit CED werden erstmals mit solchen unspezifischen extraintestinalen Symptomen wie Anämie, Wachstumsstörungen oder perianaler Beteiligung vorstellig (95). Malabsorption, verminderte Nahrungszufuhr, chronische Inflammation und Einnahme von Corticosteroiden sind häufige Auslöser von Wachstumsstörungen bei pädiatrischen CED-Patientinnen und Patienten. 40% der Kinder mit MC und 10% der von CU-betroffenen Kinder weisen Wachstumsstörungen auf (20). Zusätzlich zum Wachstum kann auch das Einsetzen der Pubertät verspätet sein (96,97). Chronische Entzündungen, wie sie bei CED stattfinden, haben einen negativen Effekt auf den Knochenstoffwechsel und können so die Knochenmasse verringern (98). Es kommt zu einer Verminderung der

Knochen trabekel und zu einer Abnahme der Muskelmasse wodurch Kinder mit CED ein höheres Risiko tragen im späteren Leben an Osteoporose zu erkranken (96,99).

Eine weitere Folge von chronischer Entzündung ist die Entwicklung von Neoplasien. CU stellt eine fakultative Präkanzerose für das kolorektale Karzinom (KRK) dar (100). Bei MC ist das Risiko ein KRK zu entwickeln ebenfalls erhöht, wobei hier auch Adenokarzinome des Dünndarms häufiger als in der Normalbevölkerung auftreten können (101). Durch CED entstehen ca. 1-2% der KRK und von allen CED-Patientinnen und Patienten sterben annähernd 15% an solch einem Tumor (102). Das Risiko wird nochmals erhöht durch einen frühen Krankheitsbeginn und längere Erkrankungsdauer (20,102,103). Acht bis zehn Jahre nach der Erstmanifestation einer CED erhöht sich das Risiko ein KRK zu entwickeln um 0,5-1% pro Jahr. Nach 30 Jahren beträgt das Karzinomrisiko sogar 18%. In einer Studie von Brackmann et al. entstand bei 21% der CED-Kohorte innerhalb von zehn Jahren nach Erstmanifestation ein KRK (104). Daher sind Kinder mit CED besonders gefährdet im späteren Leben ein KRK zu entwickeln.

Kinder mit MC präsentieren sich bei Erstmanifestation eher mit einer Beteiligung des Colons (Colitis, Ileocolitis), wohingegen Erwachsene häufiger eine Entzündung des terminalen Ileums aufweisen (97). Ebenso wie bei MC gibt es auch bei CU Unterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern. Bei Erstmanifestation im Erwachsenenalter ist die häufigste Form die linksseitige Colitis ulcerosa (105). Manifestiert sich die Krankheit hingegen in der Kindheit, präsentieren sich die meisten mit einer Pancolitis (97).

Eine spezielle Manifestation von CED, die besonders häufig in der Kindheit auftritt, ist die IBDU. Die Prävalenz von IBDU-Manifestation bei Kindern ist doppelt so hoch wie bei den Erwachsenen. Etwa 13% der Kinder mit CED leiden an IBDU, wohingegen es bei Erwachsenen nur 6% sind (106). Wenn in der histologischen und endoskopischen Diagnostik eine chronische Entzündung des Colons gefunden wird, ohne spezifische Zeichen eines MC oder einer CU, dann lautet die Diagnose in den meisten Fällen IBDU. Derzeit handelt es sich bei IBDU noch um eine Ausschlussdiagnose, bei der entweder keine eindeutigen Befunde oder Zeichen von beiden CED-Subtypen vorhanden sind (19,107). Oft wird die Diagnose im weiteren Verlauf der Krankheit noch revidiert und es stellt sich bei Kontrollen doch

eine CU oder ein MC heraus. Hier unterscheiden sich auch die Ergebnisse verschiedener Studien (19). Die Rediagnoseraten schwanken von ca. 20% bis hin zu 80%. Am häufigsten wurde die Diagnose zu CU geändert, wobei es auch Untersuchungen mit höheren MC-Raten gibt. Ob die Diagnose IBDU nun eine eigene Entität von CED oder eine vorübergehende Diagnose darstellt, ist noch nicht vollständig geklärt (19). CU sowie IBDU weisen ähnliche Lokalisationen im Colon auf und manifestieren sich am häufigsten als Pancolitis (108). Bei Kindern ist bei CU auch am häufigsten das gesamte Colon entzündet. Wiederum präsentiert sich MC im Kindesalter häufig mit einer Beteiligung des Colons. Diese Ähnlichkeiten sind vermutlich der Grund für die Verwirrung bezüglich Ursache und Diagnostik von IBDU. Ebenso lassen sich hiermit die hohen Zahlen an IBDU-Diagnosen im Kindesalter erklären.

Die Lebensqualität von Kindern und Jugendlichen mit CED ist stärker eingeschränkt als die von gesunden Gleichaltrigen (109). Ebenso leiden sie häufiger an Depressionen als Gleichaltrige mit anderen chronischen Erkrankungen. Neben der Belastung aufgrund der Symptome und der sozialen Tabuisierung von CED an sich sind mögliche Faktoren, die eine Depression begünstigen, die verminderte Schlafqualität durch nächtlichen Stuhlgang und die Einnahme von Corticosteroiden (110). Psychische Belastungen spielen auch bei den Erwachsenen mit CED eine Rolle, jedoch ist die Kindheit und Jugend eine Zeit von großen Veränderungen im Leben. Für viele Jugendliche ist dies nicht nur wegen der hormonellen Umstellungen und Veränderungen, die ihr Körper durchläuft, sondern auch aufgrund der wichtigen Entscheidungen, die sie für ihr späteres Leben treffen müssen, eine schwierige Zeit. In dieser Lebensphase ist die Diagnose einer chronischen Krankheit viel schwieriger zu verarbeiten als im späteren Leben.

1.4 Zusammenspiel zwischen Gerinnung und Entzündung

Chronische Entzündungen entstehen oft aus einem Zusammenspiel von inflammatorischen Prozessen und dem Gerinnungssystem. Die Hämostase ist ein komplexer Prozess, der in mehreren Einzelschritten die Blutstillung im Körper bewirkt. Das gesamte Gerinnungssystem muss ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Koagulation und Antikoagulation aufrechterhalten, um

einerseits Blutungen stoppen zu können, und andererseits die Bildung von venösen Thromboembolien (VTE) und anderen thrombotischen Komplikationen zu verhindern. Unter VTEs fallen Erkrankungen wie tiefe Beinvenenthrombosen und Pulmonalarterienembolie (PAE).

Die Hämostase kann man in eine primäre und sekundäre Phase einteilen. Die primäre Hämostase beginnt mit einer Verletzung der Endothelwand und der Freilegung von subendothelialen Schichten. Im Subendothel befinden sich hoch thrombogene Stoffe wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF), Laminin und Thrombospondin (111). Nun bindet sich Kollagen an den Glykoprotein-(GP)-Komplex GP Ia/IIa und GP VI, ebenso wie vWF an GP Ib/IX/V der Thrombozytenoberfläche bindet und lösen so die Thrombozytenadhäsion aus (112). Durch die Adhäsion schütten Thrombozyten Thromboxan A₂ und Serotonin aus, welche gemeinsam mit Prostaglandinen zu einer Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes führen und so den Blutfluss verlangsamen. Neben Thromboxan A₂ und Serotonin beinhalten Thrombozyten noch mehrere wichtige Stoffe, die in zwei Speichergranula verteilt sind. Die α -Granula beinhaltet Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin, Faktor V (FV), Faktor VIII (FVIII), vWF, Platelet-derived growth factor und Plättchenfaktor 4 (111,113). In der δ -Granula findet man unter anderem die Stoffe Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Calcium, Serotonin, Histamin und Adrenalin. Als letzter Schritt der primären Hämostase folgt die Thrombozytenaggregation. Die Thrombozyten verändern nun ihre Form und bilden Pseudopodien aus, um sich aneinander und am Endothel festzuhalten. Die Bindung von ADP verursacht eine Konformationsänderung des GP IIb/IIIa, welcher auf der Thrombozytenoberfläche die Aufgabe hat, Fibrinogen zu binden. Diese vorerst reversible Vernetzung von Thrombozyten wird durch das ausgeschüttete Thrombospondin irreversibel. Parallel hierzu wurde bereits eine geringe Menge an Thrombin generiert, welche die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin weiter katalysiert und so den entstehenden Thrombus stabilisiert. Die Freisetzung von Thromboxan A₂ wirkt vasokonstriktorisch und propagiert die weitere Thrombozytenaggregation. Am Ende dieser primären Blutstillung steht ein weißer Plättchenthrombus, welcher die Wunde initial abdichtet.

Die sekundäre Hämostase, oder auch plasmatische Gerinnung genannt, ist jener Schritt, der die Blutgerinnung im eigentlichen Sinne beschreibt. Traditionell

wurde das Gerinnungssystem in einen extrinsischen und intrinsischen Weg geteilt. Die Gerinnungsfaktoren liegen im Blut in ihrer inaktivierten Form vor. Die aktivierte Form wird über ein kleines „a“ am Ende gekennzeichnet. Der extrinsische Weg beginnt analog zur primären Hämostase mit einer Verletzung der Gefäßwand (111,112). Hier kommt Faktor VII (FVII) in Kontakt mit Tissue Factor (TF) bzw. Faktor III. TF ist ein Membranprotein welches von subendothelialen Zellen, wie glatten Muskelzellen oder Fibroblasten, exprimiert wird. Zusammen mit Calcium bilden TF und FVIIa die extrinsische Tenase und führen zur Aktivierung von Faktor X (FX). Parallel wird im intrinsischen Weg über Kontaktaktivierung von Faktor XII (FXII), durch Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen (HMWK), schließlich Faktor XI (FXI) aktiviert. FXIa aktiviert Faktor IX (FIX), welcher mit seinem Cofaktor, dem aktivierten FVIII, und Calcium die intrinsische Tenase bildet und ebenfalls FX aktiviert. FVIII wird durch seine Bindung an vWF vor vorzeitiger Aktivierung im Blut geschützt. Bei der primären Hämostase wird dieser jedoch freigesetzt und von Thrombin zu FVIIIa umgesetzt. Die gemeinsame Endstrecke besteht aus der Bildung eines Komplexes aus Calcium, FXa und aktiviertem FV. Dieser Komplex spaltet nun Prothrombin in das aktive Thrombin. Durch die starke Thrombingeneration wird Fibrinogen in einzelne Fibrin-Monomere gespalten, welche sich zu einem Fibrinnetz ausbilden. Zusätzlich wird von Thrombin Faktor XIII (FXIII) in FXIIIa umgesetzt. FXIIIa führt zu einer kovalenten Quervernetzung der Fibrin-Monomere und erhöht so die Stabilität des Fibrinnetzes. Der physiologische Ablauf der Gerinnung in vivo wird so nur bedingt abgebildet, weshalb mehrere Studien andere Modelle zum Verständnis der Gerinnung beschreiben (114,115). Diese Modelle deuten eher auf eine unterstützende Aufgabe des intrinsischen Weges in der Thrombingeneration hin (111). Die rein endogene Aktivierung über Präkallikrein und HMWK trägt eine untergeordnete Rolle in der Gerinnungskaskade. Dies wird besonders klar bei Menschen mit Präkallikrein, HMWK, FXI (Hämophilie C) oder FXII Defizienz, welche nur geringe oder keine Störungen der Hämostase aufweisen (116–119).

Wiederum eine große Rolle tragen FXI und FXII im Zusammenspiel zwischen Gerinnung und Entzündung durch die Verbindung mit dem KKS (120). Das KKS ist ein System aus Proteinen, welches entzündliche Prozesse begünstigt, indem es das stark entzündungsfördernde Bradykinin freisetzt (119). Am Beginn des KKS

steht die Autoaktivierung von FXII in FXIIa durch negativ geladene Oberflächen. Ergebnisse weiterer Studien legen jedoch nahe, dass nicht nur negativ geladene Oberflächen, sondern jegliche Art von künstlichen oder biologischen Oberflächen ungeachtet ihrer Ladung die Autoaktivierung von FXII in Gang setzen können (119,121). Zu diesen potenziellen Aktivatoren gehören neben Gefäßwandschäden, RNA und DNA auch anorganische Polyphosphate (PolyP), wie sie von aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet oder auf Bakterienoberflächen exprimiert werden (9,122,123). Diese Kontaktaktivierung wird in Anwesenheit von HMWK und Präkallikrein weiter beschleunigt (119). FXIIa wandelt nun Präkallikrein, welches im Plasma als Komplex an HMWK gebunden vorkommt, in Kallikrein um, wodurch rückwirkend wieder mehr FXII aktiviert wird (124). Kallikrein spaltet daraufhin HMWK und führt so zur Freisetzung von Bradykinin. Über die Bindung an die G-Protein gekoppelten Bradykinin B1 und B2 Rezeptoren (B2R) verursacht Bradykinin entzündungsfördernde Prozesse wie Vasodilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität (125). Neben der Initiation des KKS durch FXIIa, kann Präkallikrein auch durch die an Endothelzellen gebundene Prolylcarboxypeptidase aktiviert werden (126).

Zusätzlich zur Aktivierung des KKS kann FXIIa über FXI den intrinsischen Weg der Gerinnung in Gang setzen und so zur Thrombingeneration führen. Durch die Aktivierung von FXI wird in weiterer Folge die intrinsische Tenase gebildet und Thrombin generiert. Das generierte Thrombin kann rückwirkend wieder FXI aktivieren, wodurch der intrinsische Weg auch gänzlich unabhängig von FXIIa ablaufen könnte (120). Dieser Ablauf funktioniert auch rückwärts, indem FXI durch Thrombin aktiviert wird und dann FXII in FXIIa umsetzt, wodurch in weiterer Folge Präkallikrein zu Kallikrein gespalten und das KKS aktiviert wird. Das KKS und die Gerinnung beeinflussen sich gegenseitig und arbeiten in den ersten Schritten der Gerinnungskaskade sowie bei Entzündungen Hand in Hand.

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) sind eine Untergruppe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die mitunter im gesamten Körper exprimiert werden. PARs auf Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten spielen eine große Rolle in Inflammation und Hämostase. Werden die auf Thrombozyten exprimierten Subtypen PAR-1 und PAR-4 durch Thrombin aktiviert führt dies zur Freisetzung ihrer Granula sowie zur Translokation von P-Selektin in die Thrombozytenmembran

(124,127). Blockiert man PAR-1 und PAR-4 hemmt dies die Thrombin-gestützte Aktivierung der Thrombozyten und verlangsamt so die Hämostase (128). P-Selektin befindet sich bei inaktivierten Thrombozyten in der α -Granula und stimuliert nach deren Aktivierung die Thrombozytenaggregation und Leukozytenrekrutierung (129,130).

Auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Fibroblasten befindet sich ebenfalls PAR-1, welches von Thrombin aktiviert werden kann. Dies führt zur Aktivierung von Endothelzellen und zur Translokation von P-Selektin und E-Selektin, ebenso wie zur Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), Monocyte-chemoattractant-protein-1, vascular-cell-adhesion-molecule-1 (VCAM-1), intercellular-cell-adhesion-molecule-1 (ICAM-1) und Interleukin-8 (124). Weiters führt die PAR-1 Bindung zur Produktion und Ausschüttung von IL-6, Interleukin-1 β (IL-1 β) und TNF- α (131,132). P-Selektin und die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 ermöglichen die Diapedese der Leukozyten (133,134). Unter Diapedese versteht man die Durchdringung der Endothelschicht und Transmigration ins entzündete Gewebe durch Leukozyten. Dieser Prozess kann entweder transjunktional, also zwischen den Endothelzellen (parazellulär), oder transzellulär, also durch das Zytoplasma, geschehen (135). Nach Aktivierung exprimieren Thrombozyten nicht nur P-Selektin, sondern auch den Cluster of Differentiation 40 Ligand (CD40L) (136). CD40L führt zur Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen wodurch die Transmigration und Chemotaxis von Leukozyten weiter gefördert wird.

IL-1 β aus aktivierten Thrombozyten verursacht eine vermehrte Produktion von oben genannten Zelladhäsionsmolekülen und IL-6 (137). Durch IL-6 werden verstärkt prothrombotische Stoffe wie Fibrinogen, TF, vWF und FXVIII produziert (138). Interleukin-1 α , ein weiterer Vertreter der Interleukin-1-Familie und ein proinflammatorisches Zytokin, kann auch durch Thrombin aktiviert werden (139).

Neutrophile Granulozyten nehmen, wie zuvor beschrieben, eine große Rolle in der Pathophysiologie von CED ein und beeinflussen ebenfalls die Hämostase. Die ausgeschütteten NETs fördern die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (140). Zudem binden sie Erythrozyten und führen zur Bildung eines

roten Thrombus. Hemmung von NETs mit DNase verlangsamte die Thrombusbildung sowie die Thrombozytenaggregation, und verminderte die Thrombozytenzahl (70,140). Die exakte Rolle von NETs in der Hämostase bleibt dennoch zurzeit unbeantwortet. Es finden sich widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Auswirkung von NETs auf die Thrombingeneration (141,142). Ebenso bleibt unklar, ob diese Beeinflussung durch NETs selbst, oder durch die einzelnen Bestandteile (hauptsächlich DNA und Histone) verursacht wird, da die Zugabe von DNase in Studien unterschiedliche Effekte zeigte (70,140–142).

Diese gegenseitige Beeinflussung des Gerinnungssystems und des Immunsystems ist essenziell bei Verletzungen, da hier die eindringenden Pathogene beseitigt werden müssen und die Heilung der Wunde indiziert werden muss. Sie etablieren eine Verbindung zwischen den beiden Systemen, welche bei chronischen Krankheiten aus dem Gleichgewicht geraten kann.

1.5 Gerinnung bei CED

CED-Patientinnen und Patienten haben ein zwei- bis dreifach höheres Risiko VTEs zu erleiden als die gesunde Population (10). Dies ist auch spezifisch für CED, da in einer Studie von Miehsler et al. nur Patientinnen und Patienten mit CED ein höheres Risiko für VTEs hatten, wohingegen Zöliakie- und rheumatoide Arthritis-Betroffene kein höheres Risiko aufwiesen (143). Kinder und Jugendliche sind laut einer dänischen Studie einem besonders hohen Risiko ausgesetzt (144). Die Kohortenstudie berichtete bei CED-Patientinnen und Patienten unter 20 Jahren eine sechsmal höhere Hazard Ratio für die Entwicklung einer VTE im Vergleich zu gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Gesunden.

Welche Zustände und Faktoren begünstigen nun das Entstehen eines thromboembolischen Ereignisses? Ein Faktor, der das Risiko für VTEs erhöht scheint die Krankheitsaktivität zu sein (10). In einer Studie von Solem et al. hatten ca. 80% der CED-Patientinnen und Patienten einen aktiven Schub zum Zeitpunkt an dem sie eine VTE erlitten (145). Dieselbe Studie zeigte auch ein vermehrtes Auftreten von VTEs bei Pancolitis ulcerosa und (ileo)colonischen MC. 76% der VTE-Fälle in der CU-Subgruppe wiesen eine Pancolitis auf und 56% einen ileocolonischen bzw. 23% einen colonischen MC-Befall. Somit wäre die Krankheitsausbreitung als zweiter Risikofaktor zu nennen. Auch zwischen den

CED-Subtypen gibt es unterschiedlich hohe Risiken. Die Prävalenz für VTEs ist höher bei jenen, die an CU leiden, als bei jenen die an MC erkrankt sind (146). Innerhalb der MC-Erkrankten weisen jedoch jene mit fistulierendem MC ein höheres Risiko für eine VTE auf. Zusätzlich gehen CED häufig mit erworbenen Risikofaktoren für thromboembolische Ereignisse wie Flüssigkeitsmangel, Immobilität und chirurgische Interventionen einher (147). Die VTE bezogene Mortalität von CED-Betroffenen ist etwa doppelt so hoch wie die von Patientinnen und Patienten, die nicht an CED leiden (146).

