

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Zemlin

Zytokinmuster bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Kindes- und Jugendalter

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021**

vorgelegt von Andrea Ott
geboren am 28.10.1992 in Ulm

Tag der Promotion: 13.07.2021

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Zemlin

Prof. Dr. med. Matthias Glanemann

Meinem Großvater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung und Abstract	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Abstract.....	3
2. Einleitung	5
2.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	5
2.2. Biomarker im Rahmen der CED.....	14
2.3. Zytokine: Definition, Funktionen und Einteilung.....	18
2.4. Zytokine im Rahmen einer CED.....	21
2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	24
3. Material und Methodik	25
3.1. Geräte und Materialien.....	25
3.2. Patientenkollektiv.....	28
3.3. Messung der Zytokinkonzentrationen.....	36
3.4. Statistische Analyse.....	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Patientenkohorte.....	42
4.2. Zytokinmuster.....	49
5. Diskussion	57
5.1. Stärken und Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	57
5.2. Veränderungen im Zytokinmuster von CED-Patienten.....	61
5.3. Schlussfolgerung und Ausblick.....	72

6. Literaturverzeichnis.....	74
7. Danksagung.....	85
8. Lebenslauf.....	86

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Übersicht über die Differenzen der beiden Hauptentitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
- Tabelle 2: Funktionelle Einteilung der untersuchten Zytokine
- Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien
- Tabelle 4: Einteilung in Remission und Schub anhand der Krankheitsaktivität entsprechend der Aktivitätsscores
- Tabelle 5: Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI)
- Tabelle 6: Einteilung des Allgemeinbefindens anhand der Möglichkeit des Schulbesuches
- Tabelle 7: Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)
- Tabelle 8: Unterteilung der Patienten anhand des Alters
- Tabelle 9: Übersicht über die Patientenkohorte
- Tabelle 10: Übersicht über die Medikamenteneinnahme
- Tabelle 11: Übersicht über die Krankheitsphasen und die Anzahl der untersuchten Blutproben
- Tabelle 12: Verteilung der eingeschlossenen Blutproben bezüglich der Krankheitsphasen
- Tabelle 13: Übersicht der Auswertung der Aktivitätsscores PCDAI und PUCAI während Remission und Schub

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese der CED

Abbildung 2: Risikofaktoren der CED

Abbildung 3: Subpopulationen der T-Helferzellen

Abbildung 4: Zytokine und CED

Abbildung 5: Die Paris-Klassifikation

Abbildung 6: Luminex Schritt 1

Abbildung 7: Luminex Schritt 2

Abbildung 8: Luminex Schritt 3

Abbildung 9: Standardherstellung

Abbildung 10: Boxplot: Verteilung des Zytokins MCP-3 gruppiert nach den Krankheitsentitäten

Abbildung 11: Boxplot: Verteilung des Zytokins MIP-1 α gruppiert nach den Krankheitsentitäten

Abbildung 12: Boxplot: Verteilung des Calprotectins gruppiert nach den Krankheitsentitäten

Abbildung 13: Boxplot: Verteilung des Zytokins IP-10 gruppiert nach den Krankheitsentitäten

Abbildung 14: Boxplot: Verteilung des CRP gruppiert nach den Krankheitsentitäten

Abbildung 15: Streudiagramm: Korrelation zwischen dem CRP und dem PUCAI

Abbildung 16: Streudiagramm: Korrelation zwischen dem G-CSF und dem PUCAI

Abbildung 17: Streudiagramm: Korrelation zwischen dem IL-8 und dem PUCAI

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
aPCDAI	Abbreviated Pediatric Crohn`s Disease Activity Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Crohn's Disease
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPGE	Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
MC	Morbus Crohn
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MCP-3	Monocyte chemotactic protein-3
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PUCAI	Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Standard Deviation Score
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor

TPMT-Aktivität	Thiopurin-Methyltransferase-Aktivität
TReg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
UC	Ulcerative colitis
UpM	Umdrehungen pro Minute

1. Zusammenfassung und Abstract

1.1. Zusammenfassung

Die weltweit steigende Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) erhöht die Relevanz für eine frühzeitige und zielgerichtete Diagnostik und Therapie beim Morbus Crohn (MC) und der Colitis ulcerosa (CU). Die Differenzierung zwischen diesen beiden Hauptentitäten, welche bei teils sehr ähnlicher klinischer Symptomatik einen unterschiedlichen Verlauf zeigen und auch unterschiedliche Therapiestrategien erfordern, erweist sich vor allem zu Beginn der Erkrankung häufig als schwierig bis unmöglich. Bisher erfolgen die Verlaufsbeurteilung und Steuerung der Therapie unter Zuhilfenahme des fäkalen Calprotectins, einem relativ unspezifischen Biomarker, welcher mit der granulozytären Aktivierung im Gastrointestinaltrakt korreliert und somit die intestinale inflammatorische Aktivität widerspiegelt. Insbesondere bei pädiatrischen Patienten, bei welchen eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung verglichen mit adulten Patienten mit mehr Komplikationen und weitreichenderen Folgen einhergeht, gilt es deshalb, einen möglichst wenig invasiven, spezifischen, sensitiven, kostengünstigen und gut verfügbaren Biomarker zu finden, welcher Diagnostik und Verlaufsbeurteilung erleichtern und somit eine frühzeitige individuelle Therapie ermöglichen kann.

Zytokine sind Proteine, die im Körper eine wichtige Rolle im Rahmen der Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems innehaben, weswegen Erkenntnisse über Zytokinprofile ein besseres Verständnis der immunologischen Abläufe und der Pathogenese von Erkrankungen ermöglichen. Ziel der Studie war es aus diesem Grund, herauszufinden, ob Unterschiede in den Zytokinprofilen des MC und der CU bestehen, und inwiefern diese mit den bisher etablierten Biomarkern Calprotectin und C-reaktives Protein (CRP) sowie den klinischen Aktivitätsscores Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) und Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) korrelieren.

Es wurden 23 MC- und 10 CU-Patienten der Kinder- und Jugendklinik am Universitätsklinikum des Saarlandes im Alter zwischen 9 und 19 Jahren in die Studie eingeschlossen, welchen im Rahmen von Routineuntersuchungen sowie krankheitsbedingten

Aufenthalten im Krankenhaus Blut entnommen wurde. Insgesamt wurden 145 Blutproben abgenommen, welche nach der Blutentnahme zentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt wurden. Zudem wurden das fäkale Calprotectin und das CRP bestimmt sowie je nach Krankheitsentität der PCDAI oder der PUCAI erhoben. Beim PCDAI und PUCAI handelt es sich um die beiden gebräuchlichsten Aktivitätsscores für den MC und die CU in der Pädiatrie. Beide Scores dienen der Abschätzung des Schweregrades der CED des jeweiligen Patienten und beinhalten Faktoren aus der Anamnese und klinischen Untersuchung sowie Laborwerte.

Anhand von Literaturrecherche wurde ein möglichst breites Spektrum an Zytokinen im Serum untersucht: Wir untersuchten die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12p40 (IL-12p40), Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), das antiinflammatorisch wirksame Interleukin-10 (IL-10) sowie die Chemokine Interleukin-8 (IL-8), Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), Monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) als auch die Wachstumsfaktoren Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) und Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Die Zytokine wurden mittels Multiplexanalyse (Luminex®) quantifiziert.