Auf hämatologischer Ebene zeigen sich während aktiver Entzündung sowie in Remission viele Veränderungen von Komponenten des Gerinnungssystems. Kume et al. berichteten, dass während eines CU-Schubes die Konzentration der Gerinnungsfaktoren FV, FVIII, FIX und FXI sowie von Fibrinogen und vWF im Vergleich zum inaktiven CU-Stadium erhöht ist (148). Ähnliche Ergebnisse beobachteten auch Alkim et al. in ihrer Stichprobe (11). Sie fanden bei CU und MC-Erkrankten unabhängig vom Krankheitsstadium eine Konzentrationserhöhung von FIX, Fibrinogen, vWF und PAI-1, sowie eine Erniedrigung der gerinnungshemmenden Stoffe Antithrombin und Protein S. Diese Veränderungen führen zu einer hyperkoagulativen Umgebung, wodurch VTEs und andere thromboembolische Ereignisse begünstigt werden. Ob dies eine Reaktion auf entzündliche Prozesse ist, oder ob CED per se einen prothrombotischen Zustand darstellt, bleibt derzeit noch unklar (10,12,146,147,149).

Als zentrale Zellen der Hämostase nehmen Thrombozyten auch bei CED eine wichtige Rolle ein. Wie zuvor erwähnt können Thrombozyten bei Aktivierung eine Vielzahl an proinflammatorischen Stoffen und Zytokinen ausschütten (129,130,136,137). P-Selektin ist einer dieser Entzündungsmediatoren und befindet sich in der Thrombozytengranula. Dieser Granulagehalt ist laut Järemo und Sandberg-Gertzen bei Thrombozyten von CED-Patientinnen und Patienten erhöht (150). Bei Aktivierung wird das thrombozytäre P-Selektin aus der α -Granula an die Oberfläche exprimiert, um dort mit Leukozyten zu interagieren (129,130). P-Selektin dient so als Zeichen der Aktivierung und wurde in einer Studie von Collins et al. zusammen mit GP53 und β -Thromboglobulin gemessen (13). So zeigten sie, dass Thrombozyten bei CED in einem daueraktiven Zustand im Blutkreislauf zirkulieren. Wie von Collins et al. ebenfalls berichtet wurde, können diese aktivierten

Thrombozyten nun vermehrt Aggregate bilden. Wenn Thrombozyten aktiviert werden, exprimieren sie CD40L, wodurch eine Reihe von proinflammatorischen Mechanismen ausgelöst werden (136). Thrombozyten von CED Patientinnen und Patienten weisen im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Anzahl an exprimierten CD40L auf ihrer Oberfläche auf und schütten bei Kontakt mit Endothelzellen vermehrt CD40L aus (151,152). Diese lösliche Form von CD40L tritt vermehrt im Plasma von MC und CU-Erkrankten auf und weist erneut auf eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten hin (152,153).

Die Fibrinolyse ist ein wichtiger Mechanismus zur Auflösung eines Thrombus und Wiederherstellung der ursprünglichen Bedingungen für einen normalen Blutfluss. Dieses System ist durch die chronische Entzündung gestört und trägt dadurch zur Hyperkoagulabilität bei CED bei. Die Serinprotease Tissue Plasminogen Activator (tPA) wird von Endothelzellen synthetisiert und setzt physiologisch das fibrinolytische System in Gang (154). Während tPA bei CED erniedrigt ist, wodurch die Fibrinolyse unzureichend getriggert wird, ist dessen Inhibitor PAI-1 erhöht (11,154). Die veränderten Konzentrationen dieser wichtigen Komponenten führen zu einer Hypofibrinolyse und letzten Endes zur Hyperkoagulabilität. Als Konsequenz dieser Hypofibrinolyse können die Ergebnisse von Owczarek et al. aus dem Jahr 2013 gesehen werden (155). Laut ihnen weisen CED-Patientinnen und Patienten dichte, lyseresistente Fibrinnetze auf, welche zum prothrombotischen Milieu beitragen.

Die Darmmucosa, der Brennpunkt der chronischen Inflammation bei CED, ist einer kontinuierlichen Stresssituation ausgesetzt und weist Veränderungen in der intestinalen Vaskularisation auf. Endothelzellen von intestinalen Blutgefäßen scheinen bei ulzerierender bzw. intensiver Inflammation der Mukosa das gerinnungsfördernde TF zu exprimieren (156). Besonders bei MC ist die mukosale TF-Expression nach zellulärer Infiltration der Lamina propria stark erhöht. Bei Verletzung der Darmwand können diese erhöhten TF-Konzentrationen in den Blutkreislauf gelangen, wodurch das Entstehen von Thrombosen begünstigt wird. Zudem beobachteten Dhillon et al. kapilläre Thrombosen in rektalen Biopsien von CU und MC-Erkrankten, jedoch keine bei gesunden Kontrollen (157).

Bei der Aufarbeitung der CED bezogenen Risikofaktoren für VTEs dürfen die Einflüsse der antiinflammatorischen und immunmodulierenden Medikamente nicht fehlen. Von den bereits erwähnten medikamentösen Therapiemöglichkeiten zeigt 5-ASA eine Inhibierung der spontanen sowie der Thrombin induzierten Thrombozytenaktivierung (158). Dadurch könnten die 5-ASA Präparate einen thromboprotektiven Effekt bei CED ausüben. Bei TNF- α -Blockern wurde der thromboprotektive Effekt in einer Studie von deFonseka et al. bereits nachgewiesen (159). TNF- α -Blocker wiesen ein erniedrigtes Risiko auf, (OR = 0.20, 95%-CI [0.04, 0.99], $p = .049$) eine VTE zu erleiden. Corticosteroide waren hingegen mit einer Vervierfachung (OR = 4.62, 95%-CI [1.98, 10.80], $p < .001$) des VTE-Risikos assoziiert. Dies zeigt auf, dass die Wahl der medikamentösen Behandlungsmethoden ebenso einen Einfluss auf thromboembolische Ereignisse bei CED hat, wie die Krankheit selbst.

Zum Abschluss werden hier noch kurz die Auswirkungen von CED auf die Thrombingeneration behandelt, da deren Messung ein zentraler Gegenstand dieser Arbeit ist. Die Messung der Thrombingeneration stellt einen globalen Test zur Beurteilung der Hämostase dar. Sie ermöglicht eine Aussage bezüglich Hyper- oder Hypokoagulabilität des Testplasmas. Ein wichtiger Parameter hierbei ist das endogene Thrombin Potential (ETP). Das ETP stellt die Fläche unter der Thrombin-Kurve dar und spiegelt die Balance zwischen gerinnungsfördernden und hemmenden Kräften wider (160). Betrachtet man nun die Thrombingeneration bei CED fallen einige Veränderungen auf. Wurde gemeinsam mit Thrombomodulin gemessen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung des ETP gegenüber Gesunden, besonders bei aktiver Entzündung und hohem CRP-Spiegel (161). In diesem Kontext sollen auch zwei in Graz durchgeführte Studien zur Thrombingeneration bei Kindern mit CED erwähnt werden. Auch hier war das ETP im Vergleich zu gesunden Kindern sowohl bei MC als auch bei CU erhöht (162,163). Weiters beobachteten Bernhard et al. eine positive Korrelation zwischen dem Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) und den Parametern ETP, peak height sowie time to peak (TTP) (163). Peak height bezieht sich auf die maximale Menge des generierten Thrombins, also die Spitze der Kurve, und TTP auf die Zeit, die man braucht, bis diese Spitze erreicht wurde.

1.6 PolyP in der Gerinnung und Inflammation

PolyP ist ein Molekül, welches aus unterschiedlich langen, über Phosphoanhydrid-Bindungen verbundenen, Phosphatbausteinen besteht (164). Je nachdem wo PolyP auftritt bzw. von wem es produziert wird, findet man unterschiedliche Kettenlängen und Wirkungen. So weisen Mikroorganismen Kettenlängen von bis zu tausenden Phosphatmonomeren auf, wohingegen humanes PolyP aus bis zu 100 Monomeren besteht (165,166). Neben der kürzlich entdeckten antiviralen Wirkung in Bezug auf COVID-19 wurde auch der Einfluss von PolyP auf die Hämostase untersucht (167). Erste Hinweise auf diesen Einfluss lieferten zwei Studien von Nieuwenhuis et al. und Ruiz et al. aus 1987 bzw. 2004 (168,169). Nieuwenhuis et al. untersuchten Patientinnen und Patienten mit Storage-pool-Disease und zeigten bei diesen eine verlängerte Blutungszeit sowie Störungen der *in vitro* Aggregation (169). Thrombozyten von Storage-Pool-Disease Betroffenen weisen verminderte Granula auf und sind demnach in ihrer Aktivierung behindert. Die Verbindung zu PolyP lieferte dann eine Entdeckung von Ruiz et al. etwa zwei Jahrzehnte später. Sie wiesen nach, dass die thrombozytäre δ -Granula hohe Konzentrationen von PolyP mit einer mittleren Länge von 70-75 Monophosphaten aufweist (168). Dieser Zusammenhang wurde fünf Jahre später durch den Nachweis von geringeren PolyP-Konzentrationen in Thrombozyten bei δ -Storage-pool-Disease weiter gefestigt (170). Aktivierte Thrombozyten geben so nach ihrer Degranulation große Mengen an potenziell gerinnungsaktiven PolyP in den Blutkreislauf ab.

Wie übt PolyP nun seine prokoagulativen Wirkungen auf die Komponenten der Hämostase aus? Von Thrombozyten ausgeschüttetes PolyP fungiert, durch seine anionischen Eigenschaften, als Cofaktor für die Thrombin gestützte FXI-Aktivierung (171). FXIa kann daraufhin, wie bereits erwähnt, weiteres Thrombin generieren, wodurch wiederum über einen positiven Feedback-Loop mehr FXI aktiviert wird. Eine zweite Möglichkeit die Thrombingeneration zu beschleunigen, besteht über FVa. Thrombozytäres PolyP beschleunigt die FXIa-vermittelte Aktivierung von FV und ermöglicht diese Reaktion sogar bei niedriger FXIa-Konzentration (172). Längere PolyP-Moleküle (> 200 Monomere), wie sie in Mikroorganismen vorkommen, beschleunigen diese FV-Generation um ein

Vielfaches (172). Diese durch mikrobielles PolyP ausgelöste Überaktivierung kann im Rahmen von pathologischen Prozessen zu Thrombosen führen.

Bislang wurden Studien zur Rolle von PolyP in unterschiedlichen akuten sowie chronischen Pathologien durch fehlende Messmethoden erschwert. Durch den Eingriff von PolyP in die Thrombingeneration über die Inhibierung von Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) gelingt es jedoch indirekt, dessen Konzentration zu bestimmen. Einer Forschergruppe um Smith et al. gelang es als Erstes diese Fähigkeit nachzuweisen (173). TFPI gehört zusammen mit Antithrombin III und Protein C zu den physiologischen Antikoagulantien des Körpers. TFPI ist ein reversibler Inhibitor von FXa sowie FVIIa und greift daher in die Thrombingeneration ein (174). Smith et al. zeigten, dass PolyP mit einer Kettenlänge von 75 Phosphatmonomeren in der Lage ist, die gerinnungshemmende Wirkung von TFPI aufzuheben (173). Auch hier spielt, wie bei der FXIa-vermittelten FV-Aktivierung, die Kettenlänge eine wichtige Rolle. Kettenlängen von 25-75 Monomere reichten aus, um den antikoagulativen Effekt von TFPI zu neutralisieren, wohingegen diese Beobachtung bei einer Kettenlänge von drei oder weniger ausblieb. Jene Wirkung auf die Hämostase ist zentral für diese Arbeit und ermöglicht erst eine Diskussion über die Rolle von PolyP in der Pathophysiologie von CED.

Der Unterschied zwischen langkettigem (mikrobiellem) und intermediärkettigem (thrombozytärem) PolyP zeigt sich besonders im Einfluss auf die Kontaktaktivierung. PolyP, welches von Thrombozyten ausgeschüttet wird, weist eine Kettenlänge von durchschnittlich 60-100 Monomeren auf (166,168). Aus 75 Phosphatmonomeren bestehendes PolyP beschleunigte in vitro die Gerinnung maßgeblich (173). Dieser Effekt ist auf die Kontaktaktivierung von FXII zurückzuführen, da PolyP in FXII-depletiertem Plasma keine Blutgerinnung auslösen konnte (9,173,175). Sehr lange PolyP-Moleküle ab 1000 Kettengliedern waren hier sogar noch potentere Trigger (175). Müller et al. untersuchten die Komponenten der Kontaktaktivierung mittels Western Blot und wiesen nach, dass eine Konzentration von $\geq 2\mu\text{g/ml}$ PolyP die Gerinnungsfaktoren FXI und FXII in ihre aktive Form überführen kann (9). Somit zeigt sich eine über FXII medierte Initiation der Gerinnungskaskade in Abhängigkeit von der Kettenlänge, wobei PolyP aus humanen Thrombozyten eine geringe Potenz dahingehend aufweist. Eine Studie von Verhoef et al. ergab einen neuen Weg wie thrombozytäres PolyP die

Kontaktaktivierung stärker triggern kann (176). Sie wiesen nach, dass PolyP auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten über Calcium-Ionen gebunden ist. Auf der Oberfläche gebundenes PolyP liegt in Form von Nanopartikeln vor und weist eine viel größere Kettenlänge auf als im Blut zirkulierendes PolyP. Diese Nanopartikel fungieren als potenter FXII-Aktivator in vivo. Die Hypothese, dass PolyP über FXII die Gerinnung aktivieren und somit auch zu Thrombosen führen kann, wurde von Müller et al. in vivo getestet. In ihrem Versuch applizierten sie exogenes PolyP in Wildtyp Mäuse und FXII-Knockout Mäuse (9). Während Mäuse ohne endogene FXII-Produktion zum Großteil überlebten, starben signifikant mehr Wildtyp Mäuse nach PolyP-Infusion an einer PAE.

Neben der hämostatischen Seite über die Kontaktaktivierung interagiert PolyP auch auf der inflammatorischen Seite mit Komponenten des KKS. Das KKS stellt eine wichtige Brücke zwischen Gerinnung und Entzündung dar und wirkt über mehrere Komponenten proinflammatorisch. Um den Einfluss von PolyP hier in vivo nachzuweisen, wurde PolyP sowie Bradykinin in Wildtyp und B2R-Knockout-Mäuse infundiert (9). Über B2R löst Bradykinin erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation aus. Sowohl PolyP als auch Bradykinin führten in Wildtyp Mäusen zu erhöhter Permeabilität und Vasodilatation sowie in weiterer Folge zu Ödemen. In B2R-Knockout Mäusen konnte keiner der beiden Stoffe diese Folgen auslösen, was darauf schließen lässt, dass PolyP über Freisetzung von Bradykinin proinflammatorisch wirkt.

Abschließend lässt sich somit sagen, dass sowohl PolyP mikrobiellen Ursprungs als auch PolyP thrombozytären Ursprungs mit dem Gerinnungssystem interagieren und über FXII, sowie dem KKS potenziell proinflammatorisch und prothrombotisch wirken kann.

1.7 Potenzielle Rolle von PolyP bei CED

Die prothrombotische und proinflammatorische Rolle von PolyP im Blutkreislauf wirft die Frage auf, ob PolyP eine ähnliche Wirkung im Darmlumen aufweist. Aufgrund der höheren Potenz von langkettigen PolyP, die Gerinnung sowie Entzündungen zu beeinflussen, sind besonders Bakterien des Darmmikrobioms als mögliche Verursacher von pathologischen Prozessen anzusehen. Erstaunlicherweise zeigen sich jedoch positive Effekte von im Darm freigesetztem

PolyP auf die Barrierefunktion und chronische Inflammation. Probiotika, wie *Lactobacillus brevis* und andere Bakterien des Darmmikrobioms, produzieren PolyP und setzen es im Darmlumen frei (177). Dieses aus *L. brevis* gewonnene PolyP führte zur Upregulation von Heat-Shock-Protein-27 (HSP27) und in weiterer Folge zur vermehrten Expression von tight junctions (177). Darüber hinaus weist HSP27 antiinflammatorische Eigenschaften auf und reguliert die TNF- α -medierte Aktivität vom NF- κ B (178). Ein Marker für chronische Entzündungen im Darm ist die Barrierefunktion. Bei starker Entzündungsaktivität können die Enterozyten die Darmbarriere nicht aufrecht halten und es kommt zur Leakage von Darmbestandteilen in den Blutkreislauf. Segawa et al. induzierten solch eine geschwächte Darmbarriere im Dünndarm von Mäusen mittels NH_2Cl und applizierten PolyP (177). PolyP verbesserte daraufhin die intestinale Permeabilität über Bindung an das Integrin β 1 und Aktivierung des p38-MAPK-Pathways. Weiters verbesserte die tägliche rektale Gabe von PolyP die Überlebensrate und Entzündungsaktivität in einem DSS-induzierten Colitis Maus Modell.

Eine weitere Folge von langanhaltender chronischer Entzündung ist die Fibrosierung der Darmwand. Besonders beim fibrostenotischen MC spielt Fibrose eine große Rolle (25). Bereits 1990 wurden chronische Entzündungen sowie Fibrosierung als Ursache für eine Verkürzung des Colons im DSS-Colitis Modell verantwortlich gemacht (179). Kashima et al. und Isozaki et al. zeigten, dass PolyP diese Verkürzung wieder teilweise rückgängig machen kann (180,181). Das Colon von DSS-Colitis-Mäusen war bei PolyP-Gabe gegenüber Gabe von phosphatgepufferter Salzlösung signifikant länger. Ebenso war die Entzündungsaktivität im Colon und die submukosale Fibrose bei PolyP-Gabe geringer (180). Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Reversibilität des verkürzten Colons erreichten Fujiya et al. mit einer beschichteten Kapsel, um den vorzeitigen Abbau von langkettigem PolyP im Magen zu verhindern (182). PolyP wirkt somit nicht nur der Entzündung im Colon, sondern auch der Fibrosierung entgegen.

PolyP interagiert in mehreren Studien auch direkt mit Komponenten des Immunsystems. Unter PolyP-Applikation senkten sich die im DSS-Colitis-Modell erhöhten mRNA-Spiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 (180–182). Diese Zytokine spielen eine große Rolle in der Pathophysiologie von CED und beeinflussen wiederum nicht nur die chronische Inflammation, sondern

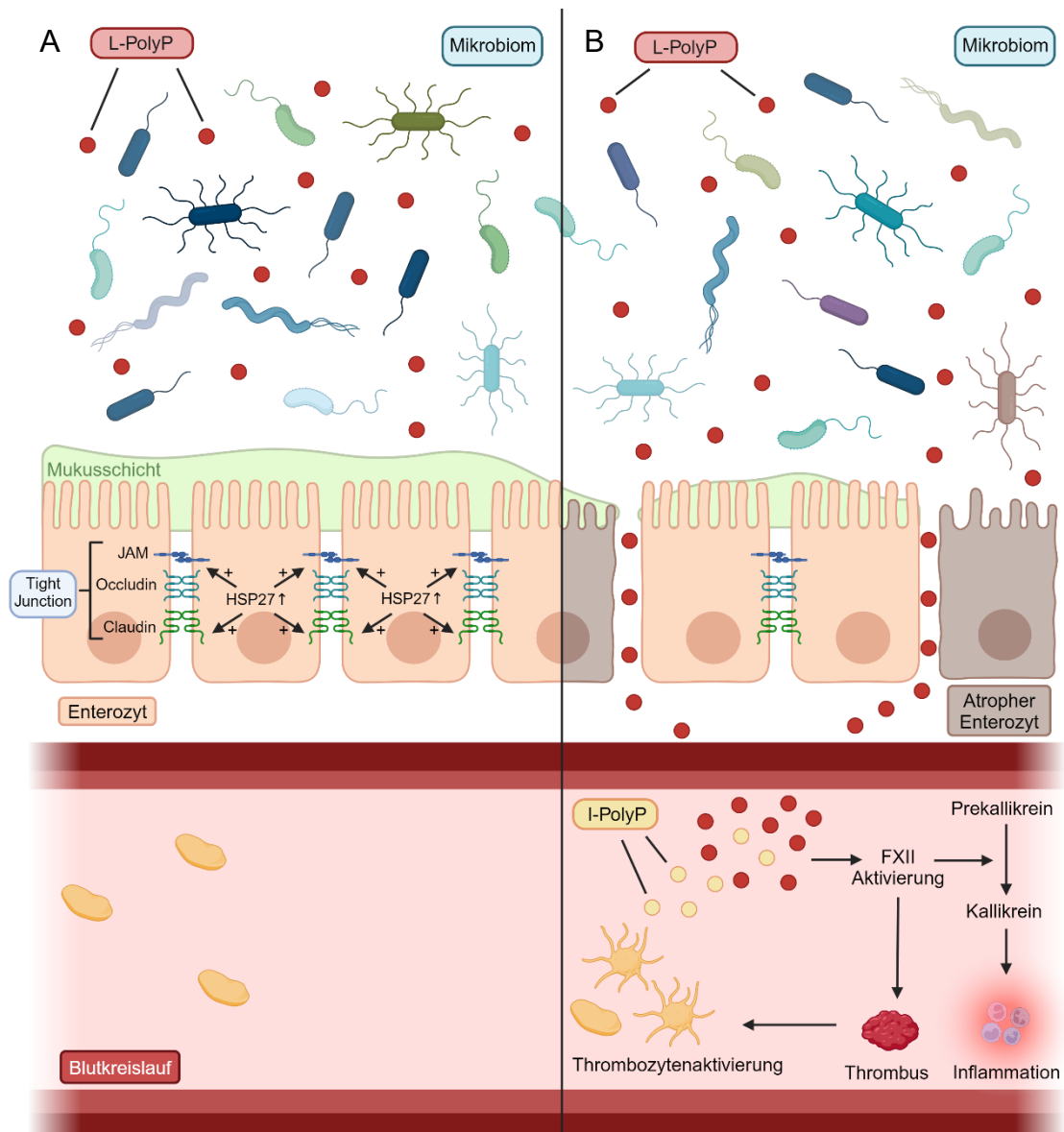
auch das Gerinnungssystem. PolyP beeinflusst das Gerinnungssystem im Blutkreislauf negativ. Wird jedoch von probiotischen Bakterien produziertes langkettiges PolyP im Darm freigesetzt, führt es über Akkumulation von Thrombozyten in der entzündeten Darmwand zu einer Besserung der Inflammation und der Wundverhältnisse (181). Dies geschieht über die Freisetzung von wundheilungsfördernden Mediatoren durch Thrombozyten ohne Erhöhung des Thromboserisikos.