Beim Vergleich der beiden Entitäten MC und CU zeigten sich das MIP-1 α und das MCP-3 beim MC sowie das Calprotectin bei der CU signifikant erhöht. Bei isolierter Betrachtung der Aktivitätsphasen fanden wir das MCP-3 beim MC in der Remission verglichen mit dem Schub signifikant erhöht. Das Calprotectin war bei der CU im Schub verglichen mit der Remission signifikant erhöht. Ein Vergleich der beiden Aktivitätsphasen unabhängig von der Krankheitsentität ergab eine signifikante Erhöhung von IP-10 und CRP im Schub. Bei isolierter Betrachtung der Krankheitsentitäten zeigten sich signifikante Erhöhungen des IP-10 beim MC sowie des CRP bei der CU. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Zytokine IL-8 und G-CSF sowie das CRP positiv mit dem PUCAI korrelieren. Des Weiteren fand sich unabhängig von Krankheitsentität und Aktivitätsphase ein positiver Zusammenhang zwischen den beiden Zytokinen IL-6 und G-CSF mit dem CRP sowie eine positive Korrelation zwischen den beiden Biomarkern CRP und Calprotectin.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Verlauf der Zytokinspiegel im Krankheitsverlauf und in Abhängigkeit der Therapie noch besser zu charakterisieren. Hieraus könnten sich Hinweise auf die Pathogenese und auf neue Therapieansätze ergeben.

1.2. Abstract

The increasing prevalence of inflammatory bowel disease (IBD) worldwide increases the relevance for early and targeted diagnosis and therapy of Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The differentiation between these two main entities, which in some cases show a different course with very similar clinical symptoms and also require different therapeutic strategies, often proves to be difficult or even impossible, especially at the beginning of the disease. Till now, the assessment and management of the course of the disease is based on faecal calprotectin, a relatively unspecific biomarker that correlates with granulocyte activation in the gastrointestinal tract and thus reflects the intestinal inflammatory activity. Especially in paediatric patients, in whom chronic inflammatory bowel disease is associated with more complications and far-reaching consequences compared to adult patients, it is therefore important to find a biomarker that is as non-invasive, specific, sensitive, cost-effective and readily available as possible, which can facilitate diagnosis and assessment of the course of the disease and thus enable early individualized therapy.

Cytokines are proteins that play an important role in communication between cells of the immune system. Therefore knowledge about cytokine profiles enables a better understanding of immunological processes and pathogenesis of diseases. Thus, the aim of the study was to find out whether there are differences in the cytokine profiles of CD and UC, and how they correlate with the established biomarkers calprotectin and C-reactive protein (CRP) as well as the clinical activity scores Paediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) and Paediatrics Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI).

The study included 23 CD and 10 UC patients aged 9 to 19 years from the Children's and Adolescent Clinic at Saarland University Hospital, from whom blood was collected during routine examinations and hospitalizations due to illness. A total of 145 blood samples were collected, which were centrifuged after blood collection and stored until further processing. In addition, faecal calprotectin and CRP were determined and, depending on the disease entity, PCDAI or PUCAI were collected. PCDAI and PUCAI are the two most common activity scores for the CD and the UC in paediatrics. Both scores are used to estimate the severity of the patient's IBD and include factors from the patient's medical history and clinical examination as well as laboratory scores.

Based on literature research, the broadest possible spectrum of cytokines in serum was examined: We examined the proinflammatory cytokines interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-12p40 (IL-12p40), interferon-gamma induced protein 10 (IP-10), tumour necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), the anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10) and the chemokines interleukin 8 (IL-8), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3) as well as the growth factors granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The cytokines were quantified by means of multiplex analysis (Luminex®).

The comparison of the two entities CD and UC showed significant increases in MIP-1 α and MCP-3 in CD and calprotectin in UC. In isolated observation of the activity phases we found a significant increase in MCP-3 in CD in remission compared to the relapse. The calprotectin was significantly increased in UC in relapse compared to remission. A comparison of the two activity phases, independent of the disease entity, revealed a significant increase in IP-10 and CRP in the relapse. In an isolated analysis of the disease entities significant increases in IP-10 in CD and CRP in UC were found. Additionally, we could show that the cytokines IL-8 and G-CSF as well as the CRP correlate positively with the PUCAI. Furthermore, we found a positive correlation between the two cytokines IL-6 and G-CSF with the CRP and a positive correlation between the two biomarkers CRP and calprotectin independent of disease entity and activity phase.

Further investigations are necessary to better characterize the course of cytokine levels in the course of the disease and in dependence of the therapy. This could provide information on pathogenesis and lead to new therapeutic approaches.

2. Einleitung

2.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

2.1.1. Definition

Der Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) umfasst Erkrankungen, die sich durch rezidivierende oder permanent auftretende, entzündlich-destruktive Veränderungen des Darms auszeichnen. Die zwei Hauptvertreter sind dabei Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU).

Beim MC liegt typischerweise ein diskontinuierlicher, segmentaler Befall des gesamten Gastrointestinaltraktes (GIT) vor, wobei alle Darmwandschichten betroffen sind. Die CU hingegen ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche Entzündungsausbreitung mit Beginn am Rektum und Ausbreitung nach proximal. Hierbei sind lediglich die Mukosa und die Submukosa beteiligt.

2.1.2. Epidemiologie

Die Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten vor allem in Industrie- und Schwellenländern deutlich zugenommen und ist weiterhin steigend, was zu einer wachsenden klinischen Problematik führt. [10] Bei pädiatrischen Patienten lässt sich dieser Anstieg der Prävalenz vor allem beim Morbus Crohn verzeichnen. [12] In Deutschland liegt die Prävalenz des MC bei 100-200/100 000 sowie die Inzidenz bei 6,6/100 000. Bei der CU hingegen liegt die Prävalenz bei 160-250/100 000 und die Inzidenzrate bei 3,0-3,9/100 000. [70][11]

Die Diagnosestellung CED kann prinzipiell in jedem Alter erfolgen, der Häufigkeitsgipfel liegt jedoch bei 15-35 Lebensjahren. [10] So wird bei 30 % der Patienten mit MC und 20 % der Patienten mit CU die Diagnose vor dem 20. Lebensjahr gestellt. [1]

Für Kinder und Jugendliche mit CED liegt die Inzidenzrate in Deutschland bei 5-11/100 000, woraus sich eine Neuerkrankungsrate von 800-1470 pädiatrischen Patienten errechnen

lässt. [10][11] In den letzten Jahren lässt sich in der Pädiatrie die CED betreffend eine Verschiebung hin zum früheren Krankheitsbeginn verzeichnen. [6]

Während bei adulten Patienten beide Erkrankungen etwa gleich oft auftreten, ist in der Pädiatrie bei Kindern mit einem Erkrankungsbeginn im Alter von unter 6 Jahren die Colitis ulcerosa häufiger, bei Kindern mit einem Alter von 6 Jahren oder älter hingegen ist der Morbus Crohn häufiger. [10][99] Insgesamt betrachtet liegt der Anteil der MC-Patienten in der Pädiatrie bei 59-73 %, während 24-32 % der pädiatrischen Patienten von der CU betroffen sind. [99]

2.1.3. Ätiologie

Die Ätiologie der CED ist trotz vieler Studien bis heute nicht vollständig geklärt. Während die CED früher als klassische Autoimmunerkrankung angesehen wurde, wird heutzutage angenommen, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus genetischen, immunregulatorischen und mikrobiellen Faktoren sowie Umwelteinflüssen handelt. [39]

Wird das Gleichgewicht dieser sich komplementierenden Faktoren gestört, kommt es bei genetisch prädisponierten Personen zu einer Störung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut, sodass kommensalen Bakterien und Mikroorganismen vom Darmlumen in die Darmwand gelangen und sich dort ansiedeln können. Die Folge ist eine dysregulierte Immunantwort mit Aktivierung verschiedener Immunzellen und der Produktion von proinflammatorischen Signalstoffen. Kann die akute Infektion nicht durch antiinflammatorische und regulatorische Prozesse zurückgedrängt werden, chronifiziert die Entzündung. Dies führt wiederum zu Gewebdefekten und Komplikationen. [2][69]