Die 5-ASA Präparate Mesalazin und Sulfasalazin sind bei vielen CED-Betroffenen im Einsatz und werden besonders in der CU-Therapie als Goldstandard angesehen. Eine Studie von Dahl et al. liefert neue Hinweise über die potenzielle Rolle von PolyP in der Pathophysiologie von CU. Sie wiesen nach, dass Mesalazin die Polyphosphatkinase, ein Enzym, welches Bakterien zur PolyP-Produktion benötigen, hemmt (183). Dieses Enzym findet sich nicht nur in pathogenen Bakterien, sondern auch in jenen des Darmmikrobioms. Eine Hemmung dieses Enzyms führt zu reduzierter Kolonisation und Biofilmbildung, sowie zu oxidativen Stress. So könnte Mesalazin verhindern, dass Bakterien in entzündeten Darmbereichen überleben und dort die Darmpassage überqueren und so bakterielles PolyP im Blut freisetzen. Dies könnte eine Komponente des bisher noch unklaren antiinflammatorischen Wirkmechanismus von Mesalazin sein.

Dass die antiinflammatorische Wirkung von Mesalazin zumindest teilweise auf dem gehemmten PolyP-Stoffwechsel von Bakterien beruht, unterstreicht die entzündungs- sowie gerinnungsfördernden Effekte von PolyP im Blutkreislauf. Besonders langkettiges PolyP ist äußerst potent in der FXII-Aktivierung und führt daher zur Aktivierung des Gerinnungssystems sowie des KKS (9,173,175). Daraus ergibt sich eine proinflammatorische und prothrombotische Umgebung, welche sowohl chronische Entzündungen als auch VTEs bei CED begünstigen kann. Konträr dazu führt PolyP im Darmlumen zu einer Besserung der Wundheilung, Inflammation und Fibrosierung (180–182).

Abbildung 1

Rolle von PolyP in Abhängigkeit der Lokalisation



© Meyer. Created with BioRender

Anmerkung. L-PolyP = langkettiges PolyP, I-PolyP = intermediärkettiges PolyP, FXII = Faktor XII, JAM = Junctional Adhesion Molecules, HSP27 = Heat Shock Protein 27. (A) Bei intakter Barrierefunktion verbleibt PolyP im Darmlumen und führt so über Upregulation von HSP27 zur vermehrten Expression von tight junctions. (B) Wenn durch fortschreitende Entzündung die Darmbarriere geschädigt wird, gelangt bakterielles PolyP in den Blutkreislauf und fördert hier gemeinsam mit thrombozytärem PolyP die Entstehung von Thrombosen und inflammatorische Prozesse.

So ergibt sich eine Dualität der PolyP-Wirkungen basierend auf dessen Lokalisation (siehe Abbildung 1). Ein zusätzlicher Faktor ist die Schwere und Dauer der Erkrankung. Bei intakter Barrierefunktion der Darmwand verbleibt PolyP im Darmlumen und führt dort zur Remission der Erkrankung. Mit fortschreitender Entzündung und daraus resultierender geschädigter Darmbarriere gelangt PolyP vom Darm ins Blut und fördert inflammatorische Prozesse. Daraus ergibt sich nicht nur eine Abhängigkeit der Lokalisation, sondern auch des Erkrankungsstadiums.

Warum ist nun die Rolle von PolyP in der Pathophysiologie von CED so wichtig? Die proinflammatorische und prothrombotische Wirkung von PolyP im Blut kann Basis für neue Therapiekonzepte sein. Mittels nicht toxischer PolyP-Inhibitoren, wie z.B. dem Enzym Exopolyphosphatase, könne man die Folgen von bakteriellem PolyP im Blutkreislauf neutralisieren (184). Solche PolyP-Inhibitoren zeigten bereits, dass sie thromboprotektiv wirken, ohne die Hämostase zu beeinflussen (184,185). Aber auch die remissionsinduzierenden Eigenschaften von PolyP im Darmlumen können bei therapierefraktären CED-Fällen von Vorteil sein. Bislang gibt es keine Therapie, die direkt eine Heilung der Schleimhaut verursacht, sondern nur entzündungshemmende oder immunmodulatorische Medikamente. Fujiya et al. waren die Ersten, die langkettiges PolyP einer Gruppe von CU-Erkrankten verabreichten (182). PolyP konnte bei sieben der zehn CU-Betroffenen die Symptome verbessern, wovon vier sogar endoskopisch in Remission gelangen. Darüber hinaus konnte PolyP sowohl klinische als auch endoskopische Remission in Patientinnen und Patienten mit therapierefraktärer CU induzieren. Somit wären zwei Angriffspunkte für eventuelle neu medikamentöse Möglichkeiten gegeben. Auch eine Kombination aus Inhibitoren im Blut und lokales PolyP im Darm wäre denkbar.

Die vorliegende Arbeit untersucht die pathophysiologische Rolle von im Blutkreislauf zirkulierendem PolyP bei MC und CU-Patientinnen und Patienten. Diese soll in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität sowie Therapie überprüft werden. PolyP wird hierzu indirekt über die bereits erwähnte Fähigkeit, TFPI zu inhibieren, nachgewiesen (173). Die Thrombingeneration wird mittels Calibrated Automated Thrombography (CAT) nach Hemker et al. gemessen (186). Aus den Parametern der Thrombingeneration lässt sich bei Messung mit und ohne TFPI eine Differenz (ausgedrückt in Δ) bilden durch welche Rückschlüsse auf die PolyP-Aktivität im

Plasma gezogen werden können. Auf Basis dessen stelle ich folgende Hypothesen auf:

- (1) PolyP ist im Plasma von pädiatrischen CED-Patientinnen und Patienten bei Erstmanifestation erhöht und wirkt dort gerinnungs- sowie entzündungsfördernd.
- (2) Bei Remission der Erkrankung sinkt die PolyP-Aktivität im Plasma von CED-Patientinnen und Patienten wieder ab.
- (3) Bei Mesalazineinnahme ist die PolyP-Aktivität geringer als bei anderer Medikation, da weniger bakterielles PolyP über die Darmbarriere in den Blutkreislauf gelangt.

2 Methoden

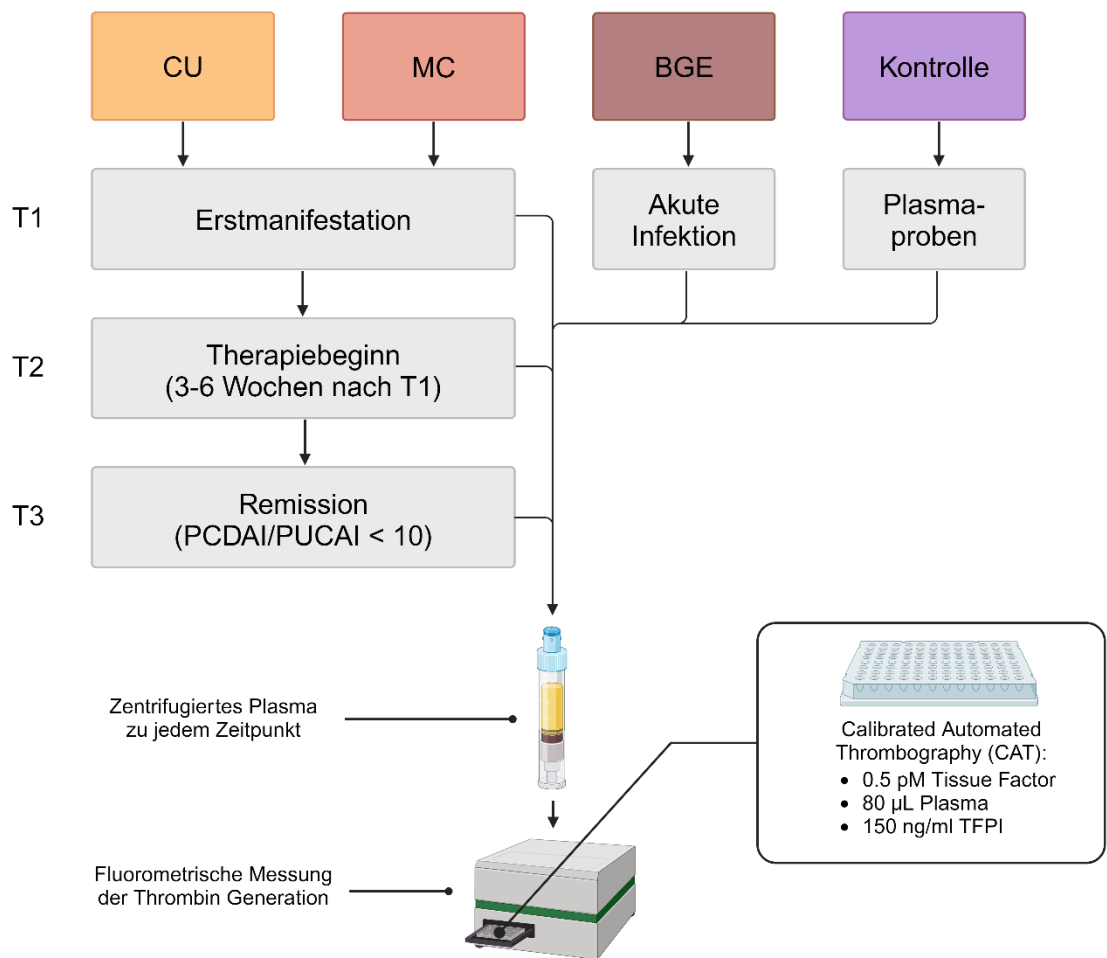
2.1 Studiendesign

Patienten und Patientinnen mit Verdacht auf eine CED wurden zur Abklärung und Durchführung einer ÖGD und Ileocoloskopie stationär aufgenommen. Sie präsentierten sich meistens mit typischen gastrointestinalen Symptomen wie z.B. Hämatochezie, Diarrhoe und abdominelle Schmerzen. An bakterieller Gastroenteritis (BGE) erkrankte Kinder wurden zur stationären Therapie und Bestätigung der gastrointestinalen Infektion aufgenommen. Im Rahmen des Aufnahmegesprächs wurden die Eltern der potenziellen Teilnehmerinnen und Teilnehmer über die Studie informiert und aufgeklärt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (No. 32-019 ex19/20) und alle Versuchspersonen, sofern sie bereits alt genug waren, oder deren Erziehungsberechtigte willigten zur Teilnahme ein.

Im Wesentlichen setzt sich die Untersuchung aus zwei Studienphasen zusammen. Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie wurde die CED-Kohorte bei Erstmanifestation mit der BGE-Kohorte und den gesunden Kontrollen verglichen. So sollen Veränderungen in den CAT-Parametern den Unterschied zwischen akuter, chronischer und fehlender Inflammation zeigen. Daraufhin wurden die Daten derselben Patientinnen und Patienten der CED-Kohorte im Rahmen einer Längsschnittstudie analysiert. In dieser zweiten Phase liegt das Hauptaugenmerk auf Veränderungen im Verlauf der Erkrankung. Zu diesem Zweck wurden die Ergebnisse der CAT-Messungen bei Erstmanifestation, nach Therapiebeginn und in Remission untersucht. Hier wurden die Daten auch auf Korrelationen zwischen den CAT-Parametern, Routineparametern und Disease-Scores analysiert. Diese Disease-Scores umfassen den bereits erwähnten PCDAI und den Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI). Erstmanifestation der Erkrankung ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung, Therapiebeginn wurde mit drei bis sechs Wochen nach Einleitung der Medikation festgelegt und Remission ist definiert als ein $PUCAI/PCDAI < 10$.

Abbildung 2

Studiendesign



© Meyer. Created with BioRender

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, BGE = bakterielle Gastroenteritis, PUCAI = Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index, PCDAI = Pediatric Crohn's Disease Activity Index, TFPI = Tissue Factor Pathway Inhibitor. Zu jedem Messzeitpunkt wurden in der CU und MC-Gruppe die Disease Scores (PUCAI/PCDAI) erhoben und eine Blutabnahme durchgeführt. Aus dem Blut wurde Plasma gewonnen zur Messung von CAT-Parametern (lag time, time to peak, peak height, ETP, velocity index und start tail) und ein Routine Blutbild angefertigt (Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Fibrinogen, PT, aPTT, CRP). Weiters wurde der Calprotectingehalt im Stuhl bestimmt. In der Kontrollgruppe fand nur eine Blutabnahme zur Erfassung der CAT- und Gerinnungsparameter (PT/aPTT) statt.

2.1.1 Inklusionskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten und Patientinnen im Alter von 7 bis 18 Jahren, die am Universitätsklinikum für Kinder und Jugendheilkunde in Graz aufgrund einer CED oder BGE in Behandlung waren. In der CED-Kohorte wurde die Untersuchung nur bei Patienten und Patientinnen mit Erstmanifestation einer CU oder eines MC durchgeführt. Die Diagnose dieser erfolgte durch eine Kombination aus typischen klinischen Zeichen mit charakteristischen endoskopischen Befunden, histopathologischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren gemäß der ECCO/ESPGHAN Kriterien (30). Der Schweregrad der Erkrankung wurde zu jeder Probenabnahme mittels PUCAI/PCDAI Score bestimmt. Testpersonen in der BGE-Kohorte wurden nur miteinbezogen, wenn die BGE mikrobiologisch bestätigt wurde. Vorwiegend handelte es sich hierbei um die Erreger *Campylobacter* und Salmonellen. Die gesunde Kontrollgruppe durfte weder hereditäre oder erworbene Gerinnungsanomalien noch Zeichen einer systemischen Infektion oder Entzündung aufweisen.

2.1.2 Exklusionskriterien

Ausschlussgründe in der CED-Kohorte waren Vorerkrankungen, Gerinnungsstörungen (hereditär oder erworben) und wiederholte Schübe der Erkrankung. Probandinnen und Probanden der BGE-Kohorte wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn kein Pathogen in der mikrobiellen Untersuchung festgestellt wurde oder es sich um virale oder parasitäre Gastroenteritiden handelt. In der Kontrollgruppe waren Zeichen einer systemischen Entzündung/ Infektion sowie ein pathologisches Gerinnungsscreening ein Grund zum Ausschluss von der Untersuchung. Die Einnahme von gerinnungsaktiven Medikamenten, wie z.B. Heparine (Enoxaparin, Dalteparin) oder Faktor Xa-Hemmer (Edoxaban, Rivaroxaban), stellte in jeder der drei Kohorten einen Ausschlussgrund dar.

2.2 Variablen

Im Zuge der Studie wurden sowohl Blutparameter in der Routinediagnostik als auch Gerinnungsparameter mittels eigens durchgeführter CAT-Messung erhoben.

2.2.1 Routineparameter

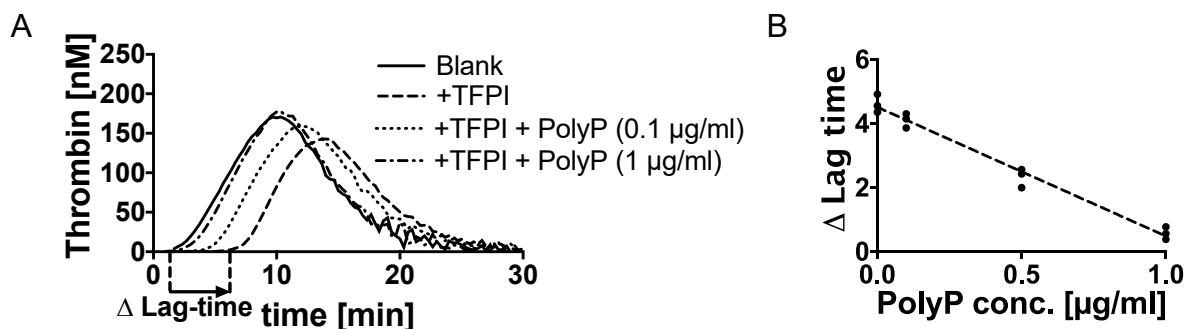
Im Rahmen der klinischen Diagnostik wurde routinemäßig ein großes Blutbild angefertigt. Die Bestimmung der verschiedenen Parameter erfolgte über das Klinische Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik am LKH-Universitätsklinikum Graz. Für die Studie wurden folgende Daten im Blut erhoben: Erythrozyten (T/L), Leukozyten (G/L), Thrombozyten (G/L), Hämoglobin (g/dL), Fibrinogen (mg/dL), PT (%), aPTT (sec), BSG (mm) und CRP (mg/L). Im Stuhl wurde fäkales Calprotectin ($\mu\text{g/g}$) bestimmt.

2.2.2 PolyP-Messmethodik

Durch die Inhibierung von TFPI ist es möglich die Aktivität von PolyP zu bestimmen. Bislang waren Untersuchungen zur Messung von PolyP aufgrund des Fehlens eines spezifischen Assays für dieses Molekül schwierig. Abbildung 3A zeigt die Veränderungen der Thrombingeneration bei Zugabe von TFPI und verschiedenen Konzentrationen PolyP zu gesundem Plasma. Man sieht die Verlängerung der lag time sowie die Erniedrigung von ETP und der peak height durch TFPI. Die Thrombingeneration normalisiert sich daraufhin wieder schrittweise unter Einfluss von PolyP. In Abbildung 3B sieht man die Abhängigkeit der Δ lag time, also der lag time Differenz zwischen Messung mit und ohne TFPI, von der PolyP-Konzentration. Diese Beobachtungen etablieren den Zusammenhang zwischen PolyP und TFPI und ermöglichen so die Entwicklung eines spezifischen Assays.

Abbildung 3

Veränderungen der Thrombingeneration unter TFPI- und PolyP-Zugabe (A) sowie Abhängigkeit der Δ lag time von PolyP (B)



Anmerkung. TFPI = Tissue Factor Pathway Inhibitor, PolyP = Anorganische Polyphosphate. (A) TFPI führt zu Veränderungen in lag time, ETP und peak height, welche unter ansteigender PolyP-Zugabe sukzessive rückgängig gemacht werden. Eine Konzentration von 1 µg/ml reichte im Versuch sogar aus, um die TFPI-abhängigen Veränderungen wieder gänzlich zu normalisieren. (B) Eine steigende PolyP-Konzentration verkleinert im linearen Zusammenhang die Δ lag time.