Es wird vermutet, dass bei Kindern der genetische Einfluss eine größere Rolle spielt als bei erwachsenen Patienten, da bei pädiatrischen Patienten häufiger eine positive Familienanamnese vorliegt. [11][77]

Ein Begriff der in der Pathogenese der CED ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, ist die sogenannte mikrobielle Dysbiosis, welche ein Ungleichgewicht zwischen pathogenen und kommensalen Darmbakterien beschreibt. Es konnte vielfach nachgewiesen werden, dass das intestinale Mikrobiom von CED-Patienten verändert ist, bis heute ist man jedoch nicht sicher, ob die Dysbiosis primär zu den Auslösern oder den Folgen der CED gehört. [62]

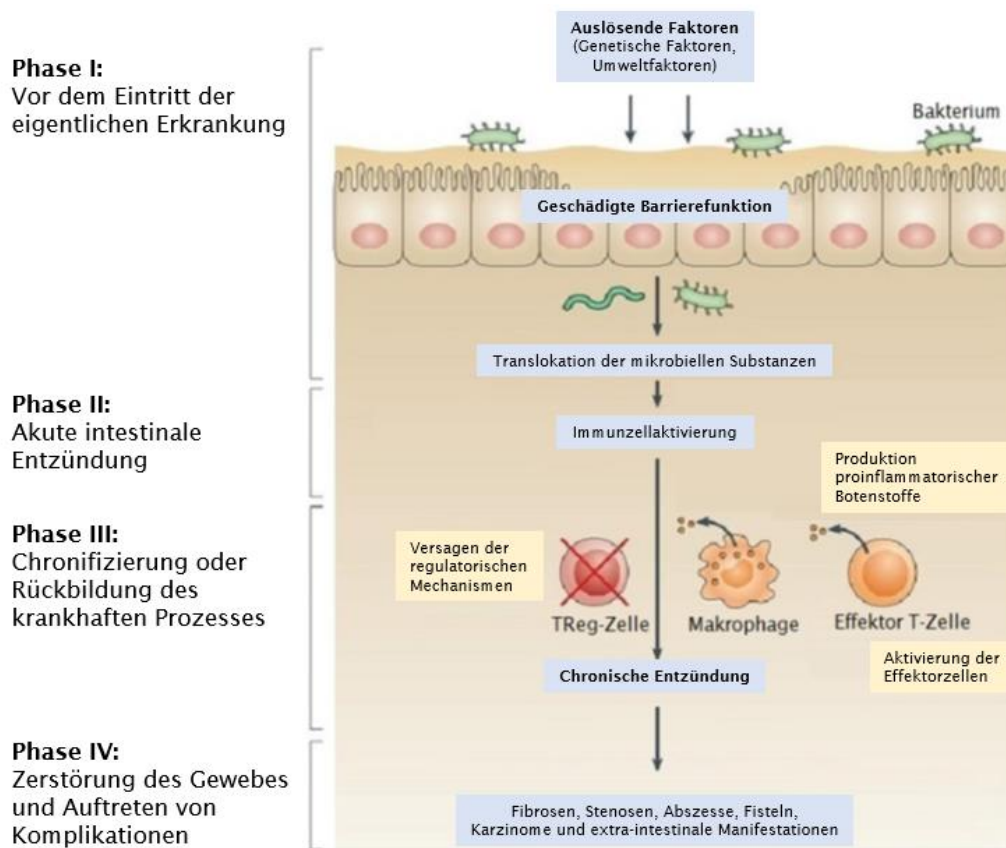


Abbildung 1: Pathogenese der CED

Verschiedene Faktoren können zu einer Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion führen, was eine Translokation mikrobieller Substanzen und kommensaler Bakterien vom Darmlumen in die Darmwand zur Folge hat. Dies führt zu einer Aktivierung der Immunzellen, welche Zytokine produzieren. Bei Versagen der regulatorischen Mechanismen chronifiziert die Entzündung, das Gewebe wird zerstört und es kommt zu intra- sowie extraintestinalen Komplikationen. Modifiziert nach [60]

2.1.4. Risikofaktoren

Multiple Risikofaktoren für die CED sind bekannt. Ein Zusammenspiel dieser verschiedenen Risikofaktoren führt über die Veränderung der intestinalen Barrierefunktion zur Entstehung einer CED. Einen genetischen Risikofaktor stellen beispielsweise Mutationen im NOD2-Gen dar, die zu Fehlfunktionen bei der Bakterienerkennung im Darm führen können. [12] Weitere Risikofaktoren betreffen die Umwelt, so scheint der sogenannte "Western lifestyle" die Entstehung einer CED zu begünstigen. Diese These wird gestützt durch den Fakt, dass der Anstieg der Inzidenz mit dem Entwicklungsstatus eines Landes korreliert. Neben einem weltweiten Nord-Süd-Gefälle besteht auch ein Stadt-Land-Gefälle, wodurch die sogenannte Hygiene-Hypothese gestützt wird. Diese besagt, dass durch geringeren Kontakt mit

Pathogenen in der Kindheit die Entstehung von Krankheiten gefördert wird. [92] Auch die Ernährung ist ein Risikofaktor: In den westlichen Ländern ist sie deutlich reichhaltiger an Zucker, Fett und Proteinen und begünstigt auf diese Weise die Entstehung einer CED. [92][2][34] Ein Kaiserschnitt erhöht, vermutlich über die im Gegensatz zur Spontangeburt veränderte Bakterienbesiedlung des Darmes, ebenfalls das Risiko für die Entwicklung einer CED. Als weiterer operativer Eingriff, der die Entstehung eines Morbus Crohn begünstigen kann, ist die Appendektomie zu nennen. Das Risiko, eine Colitis ulcerosa zu entwickeln, wird durch diese Operation hingegen gesenkt. [92] Ebenfalls zu den Risikofaktoren zählen Medikamentengaben, vorrangig sind hier Antibiotika und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) zu nennen, die über eine Schädigung der Darmschleimhaut eine CED sowohl induzieren als auch reaktivieren können. [2][92] Auch sozialer Stress führt zu einem erhöhten Risiko. [92][2] Nikotin begünstigt die Entstehung von Morbus Crohn, bei der Colitis ulcerosa hingegen wirkt das Rauchen als protektiver Faktor. [2][92]