Zur Bestimmung der PolyP-Aktivität im Plasma wurde an drei Messzeitpunkten Blut aus der Vena cubitalis entnommen. Zur Abnahme wurden S-Monovette 3ml 9NC Röhrchen von Sarstedt verwendet, die 0,3 ml 0,106 mol/l Tri-Natrium-Citratlösung enthalten. Blut wurde abgenommen bei Erstmanifestation, drei bis sechs Wochen nach Therapiebeginn und in Remission. Die Erstmanifestation war der Zeitpunkt der Diagnosestellung mittels ÖGD, Coloskopie und klinischen Parametern. Remission der Erkrankung ist definiert als ein Disease-Score (PUCAI/PCDAI) von weniger als zehn Punkten. Zur Herstellung von Plasma wurde das abgenommene venöse Blut zehn Minuten bei 2590 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Plasma abpipettiert, beschriftet, eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Messung der Thrombingeneration mittels CAT wurde das Plasma fünf Minuten bei 37°C aufgetaut und anschließend bei 37310 x g für 20 Minuten zur Verhinderung der Kontaktaktivierung zentrifugiert. Im Vorversuch mit Nicht-Probanden Plasma zeigte sich eine Verhinderung der Kontaktaktivierung bei nochmals zentrifugiertem Plasma im Vergleich zu Plasma, welches lediglich aufgetaut wurde. Die erneute Zentrifugation nach dem Auftauen erzielte einen ähnlichen Effekt wie Corn Trypsin Inhibitor (CTI), weshalb auf dessen Zugabe verzichtet wurde.

Die CAT-Messung erfolgte in 96-Well Mikrotiter Platten (Immulon 2 HB round bottom, Thermo Fisher Scientific, NY, USA). Es wurde die Thrombingeneration mit und ohne Zugabe von exogenem TFPI (150 ng/ml, Abcam, Cambridge, UK) nach Hemker et al. gemessen (186). Zuerst wurden 300 µl CaCl₂ (1M) zu 2625 µl Fluobuffer, der 60 mg/ml bovines Serumalbumin enthält, zugegeben. Weiters enthält er 20 mM der Puffersubstanz 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-

piperazinyl)-ethansulfonsäure. Die Fluobuffer-CaCl₂ Mischung wurde bei 37°C inkubiert. Vor der Messung wurden 75 µl des in Dimethylsulfoxid gelösten Fluoreszenzfarbstoffs Z-Gly-Gly-Arg-amino-methyl-coumarin (Bachem, Bubendorf, CH) zu dieser Mischung hinzugegeben. Z-Gly-Gly-Arg-AMC ist ein Substrat für viele Enzyme unter anderem Trypsin, Urokinase und Thrombin. Thrombin spaltet von diesem die fluoreszierende Verbindung 7-amino-4-methyl-coumarin ab, wodurch auf die Thrombinaktivität zurückgeschlossen werden kann. Die Zugabe erfolgte unter mehrmaligem Resuspendieren, um ein Ausfällen zu vermeiden.

In jedes Well wurden 20 µl Aktivator, bestehend aus zehn Teilen MP-Reagent und einem Teil PPP-Reagent, oder 20 µl Thrombin Calibrator pipettiert. Alle drei Reagenzien wurden von Diagnostica Stago S.A.S aus Asnières in Frankreich bezogen. Der Aktivator enthält eine finale Konzentration von 0,5 pM TF sowie 4 µM Phospholipide. Der Thrombin Calibrator ermöglicht die Berechnung der Thrombinkonzentration aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal durch einen konstanten Thrombingehalt (605 nM), der an α₂-Makroglobulin gebunden ist. In dieser Berechnung werden die unterschiedlichen fluorogenen Eigenschaften des jeweiligen Patientenplasmas berücksichtigt. Nun wurde zur Messung der TFPI-Inhibition im Plasma zu einem Teil der Wells 1,2 µl exogenes TFPI hinzugegeben. Die finale Konzentration in diesen Wells betrug 150 ng/ml TFPI. Zuletzt wurde die Vorbereitung vervollständigt, indem in alle Wells 80 µl Plasma der jeweiligen Probandinnen und Probanden hinzugefügt wurde. Daraufhin wurde die Mikrotiter Platte in den Fluorometer gegeben, für zehn Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend startete die Messung durch die automatische Zugabe von 20 µl der zuvor vorbereiteten Fluobuffer-CaCl₂-Mischung.

Jeder Zustand (mit/ohne TFPI) wurde, ebenso wie der Calibrator, für alle Plasmaproben dreimal gemessen. Die fluorometrische Messung fand in einem Fluroskan Ascent plate reader (Thermo Labsystems, Helsinki, FIN) statt. Die Erstellung und Analyse der Thrombingenerations-Kurven erfolgte mit der dazugehörigen Software Thrombinoscope© (Thrombinoscope BV, Maastricht, NL).

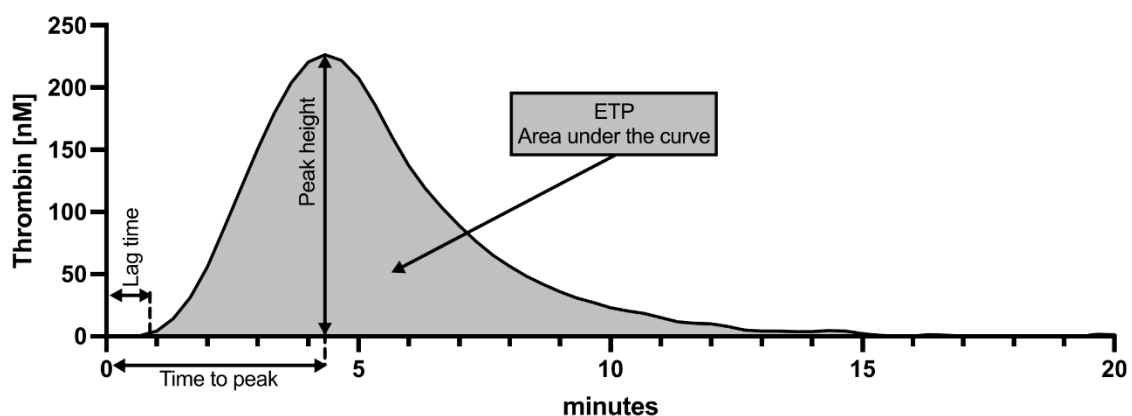
Die CAT-Parameter lag time, TTP, peak height und ETP wurden mithilfe des gemessenen Thrombin-Signals berechnet. Der velocity index (VelIndex) ergibt sich aus der Formel $\frac{\text{time to peak-lag time}}{\text{peak height}}$. Von allen Parametern wurde die Differenz

zwischen Messung mit TFPI und ohne TFPI zu jedem Zeitpunkt (Erstmanifestation/Therapiebeginn/Remission) in Δ lag time, Δ TTP, Δ peak height, Δ ETP, Δ VelIndex und Δ StartTail ausgedrückt. Wie eingangs erwähnt lässt sich so auf die PolyP-Aktivität im Plasma rückschließen. Je kleiner die Δ lag time ist, desto höher kann der PolyP-Gehalt angenommen werden (siehe Abbildung 3).

Die lag time wird in Minuten ausgedrückt und stellt die Zeitspanne von Messstart bis zum Zeitpunkt der ersten Thrombingeneration dar (187). ETP ist die Fläche unter der Thrombinkurve und steht für die gesamte Menge an generiertem Thrombin über die Zeit. Der Parameter peak height zeigt die maximale Menge an generiertem Thrombin und wird in nM gemessen. Die TTP misst in diesem Zusammenhang die Zeit bis zur Spitze der Thrombinkurve in Minuten. Der VelIndex ist die erste Ableitung des Kurventeils, der zwischen lag time und TTP liegt. Hierbei steht er für die Steigung in diesem Abschnitt der Kurve und drückt so die Geschwindigkeit der Thrombingeneration bis zur maximalen Menge an Thrombin aus. Am Ende der Kurve findet man den StartTail Wert. Er beschreibt den Zeitpunkt in Minuten an dem die Kurve abflacht und das gesamte Thrombin inhibiert wurde.

Abbildung 4

Schematische Darstellung der Thrombingeneration



© Schlagenhaut

Anmerkung. ETP = Endogenous Thrombin Potential. Lag time ist die Zeit bis zum Beginn der Thrombingeneration. ETP stellt die Fläche unter der Thrombinkurve dar. Peak height ist die maximale Menge an gemessenem Thrombin, während die time to peak die Zeit bis zu dieser Menge ist.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics Version 28. Für die Erstellung von Diagrammen und grafischen Darstellungen wurde GraphPad Prism Version 9.5.1 verwendet. Die Prüfung auf Normalverteilung der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test ($\alpha = .05$) und grafisch durch Q-Q-Plots. Da einige Autoren zeigten, dass sowohl der ungepaarte als auch der gepaarte t-Test robust gegenüber einer Verletzung der Normalverteilungsannahme sind, wurden keine Korrekturverfahren oder nicht parametrische Tests angewendet (188). Auch bei der einfaktoriellen ANOVA, sowie der ANOVA mit Messwiederholung legen neuere Untersuchungen nahe, dass diese robust gegenüber einer Verletzung der Normalverteilung sind. Hier wurde bei Verletzung dieser Annahme ebenso auf nicht parametrische Tests oder Korrekturverfahren verzichtet (189,190). Analyse und Identifikation von etwaigen Ausreißern wurde grafisch mittels Boxplot durchgeführt. Extremwerte die > 1.5 fache des Interquartilsabstand vom Mittelwert entfernt sind, wurden als Ausreißer klassifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Überprüfung der Varianzhomogenität bei der einfaktoriellen ANOVA erfolgte mit dem Levene-Test ($\alpha = .05$). Lag eine Verletzung der Varianzhomogenität vor wurde die robustere Welch-ANOVA durchgeführt. Dasselbe Prüfverfahren kam auch beim ungepaarten t-Test zum Einsatz und so wurde bei mangelnder Varianzhomogenität der Welch-Test durchgeführt. Bei ANOVA mit Messwiederholung wurde die Sphärizität durch den Mauchly-Test bestimmt ($\alpha = .05$). Bei Verletzung der Sphärizität wurde eine Greenhouse–Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Zur Korrektur der α -Fehler-Kumulierung bei multiplem Testen wurden alle p -Werte nach der Bonferroni-Holm-Methode korrigiert, da diese liberaler ist als die konservative Bonferroni-Korrektur.

3 Ergebnisse

3.1 Stichprobe

Über zwei Jahre wurden insgesamt 47 Probandinnen und Probanden in die Studie eingeschlossen. Der erste Einschluss erfolgte im Oktober 2020, der letzte im November 2022. Von 47 eingeschlossenen Testpersonen waren 28 in der CED- und acht in der BGE-Gruppe. Die übrigen elf Testpersonen wurden nicht weiter in der Studie berücksichtigt, da sich der anfängliche Verdacht einer CED hier nicht bestätigte. Die Diagnosen dieser elf Probandinnen und Probanden waren unter anderem Zöliakie, Colonpolypen und Reizdarm.

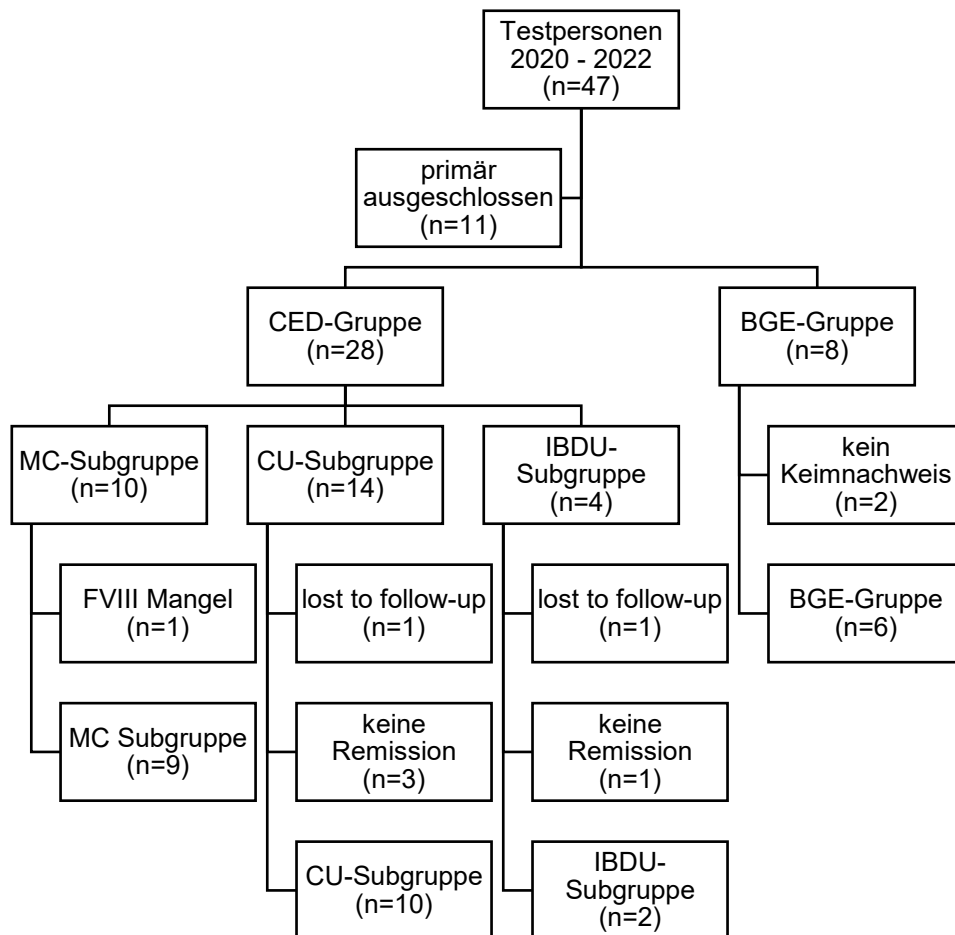
Zu Beginn der Datenerhebung setzte sich die CED-Gruppe wie folgt zusammen: Den größten Anteil hatten jene Teilnehmenden mit der Diagnose Colitis Ulcerosa ($n = 14$). Die zweitgrößte Subgruppe bestand aus Patientinnen und Patienten mit Morbus Crohn ($n = 10$). Die kleinste Subgruppe bildete sich aus vier Personen mit IBDU ($n = 4$). Im Verlauf der Studie konnte ein Teil der CED-Gruppe aus folgenden Gründen nicht in die Auswertung miteinbezogen werden: Ein Patient mit Morbus Crohn musste nachträglich ausgeschlossen werden, weil zum Zeitpunkt der Erstmanifestation ein passagerer FVIII Mangel herrschte. Drei Patienten mit CU waren zum Zeitpunkt der dritten Blutabnahme nicht in Remission und konnten somit in den Berechnungen nicht berücksichtigt werden. Ein Patient der CU-Subgruppe wurde nach seiner Behandlung am LKH-Graz von einem niedergelassenen Gastroenterologen weiter betreut und stand daher nicht für weitere Blutabnahmen zur Verfügung. In der IBDU-Subgruppe wurde ebenfalls eine Patientin nicht mehr am LKH-Graz betreut und ein Patient befand sich nicht in Remission. In den statistischen Berechnungen wurden daher neun Testpersonen mit Morbus Crohn, zehn mit Colitis Ulcerosa und zwei mit IBDU berücksichtigt.

In der BGE-Gruppe waren am Ende der Rekrutierung acht Patientinnen und Patienten mit bakteriellen Gastroenteritiden. Zwei Patientinnen mussten ausgeschlossen werden, da mikrobiologisch kein Keimwachstum nachweisbar war. Die BGE-Gruppe bestand daher nur aus männlichen Probanden.

Zur Bildung der Kontrollgruppe wurden zusätzlich Blutplasma Proben von 23 gesunden Personen herangezogen.

Abbildung 5

Gruppenverteilung



© Meyer

Anmerkung. CED = chronisch entzündliche Darmerkrankung, BGE = bakterielle Gastroenteritis, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis Ulcerosa, IBDU = Inflammatory bowel disease unclassified

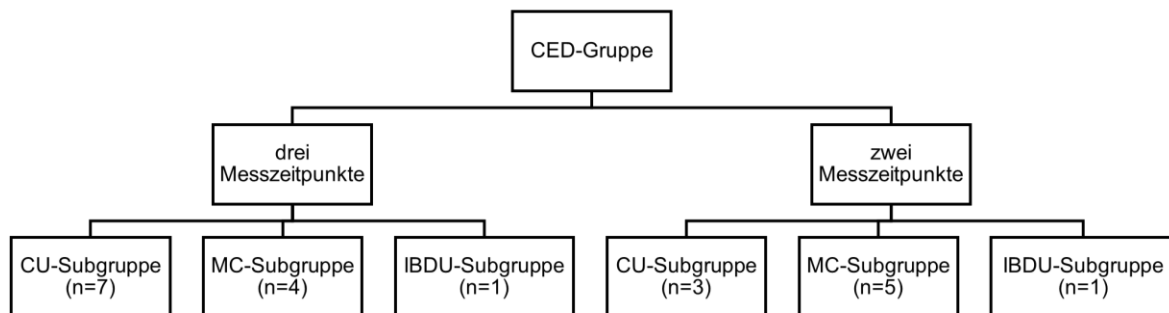
3.1.1 Messzeitpunkte

Von insgesamt 21 Probandinnen und Probanden beendeten zwölf die Studie vollständig mit allen drei Messzeitpunkten (Erstmanifestation, Therapiebeginn und Remission). Bei neun von 21 fehlte die Blutabnahme zu Therapiebeginn (2. Messzeitpunkt), wodurch hier leider nur ein Vergleich zwischen Erstmanifestation

und Remission gezogen werden konnte. Die genaue Aufteilung der unvollständigen TeilnehmerInnen lautet wie folgt: fünf in der MC-, drei in der CU- und einer in der IBDU-Subgruppe.

Abbildung 6

TeilnehmerInnen mit vollständigen Messzeitpunkten



© Meyer

Anmerkung. CED = chronisch entzündliche Darmerkrankungen, CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, IBDU = Inflammatory bowel disease unclassified. Drei Messzeitpunkte bezieht sich auf den vollständigen Abschluss der Studie mit Blutabnahmen bei Erstmanifestation, Therapiebeginn und Remission. Bei jenen mit nur zwei Messzeitpunkten fehlt die Blutabnahme zu Therapiebeginn.

3.1.2 Demographische Daten

Eingangs werden hier kurz die wichtigsten demographischen Kenndaten der Stichprobe angeführt beginnend mit dem Alter. Eine genaue demographische Auflistung findet sich in Tabelle 3. Die ältesten TeilnehmerInnen sowohl in der CU- als auch in der MC-Kohorte waren 17 Jahre alt. Der jüngste Patient der MC-Gruppe war zehn Jahre und die beiden jüngsten TeilnehmerInnen der CU-Gruppe jeweils elf Jahre alt. Die ältesten Patienten mit BGE hatten ein Alter von 16 Jahren, während der jüngste Patient dieser Gruppe sechs Jahre alt war. In der Kontrollgruppe war der älteste Proband 65 und die jüngste Probandin 20 Jahre alt. Alle Altersangaben beziehen sich auf das Alter zum Studieneinschluss. An den Maxima und Minima sowie den in Tabelle 3 ersichtlichen Mittelwerten der Altersverteilung sieht man bereits, dass sich das Alter zwischen den CED- sowie der BGE-Gruppe nicht stark unterscheidet. Das durchschnittliche Alter der CED-Gruppen und der BGE-Gruppe

lag im frühen Jugendalter zwischen 12 und 15 Jahren. Lediglich die Kontrollgruppe stellte, aufgrund des Fehlens von pädiatrischen Kontrollen, eine Ausnahme dar. In der Kontrollgruppe waren ausnahmslos alle TeilnehmerInnen Erwachsene, wodurch das durchschnittliche Alter mit 38 Jahren um ein Vielfaches höher war als jenes der anderen Gruppen. In Bezug auf die Geschlechterverteilung bestand die CU- und MC-Gruppe ebenso wie die Kontrollgruppe aus annähernd gleichen Teilen männlicher und weiblicher Testpersonen (siehe Tabelle 3). Die IBDU- und BGE-Gruppe bestand zur Gänze aus männlichen Patienten.

Zum Abschluss sei noch die durchschnittliche Zeit bis zum Remissionseintritt erwähnt. Wie in Tabelle 3 abgebildet waren Patientinnen und Patienten, die an MC erkrankt sind, durchschnittlich drei Wochen früher in Remission als jene, die an CU leiden. Die beiden IBDU-Patienten waren jeweils nach 85 und 99 Tagen in Remission.

Tabelle 3

Demographische Daten der Stichprobe

	CU (n = 10)		MC (n = 9)		IBDU (n = 2)		BGE (n = 6)		Kontrolle (n = 23)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Männlich	5	50.0	4	44.4	2	100	6	100	11	47.8
Weiblich	5	50.0	5	55.6	0	0	0	0	12	52.2
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>
Alter	13.9	2.08	15.0	2.45	12.0	4.24	12.3	4.32	38.1	13.8
Remission	78.4	42.5	58.2	40.7	92.0	9.90				

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, IBDU = Inflammatory Bowel Disease Unclassified, BGE = Bakterielle Gastroenteritis, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung. Das Alter in Jahren bezieht sich auf das Alter zum Studieneinschluss. Die Dauer bis zum Remissionseintritt ist in Tagen angegeben und stellt die durchschnittliche Differenz zwischen Blutabnahme bei erstmaliger Remission und bei Erstmanifestation dar.

3.2 Gruppenunterschiede

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der PolyP-Aktivität zwischen chronischer (CED) und aktiver Entzündung (BGE) sowie gesunden Kontrollen gibt, wurden die Gruppen mittels einfaktorieller ANOVA miteinander verglichen. Weiters wurden dieselben Untersuchungen auch mit den absoluten CAT-Parametern durchgeführt, um von PolyP unabhängige Veränderungen in der Thrombingeneration nachzuweisen. In diesem Teil der Arbeit wurden die Analysen auf die CAT-Parameter lag time, ETP und peak height beschränkt, da diese die größten Veränderungen durch PolyP zeigen (siehe Abbildung 3). Die beiden Patienten mit IBDU wurden aufgrund der geringen Gruppengröße von den Gruppen- sowie longitudinalen Vergleichen ausgeschlossen. Lediglich in den Mesalazin- und Korrelationsanalysen wurden diese miteinbezogen, da es hier keine Unterscheidung der einzelnen CED-Subtypen gab.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die deskriptiven Werte und ANOVA-Ergebnisse der Gruppenvergleiche. Man erkennt bereits anhand der deskriptiven Statistik, dass sich die absoluten Werte der CED und BGE-Kohorte nur wenig bis gar nicht voneinander unterscheiden. Ein großer Unterschied kann hingegen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Am Beispiel der lag time sieht man in der Kontrollgruppe eine sehr lange lag time von 19 Minuten, während diese bei chronischer (CED) und akuter (BGE) Entzündung im Mittel zwischen 12 und 14 Minuten liegt (siehe Tabelle 4). Dasselbe gilt für die Werte ETP und peak height, wobei hier die Werte der Kontrollgruppe gegenüber den anderen Gruppen niedriger sind. Die Verkürzung der lag time und Erhöhung des ETP sowie der peak height weisen auf einen prokoagulativen Zustand im Plasma bei entzündlichen Prozessen in der Stichprobe hin.

Die relativen (Δ) CAT-Parameter, welche den Einfluss von PolyP auf die Thrombingeneration darstellen, weisen weniger starke Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Eine Ausnahme bildet hier die BGE-Kohorte. Alle geprüften Parameter fallen in der BGE-Kohorte höher aus als in den restlichen Gruppen der Stichprobe. Besonders die hohe Δ lag time weist darauf hin, dass eine TFPI-Inhibition von PolyP bei akuten Gastroenteritiden der Stichprobe keine oder nur eine minimale Bedeutung hatte. Die CU-, MC- und Kontrollgruppe ähneln sich in den relativen Parametern weitgehend und zeigen keine auffälligen Unterschiede. Die negativen

Werte bei Δ ETP und Δ peak height entstehen dadurch, dass die Werte bei Messung mit TFPI niedriger sind als bei Messung ohne. Dies entspricht laut Abbildung 3 den Erwartungen bei Zugabe von TFPI.

Um diese Beobachtungen inferenzstatistisch zu prüfen, wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Es wurden statistisch signifikante Unterschiede in allen drei untersuchten absoluten CAT-Parametern gefunden: Die Länge der lag time, $F(3, 43) = 7.57, p < .001$, ebenso wie der ETP-Wert, Welch's $F(3, 13.37) = 26.36, p < .001$, unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen. Auch die peak height des generierten Thrombins zeigte eine signifikante Differenz unter den Gruppen, Welch's $F(3, 12.61) = 14.3, p < .001$. Die Berechnungen der relativen Werte Δ ETP und Δ peak height wiesen keine signifikanten Ergebnisse auf (siehe Tabelle 4). Lediglich die Δ lag time zeigte einen signifikanten Unterschied im Gruppenvergleich, Welch's $F(3, 17.64) = 3.93, p = .026$, wobei es sich hier vermutlich um ein Zufallsergebnis aufgrund der α -Fehler-Kumulierung handelt.

Tabelle 4

Deskriptive Statistik und ANOVA-Ergebnisse der Gruppenvergleiche

	CU		MC		BGE		Kontrolle		ANOVA
	n	M (SD)	n	M (SD)	n	M (SD)	n	M (SD)	
lag time (min)	10	14.9 (4.77)	8	12.4 (2.31)	6	12.2 (2.71)	23	19.2 (4.98)	$F(3, 43) = 7.57, p < .001, \eta^2 = .35$
ETP (nM*min)	10	972.13 (196.53)	9	1246.8 (596.95)	6	910.48 (286.29)	21	408.22 (147.96)	Welch's $F(3, 13.37) = 26.36, p < .001, \eta^2 = .57$
peak height (nM)	10	100.31 (33.866)	9	143.07 (90.982)	6	101.24 (42.125)	23	40.036 (17.995)	Welch's $F(3, 12.61) = 14.3, p < .001, \eta^2 = .46$
Δ lag time	10	2.00 (1.52)	8	1.18 (1.05)	5	3.09 (.950)	22	1.13 (3.61)	Welch's $F(3, 17.64) = 3.93, p = .026, \eta^2 = .06$
Δ ETP	8	-6.545 (31.52)	9	28.20 (99.43)	6	-78.75 (211.0)	23	-2.870 (108.0)	Welch's $F(3, 14.63) = .54, p = .665, \eta^2 = .07$
Δ peak height	9	5.108 (12.71)	9	4.016 (17.85)	4	-15.96 (4.688)	23	-1.137 (12.58)	$F(3, 41) = 2.64, p = .062, \eta^2 = .16$

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, BGE = Bakterielle Gastroenteritis, ETP = Endogenous Thrombin Potential, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung. Zu sehen sind die Unterschiede in den absoluten, sowie relativen (Δ) Werten im Gruppenvergleich. In fettgedruckter Schrift sind jene Werte der Gruppen hervorgehoben, die sich in den post hoc Tests (Dunnett und Dunnett T3) statistisch signifikant ($p < .05$) voneinander unterschieden.

Zur weiteren Exploration zwischen welchen Gruppen sich die Unterschiede nun befinden wurden Dunnett und Dunnett T3 post hoc Tests durchgeführt. Der Dunnett Test vergleicht die Gruppen CU, MC und BGE mit der Kontrollgruppe und wurde aufgrund der bereits in den deskriptiven Werten erkennbaren Unterschieden durchgeführt. Bei mangelnder Varianzhomogenität wurde der Dunnett T3 post hoc Test durchgeführt, da dieser bei kleiner Stichprobengröße ($n < 50$) den anderen Testverfahren überlegen ist (191). Mittels Dunnett post hoc Test wurden die Unterschiede der Parameter lag time und Δ peak height berechnet, während die restlichen Berechnungen mit Dunnett T3 durchgeführt wurden.

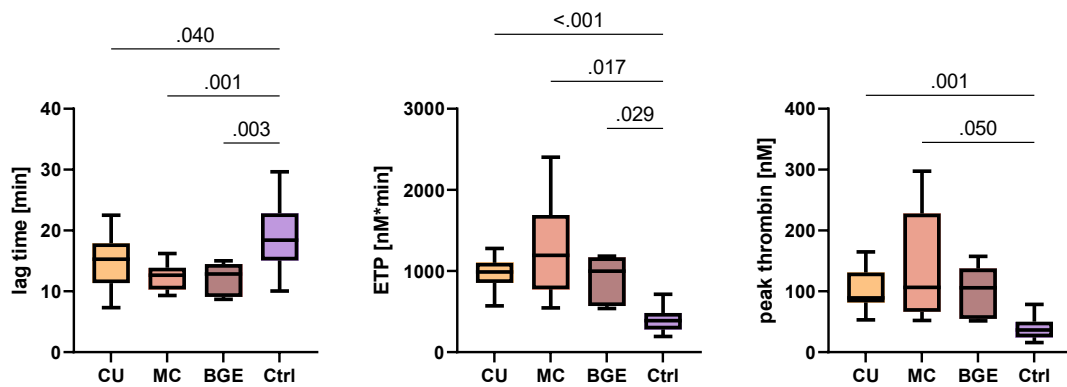
Die lag time von CU-Erkrankten ist im Schnitt statistisch signifikant ($p = .040$) kürzer als die von gesunden Personen (-4.25 min, 95%-CI [-8.34 min, -0.15 min]). Ebenso verhält es sich bei Patientinnen und Patienten mit MC (-6.79 min, 95%-CI [-11.22 min, -2.35 min], $p = .001$). Diese Verkürzung der lag time bei CED gegenüber gesunden Personen ist mit einer erhöhten Gerinnungsbereitschaft im Plasma vereinbar. Unterstützend zu dieser Beobachtung sind auch die erhöhten Werte von ETP und peak height der beiden CED-Kohorten gegenüber der Kontrollgruppe. Der Dunnett T3 post hoc Test ergab eine statistisch signifikante Erhöhung ($p < .001$, $p = .001$) der Parameter ETP (563.92 nM*min, 95%-CI [352.37 nM*min, 775.46 nM*min]) und peak height (60.28 nM, 95%-CI [24.79 nM, 95.77 nM]) bei Patientinnen und Patienten mit CU gegenüber gesunden Personen. Auch bei MC-Erkrankten zeigen sich im Schnitt höhere ETP (838.59 nM*min, 95%-CI [168.89 nM*min, 1508.28 nM*min], $p = .015$), sowie peak height Werte (103.03 nM, 95%-CI [.98 nM, 205.08 nM], $p = .048$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ähnliche prokoagulative Verhältnisse bestehen auch bei BGE. Hier ist gegenüber den Kontrollen die lag time verkürzt (-7.04 min, 95%-CI [-12 min, -2.08 min], $p = .003$),

sowie das ETP erhöht (502.26 nM*min, 95%-CI [52.18 nM*min, 952.34 nM*min], $p = .031$).

Zur Übersicht sind die Ergebnisse der absoluten Parameter lag time, ETP und peak height in Abbildung 7 graphisch mittels Boxplot dargestellt. Abbildung 8 zeigt zudem exemplarisch die Thrombinkurven von repräsentativen Patientinnen und Patienten der einzelnen Gruppen.

Abbildung 7

Unterschiede in lag time, ETP und peak height zwischen den Gruppen

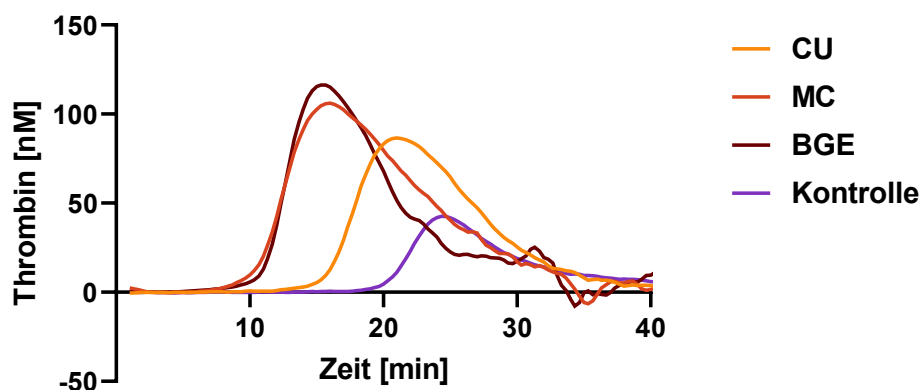


© Meyer

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, BGE = Bakterielle Gastroenteritis, Ctrl = Kontrolle, ETP = Endogenous Thrombin Potential.

Abbildung 8

Thrombinkurven von repräsentativen StudienteilnehmerInnen



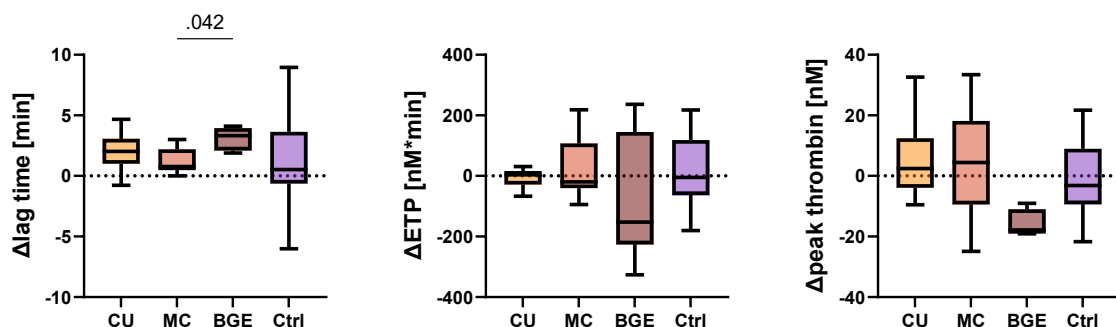
© Meyer

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, BGE = Bakterielle Gastroenteritis. Die Thrombinkurven stellen Medianwerte von TeilnehmerInnen der unterschiedlichen Gruppen dar. Auch graphisch lassen sich gut die Unterschiede in lag time, ETP und peak height der CU-, MC- und BGE-Gruppe gegenüber den Kontrollen erkennen.

Der eigentliche Fokus dieser Arbeit, nämlich PolyP-Nachweis über TFPI-Inhibition, ergab nach Bonferroni-Holm-Korrektur keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Zur Vollständigkeit soll hier dennoch das Ergebnis des post hoc Tests erwähnt werden. Der Dunnett T3 post hoc Test zeigt eine im Schnitt statistisch signifikant ($p = .042$) kleinere Δ lag time bei Patientinnen und Patienten mit MC als mit BGE (-1.91 min, 95%-CI [-3.74 min, -.08 min]). Zwischen den restlichen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede in der Δ lag time zu beobachten. In Abbildung 9 sind die Verhältnisse von Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height analog zu den absoluten Parametern dargestellt.

Abbildung 9

Verhältnis von Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height zwischen den Gruppen



© Meyer

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, BGE = Bakterielle Gastroenteritis, Ctrl = Kontrolle, ETP = Endogenous Thrombin Potential, TFPI = Tissue Factor Pathway Inhibitor. Gezeigt werden die Verhältnisse der relativen Parameter Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height im Gruppenvergleich. Negative Werte sprechen dafür, dass bei Messung mit TFPI der Parameter höher bzw. länger war als bei Messung ohne TFPI.

3.3 Unterschiede im Verlauf der Erkrankung

Damit die Hypothese, dass PolyP bei Erstmanifestation von CED erhöht ist und bei Remission der Erkrankung wieder sinkt, überprüft werden kann, wurde eine ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt. Analog zu Kapitel 3.2 sind in Tabelle 5 die deskriptiven Werte und ANOVA-Ergebnisse der wichtigsten absoluten sowie relativen (Δ) CAT-Parameter zusammengefasst.

Tabelle 5

Deskriptive Statistik und ANOVA-Ergebnisse der longitudinalen Vergleiche

	Erstmanifestation			Therapiebeginn		Remission		ANOVA
	<i>n</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	
lag time (min)	10	13.03	4.165	10.53	4.192	9.543	2.765	$F(2, 16) = 1.96,$ $p = .174$
ETP (nM*min)	9	915.30	215.14	887.16	362.45	910.70	348.01	$F(1.15, 8.04) = .01,$ $p = .947$
peak height (nM)	10	96.199	38.394	90.866	56.777	110.18	92.557	$F(1.1, 8.81) = .39,$ $p = .570$
Δ lag time	9	1.56	1.15	1.91	1.31	1.76	1.44	$F(2, 14) = .8,$ $p = .469$
Δ ETP	7	26.639	64.599	-125.15	137.21	14.891	97.095	$F(2, 10) = 2.9,$ $p = .102$
Δ peak height	9	5.353	9.658	-13.22	15.60	-2.264	9.249	$F(2, 14) = 4.29,$ $p = .035$

Anmerkung. CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankung, ETP = Endogenous Thrombin Potential, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung. Die Tabelle zeigt die deskriptiven Werte, sowie die Ergebnisse für die gesamte CED-Kohorte.

Im longitudinalen Vergleich gab es, mit Ausnahme des Parameters Δ peak height, keinen signifikanten Unterschied weder in den absoluten noch in den relativen CAT-Parametern. Nach Bonferroni-Holm-Korrektur erwies sich das statistisch signifikante ($p = .035$) ANOVA-Ergebnis des Wertes Δ peak height als nicht signifikant.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl, bedingt durch die fehlenden Proben zu Therapiebeginn, und der daraus resultierenden Abnahme der statistischen Power,

wurden gepaarte t-Tests berechnet. Das Ziel war einen Unterschied zwischen Erstmanifestation und Remission in den absoluten Parametern lag time, ETP und peak height, sowie den relativen Werten Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height nachzuweisen. So kann zumindest eine Aussage bezüglich Unterschiede bei aktiver und abgeklungener Entzündung getroffen werden.

Tabelle 6

t-Test Ergebnisse der CAT-Parameter von Erstmanifestation zu Remission

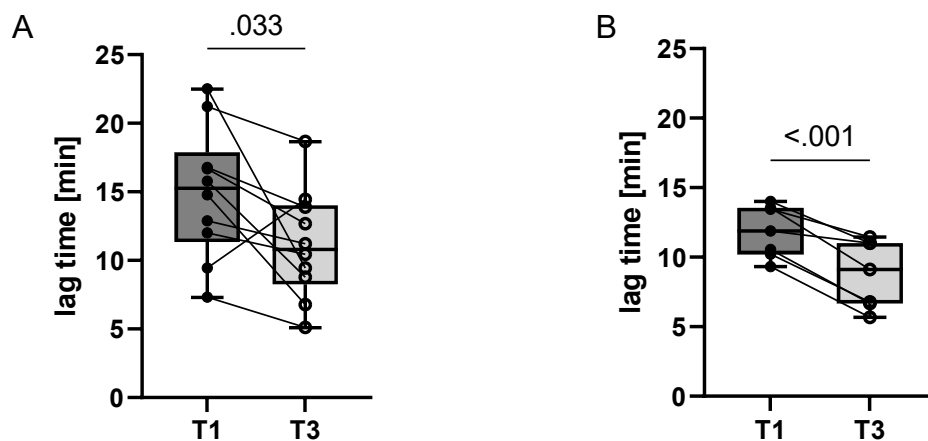
		Erstmanifestation		Remission		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	Cohen's <i>d</i>
		<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>				
CU	lag time (min)	14.94	4.769	11.14	3.970	2.51	9	.033	.79
	ETP (nM*min)	972.579	208.443	1038.57	301.276	-.43	8	.676	.14
	peak height (nM)	105.55	31.336	98.303	29.908	.47	8	.649	.16
	Δ lag time	2.00	1.52	1.29	1.68	1.07	9	.312	.34
	Δ ETP	33.15	86.97	-53.87	71.15	1.83	6	.117	.69
	Δ peak height	5.108	12.71	-2.478	7.074	1.42	8	.193	.47
MC	lag time	11.86	1.860	8.810	2.421	6.6	6	<.001	2.49
	ETP	1246.81	596.954	1114.09	469.193	.58	8	.575	.2
	peak height	143.07	90.982	139.61	101.55	.08	8	.942	.03
	Δ lag time	1.18	1.05	1.65	1.32	-.62	7	.553	.22
	Δ ETP	55.01	107.1	1.525	50.07	1.59	5	.173	.65
	Δ peak height	4.016	17.85	-5.016	18.77	1.46	8	.183	.49

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, ETP = Endogenous Thrombin Potential, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung. In fettgedruckter Schrift sind die statistisch signifikanten ($p < .05$) Werte hervorgehoben. Sowohl in der CU als auch in der MC Gruppe zeigt der Parameter lag time einen signifikanten Unterschied zwischen Erstmanifestation und Remission.

Die lag time zeigt in der MC Gruppe eine signifikante ($p < .001$) Verkürzung zwischen Erstmanifestation und Remission um etwa drei Minuten (siehe Tabelle 6). Bei Patientinnen und Patienten mit MC kann man nach Cohen von einem ausgesprochen großen Effekt ($d = 2.49$) sprechen (192). Da hier ebenso eine Bonferroni-Holm-Korrektur erfolgte, erwies sich die Verkürzung der lag time zwischen Erstmanifestation und Remission bei CU-Erkrankten als nicht signifikant. Ungeachtet dessen ist die große Verkürzung der lag time von etwa vier Minuten in Tabelle 6 hervorgehoben und lässt zumindest eine Tendenz vermuten. Die restlichen Parameter wiesen keinen signifikanten Unterschied auf und sind ebenfalls in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Unterschiede in der lag time für CU- und MC-Patientinnen und Patienten sind in Abbildung 10 mittels Boxplot dargestellt.

Abbildung 10

Unterschiede in lag time zwischen Erstmanifestation (T1) und Remission (T3) bei CU (A) sowie MC (B)



© Meyer

Anmerkung. CU = Colitis Ulcerosa, MC = Morbus Crohn, CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankung. Die lag time verkürzt sich von der Erstmanifestation bis zur Remission bei beiden CED-Subtypen. (A) lag time Unterschied bei CU. (B) lag time Unterschied bei MC. Beachtlich ist die insgesamt kürzere lag time bei MC gegenüber CU.

3.4 Einfluss von Mesalazin auf PolyP-Aktivität

Zur Überprüfung der Annahme, dass die Einnahme von Mesalazin die systemische PolyP-Aktivität reduzieren kann, wurde die Stichprobe in Personen, die Mesalazin einnehmen, und jene, die Mesalazin nicht einnehmen, unterteilt. Da es hier nur um den Nachweis einer Reduktion der PolyP-Aktivität geht, wurden die relativen Parameter Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height analysiert.

Hierfür wurden zum Zeitpunkt T2 (3-6 Wochen nach Therapiebeginn) und T3 (Remission) jeweils die Gruppe mit Mesalazineinnahme und jene ohne Einnahme miteinander verglichen. Keiner der relativen Parameter zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse der ungepaarten t-Tests mit den jeweiligen Parametern sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7

t-Test Ergebnisse der relativen CAT-Parameter in Abhängigkeit der Mesalazineinnahme zu Therapiebeginn (T2) und Remission (T3)

	Mesalazin ja		Mesalazin nein		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	Cohen's <i>d</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>				
T2 Δ lag time (min)	1.78	1.27	3.09	1.90	-1.36	9	.207	.92
Δ ETP (nM*min)	-65.04	62.51	-58.93	52.66	-.14	7	.889	.1
Δ peak height (nM)	-14.84	13.07	-3.200	10.93	-1.34	8	.216	.93
T3 Δ lag time	1.37	1.59	1.29	1.32	.13	18	.901	.06
Δ ETP	-30.41	51.66	-9.825	178.8	-.32	7.94	.761	.17
Δ peak height	-3.654	8.350	1.670	27.06	-.54	7.9	.604	.29

Anmerkung. ETP = Endogenous Thrombin Potential, *M* = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den relativen CAT-Parametern Δ lag time, Δ ETP und Δ peak height zwischen Personen, die Mesalazin einnehmen, und jenen, die es nicht einnehmen, nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen annehmen, dass eine Medikation mit Mesalazin keinen oder nur einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die systemische PolyP-Aktivität hat. Dennoch ist der größere Unterschied in Δ lag time und Δ peak height zu Therapiebeginn (T2) in der Stichprobe hervorzuheben. So haben Patientinnen und Patienten mit Mesalazineinnahme in der Stichprobe eine um etwa 1.3 min kürzere Δ lag time als jene ohne Mesalazineinnahme. Ähnlich verhält es sich bei Δ peak height, wobei hier die TeilnehmerInnen mit Mesalazintherapie höhere Werte aufwiesen. Es lässt sich hier ein Unterschied vermuten, der jedoch nicht auf die Bevölkerung verallgemeinert werden kann. Dies konkludiert die Gruppenvergleiche sowie die longitudinalen Analysen. Im nächsten Unterkapitel werden mögliche Zusammenhänge zwischen Entzündungsaktivität und Thrombingeneration behandelt.

3.5 Zusammenhänge zwischen Krankheitsaktivität und CAT-Parameter

Die Krankheitsaktivität bei Kindern mit CED wird mithilfe der klinischen Scores PUCAI und PCDAI erhoben. Der PUCAI wird durch unterschiedliche symptomorientierte Fragen, wie etwa Stuhlkonsistenz, Stuhlanzahl, Blutbeimengung und Schmerzen berechnet und hat eine maximale Punktzahl von 85 Punkten. Der PCDAI hingegen wird neben den Symptomen noch um die laborchemischen Parameter Hämatokrit, BSG und Albumin ergänzt. Er weist ein Maximum von 110 Punkten auf.

In unserer Stichprobe unterschied sich die Krankheitsaktivität bei Erstmanifestation zwischen MC und CU. Während der Median beim PUCAI einen Wert von 30 aufwies, waren es beim PCDAI 15 Punkte. Dies zeigt, dass in der Stichprobe Patientinnen und Patienten mit Erstmanifestation einer CU eine stärkere Entzündungsaktivität aufwiesen als jene mit MC.

Damit eventuelle Zusammenhänge zwischen Krankheitsaktivität, welche mittels PUCAI/PCDAI erfasst wurde, und Veränderungen in der Thrombingeneration nachgewiesen werden können, wurden Korrelationen berechnet. Um die statistische Power zu erhöhen, wurden in dieser Analyse die Messzeitpunkte Erstmanifestation, Therapiebeginn und Remission kombiniert. Da es sich bei den Disease-Scores um ordinal skalierte Daten handelt, wurde eine

Spearman Korrelation durchgeführt. Es wurde keine signifikante Korrelation der relativen (Δ) CAT-Parameter, welche auf einen erhöhten PolyP-Gehalt im Blut hinweisen würden, mit den Disease-Scores gefunden (siehe Anhang 1). Ebenso gab es keine signifikante Korrelation zwischen absoluten CAT-Parametern und dem PUCAI. Lediglich der PCDAI korrelierte positiv mit der lag time ($r_s = .67$, $p = .012$) und der TTP ($r_s = .67$, $p = .012$). Die genaue Auflistung ist in Tabelle 8 zu finden.

Tabelle 8

Korrelation zwischen Disease-Scores und absoluten CAT-Parametern

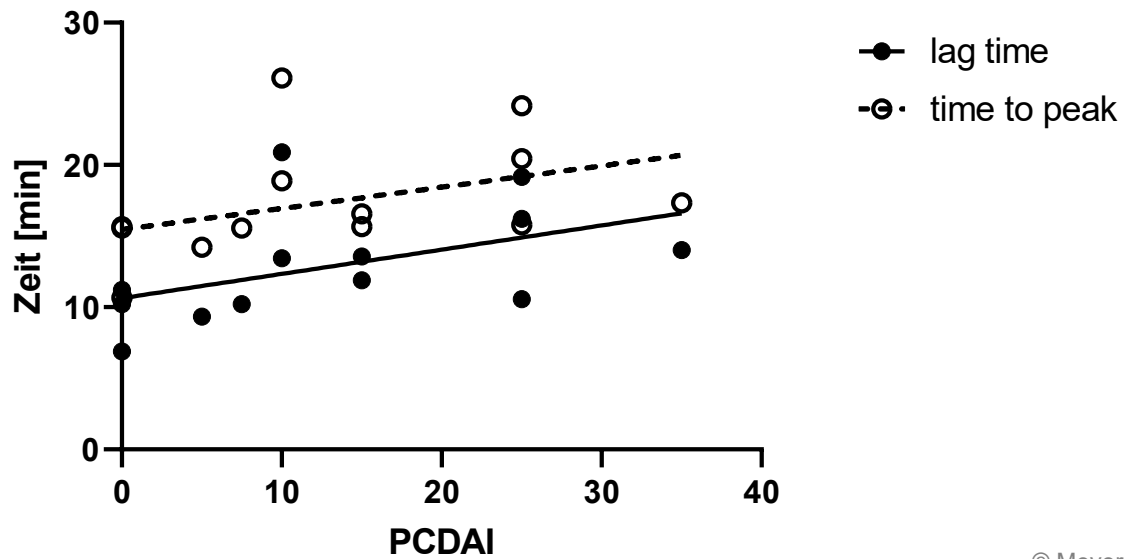
		lag time	ETP	peak	TTP	VelIndex	StartTail
PCDAI	r_s	.67	.27	.31	.67	.29	.04
	p	.012	.377	.299	.012	.342	.899
	n	13	13	13	13	13	13
PUCAI	r_s	.23	.10	-.02	.20	.01	.27
	p	.338	.673	.944	.390	.954	.258
	n	20	20	20	20	20	20

Anmerkung. PCDAI = Pediatric Crohn's Disease Activity Index, PUCAI = Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index, ETP = Endogenous Thrombin Potential, TTP = time to Peak, VelIndex = Velocity Index. In fettgedruckter Schrift sind die statistisch signifikanten ($p < .05$) Werte hervorgehoben.

In Abbildung 11 ist die positive Korrelation des PCDAI mit den beiden CAT-Parametern lag time und TTP grafisch mittels Scatter Plot dargestellt. Nach Cohen kann bei beiden Messwerten von einer starken Korrelation ($r_s = .67$) gesprochen werden (192).

Abbildung 11

Korrelation zwischen PCDAI und den absoluten CAT-Parametern lag time und time to peak



© Meyer

Anmerkung. PCDAI = Pediatric Crohn's Disease Activity Index.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der Annahme einer erhöhten PolyP-Aktivität im Plasma von pädiatrischen CED-Patientinnen und Patienten bei Erstmanifestation gegenüber gesunden Kontrollen, sowie ein Rückgang dieser Aktivität bei Remission der Erkrankung. Weiters wurde überprüft, ob sich die PolyP-Aktivität in Abhängigkeit der Mesalazin-Einnahme reduzieren lässt. Der Nachweis von PolyP gelingt über die Inhibition von TFPI und den daraus resultierenden Veränderungen in der Thrombingeneration. Über eine Messung mit und ohne exogenem TFPI kann so auf den PolyP-Gehalt im Plasma rückgeschlossen werden.

In der mittels CAT gemessenen Thrombingeneration von pädiatrischen sowie adulten Plasmaproben zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den relativen (Δ) Parametern weder longitudinal noch zwischen den Gruppen, welche indikativ für Unterschiede in der PolyP-Aktivität wären. Auch die Untersuchungen bezüglich Abhängigkeit der PolyP-Aktivität von der Mesalazineinnahme weisen keine signifikanten Ergebnisse nach. Die absoluten CAT-Parameter hingegen weisen statistisch signifikante Differenzen in Abhängigkeit der Gruppen auf. Die lag time ist bei CED und BGE signifikant kürzer als bei gesunden Personen. Weiters ist das ETP bei allen Gruppen größer als bei gesunden Kontrollen. Zuletzt zeigt auch die peak height des generierten Thrombins einen höheren Wert bei CU und MC gegenüber Gesunden. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen BGE und den CED-Kohorten. Zudem unterscheiden sich auch die MC sowie CU-Gruppe in den absoluten sowie relativen CAT-Parametern nicht voneinander. Weiters zeigt sich eine Verkürzung der lag time zwischen Erstmanifestation und Remission bei Patientinnen und Patienten mit MC. Der PCDAI korreliert signifikant positiv mit den absoluten Parametern lag time und TTP. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem PCDAI und den relativen Parametern. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem PUCAI und den absoluten, ebenso wie den relativen CAT-Parametern.

4.1 Interpretation und Einordnung in die derzeitige Literatur

In dieser Arbeit wurde erstmals endogenes PolyP im Plasma von CED-Patientinnen und Patienten untersucht. Ebenfalls wurde zum ersten Mal die TFPI-inhibierende Wirkung von PolyP zu dessen Nachweis im Plasma verwendet. Da sich keine Unterschiede in den relativen (Δ) Parametern zeigen, scheint endogenes PolyP in der Pathophysiologie von CED keinen, oder nur einen zu vernachlässigenden Effekt auf die Gerinnung auszuüben. Ebenso zeigt sich, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften einer Mesalazintherapie bei CED vermutlich nicht auf die Inhibition der bakteriellen PolyP-Synthese zurückzuführen sind. Eine Tendenz bezüglich einer kürzeren Δ lag time bei MC und CU gegenüber BGE lässt sich bei Betrachten der deskriptiven Statistik (siehe Tabelle 4) erkennen. Patienten mit BGE weisen eine sehr hohe Δ lag time von etwa drei Minuten auf, während jene von MC und CU bei einer bzw. zwei Minuten liegen. Diese Tendenz wird weiter durch das signifikante ($p = .042$) Ergebnis zwischen MC und BGE des Dunnett T3 post hoc Tests unterstrichen, wobei hier nach Bonferroni-Holm-Korrektur das Signifikanzniveau nicht mehr erreicht wurde. Auch gegenüber gesunden Personen kann man besonders bei CU und BGE einen Unterschied vermuten, jedoch erschwert die große Streuung (siehe Tabelle 4 bzw. Abbildung 9) der Kontrollgruppe die Interpretation und ist wahrscheinlich für die geringen Unterschiede verantwortlich.

Es ist anzunehmen, dass der prothrombotische Zustand während aktiver Entzündung bei CED durch andere Mediatoren verursacht wird und PolyP hier keine signifikante Rolle spielt. Da verschiedene Gerinnungsfaktoren wie FV, FVIII, FIX und FXI bei CED verändert sind, erscheint PolyP als alleiniger Auslöser der verstärkten Thrombingeneration bei CED unwahrscheinlich (11,148). Die veränderte Thrombingeneration führt zu einer erhöhten Thromboseneigung. In vivo wird dies vermutlich durch vermehrt ausgeschüttete gerinnungsaktive Substanzen, wie vWF und PAI-1, sowie durch die Thrombozyten selbst zusätzlich verstärkt (11,13,150). Veränderungen dieser Substanzen oder der Thrombozyten selbst sind jedoch mit dem ausgewählten Testverfahren nicht nachweisbar. Eventuell herrscht auch ein Zusammenhang mit der PolyP-Produktion des Mikrobioms. Das Mikrobiom jedes Menschen ist sehr individuell zusammengesetzt (53). So könnten interindividuelle

Unterschiede in der Bakterienverteilung und daraus folgend der PolyP-Synthese die Thrombingeneration bei Übertritt in den Blutkreislauf beeinflussen. Auch der Grad der Darmwandschädigung mit damit einhergehender Barrieredysfunktion könnte den PolyP-Gehalt im Blut beeinflussen. Bis dato gibt es keine routinediagnostischen validierten Methoden, um den Grad der Barrieredysfunktion zu messen (193). Lediglich einzelne, experimentell angewendete Methoden mittels Zuckerbestimmung im Urin können Hinweise auf Leckagen geben. Somit könnte PolyP nur in einer Subgruppe von CED-Patientinnen und Patienten, nämlich jene mit stark geschädigter Darmbarriere, eine signifikante Rolle in der Gerinnung einnehmen.

Im Gegensatz zu den relativen Parametern unterscheiden sich die absoluten Messwerte deutlicher. Während der akuten Phase einer CED und bei BGE herrscht ein prothrombotischer Zustand im Plasma, welcher sich durch erhöhtes ETP und peak Thrombin, sowie verkürzter lag time darstellt. Bernhard et al. sowie Deutschmann et al. zeigten ähnliche Ergebnisse, die auf eine erhöhte Gerinnungsbereitschaft bei Kindern mit CED hindeuten (162,163). In beiden Untersuchungen war das ETP signifikant höher bei CU und MC im Vergleich zu gesunden Personen. Eine Studie von Besser et al. deutet sogar auf eine Assoziation zwischen erhöhtem ETP und rekurrierenden VTEs hin (194). Somit unterstreichen die Ergebnisse unserer Arbeit das weitgehend bekannte Thromboserisiko bei CED-Betroffenen im akuten Schub und verdeutlichen die Notwendigkeit eines engmaschigen Gerinnungsmanagements während der akuten CED-Phase (10,143–145).

Paradoxerweise verkürzt sich die lag time bei MC mit Remission der Erkrankung, was auf eine höhere Gerinnungsbereitschaft im Plasma bei Sistieren der Entzündung hindeutet. Ebenso kontraintuitiv gegenüber der ursprünglichen Annahme des prothrombotischen Shifts ist die signifikant positive Korrelation des PCDAI mit der lag time. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Stercel et al. in einer Studie zu Thrombingeneration bei Kindern mit CED in Abhängigkeit der COVID-19 Immunisierung berichtet (195). Sie zeigten eine ähnlich hohe positive Spearman-Korrelation ($r_s = .57$, $p = .024$) zwischen dem PCDAI und der lag time. Auch die Untersuchung von Bernhard et al. wies einen positiven jedoch nicht signifikanten ($r = .27$, $p = .054$) Trend zwischen der lag time und dem PCDAI auf

(163). Somit würden diese beiden Ergebnisse für eine niedrigere Gerinnungsbereitschaft bei hohem Entzündungsniveau sprechen. Dieses Bild passt jedoch nicht zum erhöhten Thromboserisiko bei CED-Patientinnen und Patienten (10,144). Verantwortlich dafür wäre möglicherweise die endogene TFPI-Konzentration. In Zuständen schwerer Inflammation, wie z.B. Sepsis, wird vermehrt TFPI ausgeschüttet, um einer entstehenden disseminierten intravasalen Koagulopathie entgegenzuwirken (196). Ähnliche Zustände könnten sich auch bei schwerer Erstmanifestation oder bei neuerlichem Schub einer CED zeigen. Leider wurden die endogenen TFPI-Spiegel zur Kontrolle dieses Einflusses nicht erhoben. Eine weitere Erklärung könnten drei Case reports von Çakar et al. liefern (197). Sie berichten von zwei CU-Patienten und einem MC-Patienten mit erworbenem FVII-Mangel bei Erstmanifestation. Der FVII-Mangel könnte durch verminderte Syntheseleistung oder durch erhöhten Verbrauch Zustandekommen und die verlängerte lag time bei höherer Entzündungsaktivität erklären. Da es sich hierbei jedoch nur um Case reports handelt, kann dies nur als Hinweis und nicht als allgemein gültige Aussage gesehen werden.

Der prothrombotische Zustand im Plasma während akuter BGE ist vermutlich auf die Dehydratation durch den massiven Flüssigkeitsverlust bei infektiöser Diarrhoe zurückzuführen. Zudem könnte Fieber als häufig auftretendes Begleitsymptom zur Hyperkoagulabilität beitragen (198). Es gibt derzeit in der Literatur keine Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen den häufigen BGE-Erregern *Salmonella enterica* oder *Campylobacter jejuni* und einer erhöhten Gerinnungsbereitschaft im Plasma. PolyP trägt vermutlich nicht zu dieser erhöhten Gerinnungsbereitschaft bei.

4.3 Limitationen

In diesem Abschnitt soll auf Limitationen dieser Studie eingegangen werden. Besonders Untersuchungen im klinischen Setting sind oft durch limitierte Stichprobengrößen oder patientenbezogene Faktoren, wie etwa Wahrnehmen von Terminen oder Compliance, eingeschränkt. Die Ergebnisse sollten im Kontext dieser Einschränkungen und Hürden gesehen werden.

An erster Stelle sei die niedrige Anzahl der Proben zu Therapiebeginn als Limitation dieser Studie zu nennen. Dies ermöglicht nur eine eingeschränkte

Interpretierbarkeit der longitudinalen Vergleiche. In Anbetracht der niedrigen Inzidenz an pädiatrischen CED-Erstmanifestationen und des longitudinalen Studiendesigns war es trotz mehrjähriger Rekrutierung schwierig eine größere Stichprobengröße zu generieren. Zudem führten Ausschlüsse nach Abschluss der Rekrutierung zu einer weiteren Reduktion der Stichprobengröße. Zur Lösung der eingeschränkten Power wurden in Kapitel 3.3 gepaarte t-Tests zwischen Erstmanifestation und Remission durchgeführt.

Als eine weitere Einschränkung erweist sich das Alter der Kontrollgruppe. Da es ethisch nicht rechtfertigbar ist, gesunden Kindern zur Bildung einer gleichaltrigen Kontrollgruppe dieser Studie Blut abzunehmen, besteht diese ausschließlich aus Blutplasmaproben von Erwachsenen. In der Interpretation der relativen (Δ) Ergebnisse stellt dies nur ein geringes Problem dar, weil kein Einfluss des Alters auf den PolyP-Gehalt der Thrombozyten bzw. auf die PolyP-Synthese des Darmmikrobioms nachgewiesen wurde. Jedoch zeigten Haidl et al. ein steigendes ETP mit höherem Alter, wodurch die Unterschiede zwischen CED und BGE gegenüber Kontrollen kleiner ausfallen könnten als sie tatsächlich bei Gleichaltrigen wären (199). Zudem ist die lag time bei Kindern zwischen sieben und elf Jahren signifikant länger als bei Erwachsenen, jedoch machten Kinder dieser Altersgruppe nur einen Bruchteil der Stichprobe dieser Arbeit aus.

Weiters stellt die uneinheitliche Dosierung von Mesalazin eine Einschränkung dar. Es wurde in den Berechnungen nur zwischen Mesalazin ja/nein unterschieden. So könnte ein dosisabhängiger Effekt auf die bakterielle PolyP-Synthese verschleiert werden.

Möglicherweise war die gewählte Methode zur Messung der PolyP-Aktivität nicht sensitiv genug, um kleinere Unterschiede im PolyP-Gehalt zwischen Kontrollen und CED feststellen zu können. Daraus ergäbe sich jedoch nur ein geringer Einfluss auf die TFPI-Inhibition und folglich auch auf das Thromboserisiko. Zudem ist die Messung von PolyP durch dessen TFPI-Inhibition bis dato die einzige Möglichkeit, um PolyP zuverlässig im Plasma ermitteln zu können.

Zum Abschluss stehen die Limitationen in der Präanalytik. Durch venöse Blutentnahme in bereits zuvor mit CTI gefüllte Abnahmeröhrchen hätte eine sichere Unterbindung der Kontaktaktivierung gewährleistet werden können (200). Die

Verhinderung der Kontaktaktivierung wurde im Vorfeld getestet und zeigte bei nochmaliger Zentrifugation zufriedenstellende Ergebnisse. Eine sichere Inhibition könne aber vermutlich nur die Zugabe von CTI garantieren. Da die Blutentnahme jedoch im Rahmen von Routinekontrollen durchgeführt wurde, konnte die Entnahme nur mittels S-Monovette Natrium-Citrat Röhrchen erfolgen. Weiters wäre die Befüllung der einzelnen Entnahmesysteme mit CTI sehr kostenintensiv und daher nicht durchführbar.

4.4 Ausblick

Wir konnten keine negativen Effekte von endogenem PolyP in der Zirkulation bei CED-Patientinnen und Patienten finden. In zukünftigen Untersuchungen sollte der Fokus auf die positiven Effekte von exogenem PolyP in der Pathophysiologie von CED gelegt werden. Die ersten Hinweise einer remissionsinduzierenden Wirkung von oral oder rektal verabreichten PolyP, welche von Fujiya et al. und Segawa et al. beschrieben wurden, sollten in weiteren randomisiert kontrollierten Studien überprüft werden (177,182). Auch die positiven Effekte von PolyP auf die Fibrosierung und Entzündung im Colon, welche bislang nur im Tiermodell nachgewiesen wurden, sollten weiter in klinischen Untersuchungen am Menschen bestätigt werden (180,181). So würde mit PolyP erstmals eine Therapie zugelassen werden, welche über HSP27-Upregulation im Darmlumen eine direkte Verbesserung und Heilung der Darmbarriere induziert (177). Dies verhindert die unangenehmen Nebenwirkungen und Effekte der bisherigen CED-Therapien, die hauptsächlich auf Beeinflussung und Unterdrückung der (Auto-)Immunantwort beruhen. Hier sollten jedoch die möglichen negativen Einflüsse von exogenem PolyP, wenn es durch die geschädigte Darmbarriere in das Blutssystem gelangt, bedacht werden. Exogenes PolyP könnte aufgrund seiner höheren Kettenlänge weitaus stärkere Einflüsse auf Inflammation sowie Gerinnung ausüben, wodurch zu hohe Dosierungen bei geschädigter Darmbarriere potenziell schwerwiegende Nebenwirkungen haben könnten. Die in dieser Arbeit beschriebene Messmethodik könnte in zukünftigen Untersuchungen ein Monitoring diesbezüglich ermöglichen.

Der PolyP-Gehalt im Stuhl von pädiatrischen CED-Patientinnen und Patienten könnte Aufschluss über die pathophysiologische Rolle von mikrobiellem PolyP geben. Da die genaue Rolle des Mikrobioms in der Entstehung sowie

Aufrechterhaltung von CED derzeit noch unklar ist, wäre eine Schlüsselfunktion von bakteriellem PolyP denkbar.

4.5 Fazit

PolyP scheint die Gerinnung bei Kindern mit CED nicht maßgeblich zu beeinflussen. Obwohl mehrere Studien die gerinnungsaktive Rolle von PolyP nachweisen, konnte eine Beeinflussung der Thrombingeneration bei CED nicht gezeigt werden. Die PolyP-abhängigen Veränderungen unterscheiden sich weder zwischen CED und BGE noch im Vergleich zu gesunden Personen. Die Entzündungsaktivität im Darm scheint die PolyP-Aktivität ebenso nicht zu beeinflussen, da sich keine Unterschiede zwischen aktiver Phase und Remission finden. Zudem entfaltet Mesalazin seine therapeutische Wirkung bei CED vermutlich nicht durch die Inhibition der bakteriellen PolyP-Synthese.

Ungeachtet dessen stellt sich ein prothrombotischer Zustand, charakterisiert durch erhöhtes ETP und peak Thrombin sowie verkürzter lag time, in der Akutphase einer CED und bei BGE dar. Erhöhte Entzündungsaktivität, gemessen durch den PCDAI, scheint jedoch die lag time zu verlängern, wodurch der potenzielle Effekt des erhöhten ETP geschwächt werden könnte.

Zukünftige Untersuchungen sollten den Fokus auf die Rolle von exogen applizierten PolyP in der Pathophysiologie von CED legen. PolyP könnte so als etwaiges neues Medikament einen Fortschritt in der CED-Therapie bringen und als Alternative für die derzeitigen nebenwirkungsreichen sowie kostenintensiven Medikamente dienen.

Literaturverzeichnis

1. Kern I, Schoffer O, Kiess W, Henker J, Laaß MW, Winkler U, et al. Incidence trends of pediatric onset inflammatory bowel disease in the years 2000-2009 in Saxony, Germany-first results of the Saxon Pediatric IBD Registry. *PloS One*. 2021;16(1). DOI:10.1371/journal.pone.0243774
2. Kern I, Schoffer O, Richter T, Kiess W, Flemming G, Winkler U, et al. Current and projected incidence trends of pediatric-onset inflammatory bowel disease in Germany based on the Saxon Pediatric IBD Registry 2000-2014 -a 15-year evaluation of trends. *PloS One*. 2022;17(9). DOI:10.1371/journal.pone.0274117
3. Ghione S, Sarter H, Fumery M, Armengol-Debeir L, Savoye G, Ley D, et al. Dramatic Increase in Incidence of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease (1988-2011): A Population-Based Study of French Adolescents. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(2):265–72. DOI:10.1038/ajg.2017.228
4. Benchimol EI, Bernstein CN, Bitton A, Carroll MW, Singh H, Otley AR, et al. Trends in Epidemiology of Pediatric Inflammatory Bowel Disease in Canada: Distributed Network Analysis of Multiple Population-Based Provincial Health Administrative Databases. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(7):1120–34. DOI:10.1038/ajg.2017.97
5. Kuenzig ME, Fung SG, Marderfeld L, Mak JWY, Kaplan GG, Ng SC, et al. Twenty-first Century Trends in the Global Epidemiology of Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease: Systematic Review. *Gastroenterology*. 2022;162(4):1147-1159.e4. DOI:10.1053/j.gastro.2021.12.282
6. Coward S, Clement F, Benchimol E, Bernstein C, Bitton A, Carroll M, et al. Tu1698 - Analyzing the Rising Prevalence of IBD: Predicting the Prevalence in 2030 by age Group. *Gastroenterology*. 2018;154(6):992-993. DOI:10.1016/S0016-5085(18)33324-9
7. Johnston RD, Logan RFA. What is the peak age for onset of IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14 Suppl 2:4-5. DOI:10.1002/ibd.20545
8. Dubinsky M. Special issues in pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):413–20. DOI:10.3748/wjg.14.413

9. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 2009;139(6):1143–56. DOI:10.1016/j.cell.2009.11.001
10. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(1):174–86. DOI:10.1111/j.1572-0241.2006.00943.x
11. Alkim H, Ayaz S, Alkim C, Ulker A, Sahin B. Continuous active state of coagulation system in patients with nonthrombotic inflammatory bowel disease. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 2011;17(6):600–4. DOI:10.1177/1076029611405034
12. van Bodegraven AA, Schoorl M, Linskens RK, Bartels PC, Tuynman HA. Persistent activation of coagulation and fibrinolysis after treatment of active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002;14(4):413–8. DOI:10.1097/00042737-200204000-00014
13. Collins CE, Cahill MR, Newland AC, Rampton DS. Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994;106(4):840–5. DOI:10.1016/0016-5085(94)90741-2
14. Park KT, Ehrlich OG, Allen JI, Meadows P, Szigethy EM, Henrichsen K, et al. The Cost of Inflammatory Bowel Disease: An Initiative From the Crohn's & Colitis Foundation. *Inflamm Bowel Dis*. 2020;26(1):1–10. DOI:10.1093/ibd/izz104
15. van Linschoten RCA, Visser E, Niehot CD, van der Woude CJ, Hazelzet JA, van Noord D, et al. Systematic review: societal cost of illness of inflammatory bowel disease is increasing due to biologics and varies between continents. *Aliment Pharmacol Ther*. 2021;54(3):234–48. DOI:10.1111/apt.16445
16. Krol M, Brouwer W, Rutten F. Productivity costs in economic evaluations: past, present, future. *PharmacoEconomics*. 2013;31(7):537–49. DOI:10.1007/s40273-013-0056-3
17. Kigozi J, Jowett S, Lewis M, Barton P, Coast J. The Estimation and Inclusion of Presenteeism Costs in Applied Economic Evaluation: A Systematic Review. *Value Health J Int Soc Pharmacoeconomics Outcomes Res*. 2017;20(3):496–506. DOI:10.1016/j.jval.2016.12.006

18. Greuter T, Vavricka SR. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease - epidemiology, genetics, and pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;13(4):307–17. DOI:10.1080/17474124.2019.1574569
19. Thurgate LE, Lemberg DA, Day AS, Leach ST. An Overview of Inflammatory Bowel Disease Unclassified in Children. *Inflamm Intest Dis*. 2019;4(3):97–103. DOI:10.1159/000501519
20. Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *JAMA Pediatr*. 2015;169(11):1053–60. DOI:10.1001/jamapediatrics.2015.1982
21. Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Dis Mon DM*. 2019;65(12):100851. DOI:10.1016/j.disamonth.2019.02.004
22. Patil DT, Odze RD. Backwash Is Hogwash: The Clinical Significance of Ileitis in Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(8):1211–4. DOI:10.1038/ajg.2017.182
23. Najarian RM, Ashworth LA, Wang HH, Bousvaros A, Goldsmith JD. Microscopic/"Backwash" Ileitis and Its Association With Colonic Disease in New Onset Pediatric Ulcerative Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;68(6):835–40. DOI:10.1097/MPG.0000000000002272
24. Lin J, McKenna BJ, Appelman HD. Morphologic findings in upper gastrointestinal biopsies of patients with ulcerative colitis: a controlled study. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1672–7. DOI:10.1097/PAS.0b013e3181f3de93
25. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon DM*. 2018;64(2):20–57. DOI:10.1016/j.disamonth.2017.07.001
26. Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg*. 2017;26(6):349–55. DOI:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003
27. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1713–25. DOI:10.1056/NEJMra1102942

28. Sökülmez P, Demirbağ AE, Arslan P, Dişibeyaz S. Effects of enteral nutritional support on malnourished patients with inflammatory bowel disease by subjective global assessment. *Turk J Gastroenterol Off J Turk Soc Gastroenterol*. 2014;25(5):493–507. DOI:10.5152/tjg.2014.4955
29. Borren NZ, van der Woude CJ, Ananthakrishnan AN. Fatigue in IBD: epidemiology, pathophysiology and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(4):247–59. DOI:10.1038/s41575-018-0091-9
30. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, et al. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(6):795–806. DOI:10.1097/MPG.0000000000000239
31. Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(3):359–66. DOI:10.1002/ibd.20336
32. Sipponen T, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(1):40–6. DOI:10.1002/ibd.20312
33. Rendek Z, Falk M, Grodzinsky E, Wahlin K, Kechagias S, Svernlöv R, et al. Effect of oral diclofenac intake on faecal calprotectin. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(1):28–32. DOI:10.3109/00365521.2015.1066421
34. Ayling RM, Kok K. Fecal Calprotectin. *Adv Clin Chem*. 2018;87:161–90. DOI:10.1016/bs.acc.2018.07.005
35. Stöcker W. Autoantikörper gegen Granulozytenzytoplasma. In: Gressner AM, Arndt T (eds), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 290–2.
36. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G, Dubinsky M, Braun J, Seidman EG. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1998;115(4):822–9. DOI:10.1016/s0016-5085(98)70252-5
37. Hoffenberg EJ, Fidanza S, Sauaia A. Serologic testing for inflammatory bowel disease. *J Pediatr*. 1999;134(4):447–52. DOI:10.1016/s0022-3476(99)70202-7

38. Bartůnková J, Kolárová I, Sedivá A, Hölzelová E. Antineutrophil cytoplasmic antibodies, anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, and specific IgE to food allergens in children with inflammatory bowel diseases. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2002;102(2):162–8. DOI:10.1006/clim.2001.5145
39. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis.* 2008;2(1):1–23. DOI:10.1016/j.crohns.2007.11.001
40. Politis DS, Katsanos KH, Tsianos EV, Christodoulou DK. Pseudopolyps in inflammatory bowel diseases: Have we learned enough? *World J Gastroenterol.* 7. 2017;23(9):1541–51. DOI:10.3748/wjg.v23.i9.1541
41. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis.* 2010;4(1):7–27. DOI:10.1016/j.crohns.2009.12.003
42. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(23):3668–72. DOI:10.3748/wjg.v12.i23.3668
43. Chang JT. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2652–64. DOI:10.1056/NEJMra2002697
44. Vermeire S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18(3):569–75. DOI:10.1016/j.bpg.2003.12.008
45. Martini GA, Brandes JW. Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr.* 1976;54(8):367–71. DOI:10.1007/BF01469792
46. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrügger RW, Brummer RJM. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(4):1008–13. DOI:10.1111/j.1572-0241.2000.01942.x

47. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Korzenik JR, et al. A Prospective Study of Long-term Intake of Dietary Fiber and Risk of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2013;145(5):970–7. DOI:10.1053/j.gastro.2013.07.050
48. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre J. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1996;110(2):424–31. DOI:10.1053/gast.1996.v110.pm8566589
49. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(11):1462–71. DOI:10.4065/81.11.1462
50. Cosnes J, Nion-larmurier I, Afchain P, Beaugerie L, Gendre J pierre. Gender differences in the response of colitis to smoking. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(1):41–8. DOI:10.1016/s1542-3565(03)00290-8
51. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol*. 2007;13(46):6134–9. DOI:10.3748/wjg.v13.i46.6134
52. Uberoi A, Bartow-McKenney C, Zheng Q, Flowers L, Campbell A, Knight SAB, et al. Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Host Microbe*. 2021;29(8):1235-1248.e8. DOI:10.1016/j.chom.2021.05.011
53. Round JL, Palm NW. Causal effects of the microbiota on immune-mediated diseases. *Sci Immunol*. 2018;3(20):eaao1603. DOI:10.1126/sciimmunol.aao1603
54. Galvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49(6):601–8. DOI:10.1002/mnfr.200500013
55. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):382–92. DOI:10.1016/j.chom.2014.02.005
56. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1489–99. DOI:10.1053/j.gastro.2014.02.009

57. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):352–61. DOI:10.1038/nrgastro.2013.35
58. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(4):379–83. DOI:10.1097/MOG.0b013e32816aa392
59. Söderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzén LE, Weström B, Magnusson KE, et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology*. 1999;117(1):65–72. DOI:10.1016/s0016-5085(99)70551-2
60. Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1165–79. DOI:10.3748/wjg.v20.i5.1165
61. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799–809. DOI:10.1038/nri2653
62. Parikh K, Antanaviciute A, Fawkner-Corbett D, Jagielowicz M, Aulicino A, Lagerholm C, et al. Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature*. 2019;567(7746):49–55. DOI:10.1038/s41586-019-0992-y
63. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res*. 2015;13(1):11–8. DOI:10.5217/ir.2015.13.1.11
64. Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):715–20. DOI:10.1016/j.coph.2009.06.022
65. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61–72. DOI:10.1136/gut.2006.094375
66. Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sánchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1526. DOI:10.3390/ijms24021526

67. Neurath MF, Leppkes M. Resolution of ulcerative colitis. *Semin Immunopathol.* 2019;41(6):747–56. DOI:10.1007/s00281-019-00751-6
68. Hansberry DR, Shah K, Agarwal P, Agarwal N. Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Cureus.* 2017;9(1):e1004. DOI:10.7759/cureus.1004
69. Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI, Poli G. Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(14):1711–47. DOI:10.1089/ars.2012.4530
70. Li T, Wang C, Liu Y, Li B, Zhang W, Wang L, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Intestinal Damage and Thrombotic Tendency in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2020;14(2):240–53. DOI:10.1093/ecco-jcc/jjz132
71. Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, Bonderup OK, Glerup H, Bøgsted M, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(9):2052–67. DOI:10.1097/MIB.0000000000000460
72. Wéra O, Lancellotti P, Oury C. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med.* 2016;5(12):118. DOI:10.3390/jcm5120118
73. Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, et al. 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(14):8366–71. DOI:10.1073/pnas.1432897100
74. Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology.* 2013;145(2):407–15. DOI:10.1053/j.gastro.2013.04.011
75. Watson AJM, Hughes KR. TNF- α -induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1258:1–8. DOI:10.1111/j.1749-6632.2012.06523.x
76. Shahdadi Sardo H, Saremnejad F, Bagheri S, Akhgari A, Afrasiabi Garekani H, Sadeghi F. A review on 5-aminosalicylic acid colon-targeted oral drug delivery systems. *Int J Pharm.* 2019;558:367–79. DOI:10.1016/j.ijpharm.2019.01.022

77. Cai Z, Wang S, Li J. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Front Med.* 2021;8:765474. DOI:10.3389/fmed.2021.765474
78. Desreumaux P, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24 Suppl 1:2–9. DOI:10.1111/j.1365-2036.2006.03069.x
79. Nielsen OH, Munck LK. Drug insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007;4(3):160–70. DOI:10.1038/ncpgasthep0696
80. Joshi R, Kumar S, Unnikrishnan M, Mukherjee T. Free radical scavenging reactions of sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine: Mechanistic aspects and antioxidant activity. *Free Radic Res.* 2005;39(11):1163–72. DOI:10.1080/10715760500177880
81. Stenson WF, Lobos E. Sulfasalazine inhibits the synthesis of chemotactic lipids by neutrophils. *J Clin Invest.* 1982;69(2):494–7. DOI:10.1172/jci110474
82. Graefe KH. Nebennierenrinde. In: Graefe KH, Lutz W, Bönisch H. *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie.* 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. S. 375–84.
83. Marshall JK, Irvine EJ. Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 1997;40(6):775–81. DOI:10.1136/gut.40.6.775
84. Khan KJ, Dubinsky MC, Ford AC, Ullman TA, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of Immunosuppressive Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2011;106(4):630. DOI:10.1038/ajg.2011.64
85. Sewell GW, Kaser A. Interleukin-23 in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Implications for Therapeutic Intervention. *J Crohns Colitis.* 2022;16(Supplement_2):ii3–19. DOI:10.1093/ecco-jcc/jjac034
86. Moschen AR, Tilg H, Raine T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(3):185–96. DOI:10.1038/s41575-018-0084-8

87. Singh S, Murad MH, Fumery M, Sedano R, Jairath V, Panaccione R, et al. Comparative Efficacy and Safety of Biologic Therapies for Moderate-to-Severe Crohn's Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(12):1002–14. DOI:10.1016/S2468-1253(21)00312-5
88. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228(1):273. DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x
89. Sandborn WJ, Feagan BG, Wolf DC, D'Haens G, Vermeire S, Hanauer SB, et al. Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med*. 2016;374(18):1754–62. DOI:10.1056/NEJMoa2033617
90. Wils P, Peyrin-Biroulet L. Etrasimod for the treatment of ulcerative colitis. *Immunotherapy*. 2023;15(5):311–21. DOI:10.2217/imt-2022-0255
91. Baunwall SMD, Andreasen SE, Hansen MM, Kelsen J, Høyer KL, Rågård N, et al. Faecal microbiota transplantation for first or second *Clostridioides difficile* infection (EarlyFMT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(12):1083–91. DOI:10.1016/S2468-1253(22)00276-X
92. Haifer C, Paramsothy S, Kaakoush NO, Saikal A, Ghaly S, Yang T, et al. Lyophilised oral faecal microbiota transplantation for ulcerative colitis (LOTUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022;7(2):141–51. DOI:10.1016/S2468-1253(21)00400-3
93. Toptan T, Ciesek S, Hoehl S. Pediatrics and COVID-19. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1318:197–208. DOI:10.1007/978-3-030-63761-3_12
94. Olén O, Askling J, Sachs MC, Frumento P, Neovius M, Smedby KE, et al. Increased Mortality of Patients With Childhood-Onset Inflammatory Bowel Diseases, Compared With the General Population. *Gastroenterology*. 2019;156(3):614–22. DOI:10.1053/j.gastro.2018.10.028
95. Griffiths AM. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18(3):509–23. DOI:10.1016/j.bpg.2004.01.002
96. Amaro F, Chiarelli F. Growth and Puberty in Children with Inflammatory Bowel Diseases. *Biomedicines*. 2020;8(11):458. DOI:10.3390/biomedicines8110458

97. Sauer CG, Kugathasan S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009;38(4):611–28. DOI:10.1016/j.gtc.2009.07.010
98. Paganelli M, Albanese C, Borrelli O, Civitelli F, Canitano N, Viola F, et al. Inflammation is the main determinant of low bone mineral density in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(4):416–23. DOI:10.1002/ibd.20039
99. Laakso S, Valta H, Verkasalo M, Toiviainen-Salo S, Mäkitie O. Compromised peak bone mass in patients with inflammatory bowel disease--a prospective study. *J Pediatr.* 2014;164(6):1436-1443.e1. DOI:10.1016/j.jpeds.2014.01.073
100. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16389–97. DOI:10.3748/wjg.v20.i44.16389
101. Friedberg S, Rubin DT. Intestinal Cancer and Dysplasia in Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2022;51(2):369–79. DOI:10.1016/j.gtc.2021.12.011
102. Baretton GB, Aust DE. Intraepitheliale Neoplasie/Dysplasie – Diagnose bei Colitis ulcerosa. *Pathol.* 2008;29(2):280–5. DOI:10.1007/s00292-008-1057-4
103. Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM, Frisch M. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology.* 2012;143(2):375-381.e1; quiz e13-14. DOI:10.1053/j.gastro.2012.04.016
104. Brackmann S, Andersen SN, Aamodt G, Langmark F, Clausen OPF, Aadland E, et al. Relationship between clinical parameters and the colitis-colorectal cancer interval in a cohort of patients with colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(1):46–55. DOI:10.1080/00365520801977568
105. Fumery M, Singh S, Dulai PS, Gower-Rousseau C, Peyrin-Biroulet L, Sandborn WJ. Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2018;16(3):343-356.e3. DOI:10.1016/j.cgh.2017.06.016
106. Prenzel F, Uhlig HH. Frequency of indeterminate colitis in children and adults with IBD - a metaanalysis. *J Crohns Colitis.* 2009;3(4):277–81. DOI:10.1016/j.crohns.2009.07.001

107. Rinawi F, Assa A, Eliakim R, Mozer-Glassberg Y, Nachmias Friedler V, Niv Y, et al. The natural history of pediatric-onset IBD-unclassified and prediction of Crohn's disease reclassification: a 27-year study. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(5):558–63. DOI:10.1080/00365521.2017.1282008
108. Aziz DA, Moin M, Majeed A, Sadiq K, Biloo AG. Paediatric Inflammatory Bowel Disease: Clinical Presentation and Disease Location. *Pak J Med Sci*. 2017;33(4):793–7. DOI:10.12669/pjms.334.12926
109. Greenley RN, Hommel KA, Nebel J, Raboin T, Li SH, Simpson P, et al. A meta-analytic review of the psychosocial adjustment of youth with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Psychol*. 2010;35(8):857–69. DOI:10.1093/jpepsy/jsp120
110. Mackner LM, Greenley RN, Szigethy E, Herzer M, Deer K, Hommel KA. Psychosocial issues in pediatric inflammatory bowel disease: report of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(4):449–58. DOI:10.1097/MPG.0b013e3182841263
111. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515–23. DOI:10.4103/0019-5049.144643
112. Hoth M, Wischmeyer E. Hämostase. In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et. al. *Duale Reihe Physiologie*. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. S. 189–98.
113. Pluthero FG, Kahr WHA. Evaluation of human platelet granules by structured illumination laser fluorescence microscopy. *Platelets*. 2023;34(1):2157808. DOI:10.1080/09537104.2022.2157808
114. Hoffman MM, Monroe DM. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep*. 2005;4(5):391–6. DOI:10.2491/jjsth.16.70
115. Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1260–9. DOI:10.1093/clinchem/46.8.1260
116. Lewandowska MD, Connors JM. Factor XI Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2021;35(6):1157–69. DOI:10.1016/j.hoc.2021.07.012
117. Gailani D, Wheeler A, Neff A. Rare Coagulation Factor Deficiencies. *Hematology*. 2018;2034–50. DOI:10.1016/B978-0-323-35762-3.00137-2

118. Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood*. 2018;131(17):1903–9. DOI:10.1182/blood-2017-04-569111
119. Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost JTH*. 2016;14(1):28–39. DOI:10.1111/jth.13194
120. Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, Sun M fu, Cheng Q, Dickeson SK, et al. An update on factor XI structure and function. *Thromb Res*. 2018;161:94–105. DOI:10.1016/j.thromres.2017.10.008
121. Golas A, Yeh CHJ, Pitakjakpipop H, Siedlecki CA, Vogler EA. A Comparison of Blood Factor XII Autoactivation in Buffer, Protein Cocktail, Serum, and Plasma Solutions. *Biomaterials*. 2013;34(3):607–20. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.09.034
122. Renné T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):31–41. DOI:10.1007/s00281-011-0288-2
123. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6388–93. DOI:10.1073/pnas.0608647104
124. Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res*. 2016;118(9):1392–408. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.306853
125. Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, et al. New topics in bradykinin research. *Allergy*. 2011;66(11):1397–406. DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02686.x
126. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator. *J Biol Chem*. 2002;277(20):17962–9. DOI:10.1074/jbc.M106101200
127. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. 1985;101(3):880–6. DOI:10.1083/jcb.101.3.880
128. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*. 1999;103(6):879–87. DOI:10.1172/JCI6042

129. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004;126(3):298–306.
DOI:10.1111/j.1365-2141.2004.05032.x
130. Gross PL. Soluble P-selectin is the smoke, not the fire. *Blood.* 2017;130(2):101–2.
DOI:10.1182/blood-2017-05-786319
131. Drake WT, Lopes NN, Fenton JW, Issekutz AC. Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1992;67(5):617–27.
132. Sower LE, Froelich CJ, Carney DH, Fenton JW, Klimpel GR. Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells. Evidence for the involvement of the seven-transmembrane domain (STD) receptor for alpha-thrombin. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995;155(2):895–901. DOI:10.4049/jimmunol.155.2.895
133. Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006;54(2):75–84. DOI:10.1007/s00005-006-0010-6
134. Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clin Chim Acta.* 2023;548:117487. DOI:10.1016/j.cca.2023.117487
135. Vestweber D. Novel insights into leukocyte extravasation. *Curr Opin Hematol.* 2012;19(3):212–7. DOI:10.1097/MOH.0b013e3283523e78
136. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391(6667):591–4. DOI:10.1038/35393
137. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2000;148(1):75–85.
DOI:10.1016/s0021-9150(99)00241-5
138. Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and Haemostasis. *Br J Haematol.* 2001;115(1):3–12. DOI:10.1046/j.1365-2141.2001.03061.x

139. Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KA, Chan JNE, Figg N, et al. The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. *Immunity*. 2019;50(4):1033-1042.e6. DOI:10.1016/j.immuni.2019.03.003
140. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880–5. DOI:10.1073/pnas.1005743107
141. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SHC, Weitz JI, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1977–84. DOI:10.1161/ATVBAHA.114.304114
142. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu YB, Sparkenbaugh E, Pawlinski R, Monroe DM, et al. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood*. 2017;129(8):1021–9. DOI:10.1182/blood-2016-06-722298
143. Miehsler W, Reinisch W, Valic E, Osterode W, Tillinger W, Feichtenschlager T, et al. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut*. 2004;53(4):542–8. DOI:10.1136/gut.2003.025411
144. Kappelman MD, Horvath-Puho E, Sandler RS, Rubin DT, Ullman TA, Pedersen L, et al. Thromboembolic risk among Danish children and adults with inflammatory bowel diseases: a population-based nationwide study. *Gut*. 2011;60(7):937–43. DOI:10.1136/gut.2010.228585
145. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(1):97–101. DOI:10.1046/j.1572-0241.2003.04026.x
146. Nguyen GC, Sam J. Rising prevalence of venous thromboembolism and its impact on mortality among hospitalized inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(9):2272–80. DOI:10.1111/j.1572-0241.2008.02052.x
147. Koutroubakis IE. Therapy insight: Vascular complications in patients with inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005;2(6):266–72. DOI:10.1038/ncpgasthep0190

- 148.Kume K, Yamasaki M, Tashiro M, Yoshikawa I, Otsuki M. Activations of coagulation and fibrinolysis secondary to bowel inflammation in patients with ulcerative colitis. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2007;46(17):1323–9. DOI:10.2169/internalmedicine.46.0237
- 149.Cheng K, Faye AS. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2020;26(12):1231–41. DOI:10.3748/wjg.v26.i12.1231
- 150.Järemo P, Sandberg-Gertzen H. Platelet density and size in inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost.* 1996;75(4):560–1. DOI:10.1055/s-0038-1650321
- 151.Danese S, de la Motte C, Sturm A, Vogel JD, West GA, Strong SA, et al. Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology.* 2003;124(5):1249–64. DOI:10.1016/s0016-5085(03)00289-0
- 152.Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M, et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut.* 2003;52(10):1435–41. DOI:10.1136/gut.52.10.1435
- 153.Ludwiczek O, Kaser A, Tilg H. Plasma levels of soluble CD40 ligand are elevated in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(2):142–7. DOI:10.1007/s00384-002-0425-4
- 154.Gris JC, Schved JF, Raffanel C, Dubois A, Aguilar-Martinez P, Arnaud A, et al. Impaired fibrinolytic capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost.* 1990;63(3):472–5. DOI:10.1055/s-0038-1645068
- 155.Owczarek D, Cibor D, Sałapa K, Głowacki MK, Mach T, Undas A. Reduced plasma fibrin clot permeability and susceptibility to lysis in patients with inflammatory bowel disease: a novel prothrombotic mechanism. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(12):2616–24. DOI:10.1097/01.MIB.0000437041.59208.44
- 156.More L, Sim R, Hudson M, Dhillon AP, Pounder R, Wakefield AJ. Immunohistochemical study of tissue factor expression in normal intestine and idiopathic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 1993;46(8):703–8. DOI:10.1136/jcp.46.8.703

157. Dhillon AP, Anthony A, Sim R, Wakefield AJ, Sankey EA, Hudson M, et al. Mucosal capillary thrombi in rectal biopsies. *Histopathology*. 1992;21(2):127–33.
DOI:10.1111/j.1365-2559.1992.tb00360.x
158. Carty E, MacEy M, Rampton DS. Inhibition of platelet activation by 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14(9):1169–79.
DOI:10.1046/j.1365-2036.2000.00824.x
159. deFonseka AM, Tuskey A, Conaway MR, Behm BW. Antitumor Necrosis Factor- α Therapy Is Associated With Reduced Risk of Thromboembolic Events in Hospitalized Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(7):578–83.
DOI:10.1097/MCG.0000000000000408
160. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PLA, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*. 2003;88(5):547–54.
161. Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, Villa F, Bruno S, Vecchi M, et al. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thromb Res*. 2010;125(3):278–82. DOI:10.1016/j.thromres.2009.10.012
162. Deutschmann A, Schlagenhaut A, Leschnik B, Hoffmann KM, Hauer A, Muntean W. Increased procoagulant function of microparticles in pediatric inflammatory bowel disease: role in increased thrombin generation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(4):401–7. DOI:10.1097/MPG.0b013e31827daf72
163. Bernhard H, Deutschmann A, Leschnik B, Schweintzger S, Novak M, Hauer A, et al. Thrombin generation in pediatric patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(11):2333–9. DOI:10.1002/ibd.21631
164. Kumble KD, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5818–22. DOI:10.1074/jbc.270.11.5818
165. Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:89–125.
DOI:10.1146/annurev.biochem.68.1.89
166. Morrissey JH, Choi SH, Smith SA. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood*. 2012;119(25):5972–9.
DOI:10.1182/blood-2012-03-306605

167. Müller WEG, Wang X, Neufurth M, Schröder HC. Polyphosphate in Antiviral Protection: A Polyanionic Inorganic Polymer in the Fight Against Coronavirus SARS-CoV-2 Infection. *Prog Mol Subcell Biol.* 2022;61:145–89. DOI:10.1007/978-3-031-01237-2_7
168. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem.* 2004;279(43):44250–7. DOI:10.1074/jbc.M406261200
169. Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Sixma JJ. Patients With a Prolonged Bleeding Time and Normal Aggregation Tests May Have Storage Pool Deficiency: Studies on One Hundred Six Patients. *Blood.* 1987;70(3):620–3. DOI:10.1182/blood.V70.3.620.620
170. Hernández-Ruiz L, Sáez-Benito A, Pujol-Moix N, Rodríguez-Martorell J, Ruiz FA. Platelet inorganic polyphosphate decreases in patients with delta storage pool disease. *J Thromb Haemost JTH.* 2009;7(2):361–3. DOI:10.1111/j.1538-7836.2008.03238.x
171. Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood.* 2011;118(26):6963–70. DOI:10.1182/blood-2011-07-368811
172. Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate accelerates factor V activation by factor XIa. *Thromb Haemost.* 2015;113(3):599–604. DOI:10.1160/TH14-06-0515
173. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(4):903–8. DOI:10.1073/pnas.0507195103
174. Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):90–3. DOI:10.1055/s-0038-1642658
175. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Reinstra CM, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood.* 2010;116(20):4353–9. DOI:10.1182/blood-2010-01-266791
176. Verhoef JJF, Barendrecht AD, Nickel KF, Dijkxhoorn K, Kenne E, Labberton L, et al. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood.* 2017;129(12):1707–17. DOI:10.1182/blood-2016-08-734988

- 177.Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, et al. Probiotic-Derived Polyphosphate Enhances the Epithelial Barrier Function and Maintains Intestinal Homeostasis through Integrin–p38 MAPK Pathway. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23278. DOI:10.1371/journal.pone.0023278
- 178.Park KJ, Gaynor RB, Kwak YT. Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2003;278(37):35272–8. DOI:10.1074/jbc.M305095200
- 179.Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694–702. DOI:10.1016/0016-5085(90)90290-h
- 180.Kashima S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, et al. Polyphosphate, an active molecule derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis. *Transl Res*. 2015;166(2):163–75. DOI:10.1016/j.trsl.2015.02.002
- 181.Isozaki S, Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Murakami Y, Kashima S, et al. Probiotic-Derived Polyphosphate Accelerates Intestinal Epithelia Wound Healing through Inducing Platelet-Derived Mediators. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:5582943. DOI:10.1155/2021/5582943
- 182.Fujiya M, Ueno N, Kashima S, Tanaka K, Sakatani A, Ando K, et al. Long-Chain Polyphosphate Is a Potential Agent for Inducing Mucosal Healing of the Colon in Ulcerative Colitis. *Clin Pharmacol Ther*. 2020;107(2):452–61. DOI:10.1002/cpt.1628
- 183.Dahl JU, Gray MJ, Bazopoulou D, Beaufay F, Lempart J, Koenigsknecht MJ, et al. The anti-inflammatory drug mesalamine targets bacterial polyphosphate accumulation. *Nat Microbiol*. 2017;2:16267. DOI:10.1038/nmicrobiol.2016.267
- 184.Labberton L, Kenne E, Long AT, Nickel KF, Di Gennaro A, Rigg RA, et al. Neutralizing blood-borne polyphosphate in vivo provides safe thromboprotection. *Nat Commun*. 2016;7:12616. DOI:10.1038/ncomms12616
- 185.Travers RJ, Shenoi RA, Kalathottukaren MT, Kizhakkedathu JN, Morrissey JH. Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. *Blood*. 2014;124(22):3183–90. DOI:10.1182/blood-2014-05-577932

186. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5–6):249–53. DOI:10.1159/000073575
187. Depasse F, Binder NB, Mueller J, Wissel T, Schwers S, Germer M, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *J Thromb Haemost*. 2021;19(12):2907–17. DOI:10.1111/jth.15529
188. Wilcox R. *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing*. 3. Aufl. Boston: Elsevier; 2013.
189. Blanca MJ, Alarcón R, Arnau J, Bono R, Bendayan R. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*. 2017;29(4):552–7. DOI:10.7334/psicothema2016.383
190. Schmider E, Ziegler M, Danay E, Beyer L, Bühner M. Is It Really Robust? *Methodology*. 2010;6(4):147–51. DOI:10.1027/1614-2241/a000016
191. Hochberg Y, Tamhane AC. *Procedures for One-Way Layouts with Unequal Variances*. In: *Multiple Comparison Procedures*. John Wiley & Sons, Ltd; 1987. S. 179–206.
192. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2. Aufl. New York: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.
193. Camilleri M. The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans. *Gut*. 2019;68(8):1516–26. DOI:10.1136/gutjnl-2019-318427
194. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost JTH*. 2008;6(10):1720–5. DOI:10.1111/j.1538-7836.2008.03117.x
195. Stercel V, Lóczi L, Kadenczki O, Nemes É, Nagy B, Hodossy-Takács R, et al. Effect of anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccination on thrombin generation in children with inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2023;14:1257072. DOI:10.3389/fimmu.2023.1257072

- 196.Xue M, Sun Z, Shao M, Yin J, Deng Z, Zhang J, et al. Diagnostic and prognostic utility of tissue factor for severe sepsis and sepsis-induced acute lung injury. *J Transl Med.* 2015;13(1):172. DOI:10.1186/s12967-015-0518-9
- 197.Çakar S, Eren G, Karapınar TH, Ecevit ÇÖ, Bekem Ö. Acquired factor VII deficiency in pediatric inflammatory bowel disease: Report of three cases. *Arab J Gastroenterol Off Publ Pan-Arab Assoc Gastroenterol.* 2023;24(4):256–8. DOI:10.1016/j.ajg.2023.10.002
- 198.Meyer MAS, Ostrowski SR, Overgaard A, Ganio MS, Secher NH, Crandall CG, et al. Hypercoagulability in response to elevated body temperature and central hypovolemia. *J Surg Res.* 2013;185(2):e93-100. DOI:10.1016/j.jss.2013.06.012
- 199.Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost.* 2006;95(5):772–5. DOI:10.1160/TH05-10-0685
- 200.Touw CE, de Jong Y, van Hylckama Vlieg A. The influence of corn trypsin inhibitor on the contribution of coagulation determinants to the Technoclone Thrombin Generation Assay (TGA) and the Calibrated Automated Thrombogram (CAT). *PLoS ONE.* 2022;17(2):e0263960. DOI:10.1371/journal.pone.0263960

Anhang

Anhang 1

Korrelation zwischen Disease-Scores und relativen CAT-Parametern

		Δ lag time	Δ ETP	Δ peak	Δ TTP	Δ VellIndex	Δ StartTail
PCDAI	r_s	-.25	.47	.29	-.17	.23	.27
	p	.420	.107	.342	.585	.459	.382
	n	13	13	13	13	13	13
PUCAI	r_s	.03	.09	.09	-.03	.11	-.06
	p	.906	.723	.706	.896	.655	.805
	n	20	20	20	20	20	20

Anmerkung: PCDAI = Pediatric Crohn's Disease Activity Index, PUCAI = Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index, ETP = Endogenous Thrombin Potential, TTP = time to peak, VellIndex = Velocity Index.