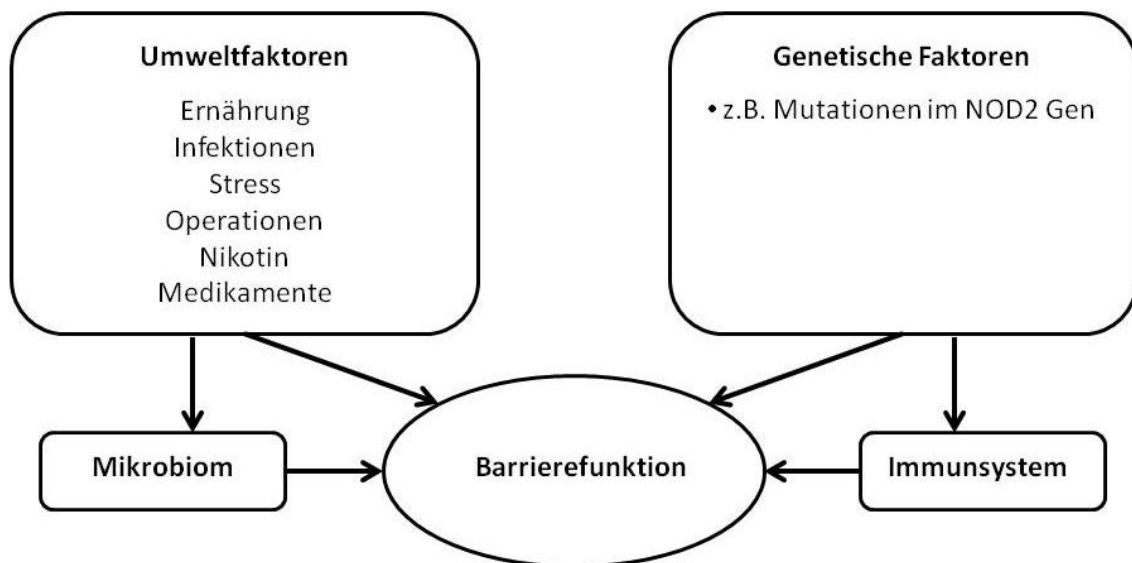


Abbildung 2: Risikofaktoren der CED

Ein Zusammenspiel aus multiplen Risikofaktoren ist für die Entstehung der CED verantwortlich. Dabei nehmen die genetischen Faktoren neben der direkten Wirkung auf die Barrierefunktion des Darmes indirekt vor allem über das Immunsystem Einfluss. Die Umweltfaktoren hingegen können sowohl über Veränderungen im intestinalen Mikrobiom ihre Wirkung ausüben, als auch direkt auf die Barrierefunktion Einfluss nehmen. Modifiziert nach [92]

2.1.5. Klinik

Zu Beginn der CED ist die Symptomatik gerade in der Pädiatrie oft unspezifisch, weswegen zwischen dem ersten Auftreten der Symptome und Diagnosestellung durchschnittlich etwa elf Monate liegen. [65] Während es beim Morbus Crohn initial meist zu chronischen Bauchschmerzen, rezidivierender Diarrhoe und Gewichtsstillstand kommt, ist bei der Colitis ulcerosa häufig die blutige Diarrhoe das erste Symptom. Hinzukommen können jeweils Abgeschlagenheit und Müdigkeit, Appetitlosigkeit, blutiger Stuhl, Tenesmen, sowie perianale Fissuren, Fisteln, Abszesse und zusätzliche extraintestinale Manifestationen. [10]

Zwischen juveniler und adulter CED bestehen hinsichtlich der Erkrankungsausprägung diverse Unterschiede. Bei Diagnosestellung in der Kindheit ist der Krankheitsverlauf meist komplexer und aggressiver, zudem ist der obere Gastrointestinaltrakt häufiger mit betroffen und auch extraintestinale Manifestationen treten vermehrt auf. [1][65]

Während beim Morbus Crohn in der Pädiatrie meist terminales Ileum und Kolon betroffen sind, ist bei der Colitis ulcerosa eine Pancolitis am häufigsten. [12] Fast ein Drittel der pädiatrischen Patienten leiden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits unter extraintestinalen Manifestationen. [99] Insgesamt entwickeln etwa 30 % der CED-Patienten innerhalb ihres Lebens extraintestinale Manifestationen. In der Pädiatrie sind dabei am häufigsten Wachstumsverzögerungen, Arthritis, Augenkrankheiten und Lebererkrankungen festzustellen. [12][11][42][38] An dieser Stelle ist zudem ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms im Gastrointestinaltrakt zu nennen, das sowohl adulte als auch pädiatrische CED-Patienten betrifft. [64]

Weiterhin gilt es zu beachten, dass es bei pädiatrischen Patienten zu Gewichtsverlust sowie zu einem verspäteten Eintritt in die pubertäre Entwicklung kommen kann. Dahingegen sind bei der adulten CED häufiger starke abdominelle Schmerzen, Diarrhoe und Appetitlosigkeit festzustellen. [21]

2.1.6. Diagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt aus der Zusammenschau von Anamnese, körperlicher Untersuchung und Laborparametern einschließlich fäkaler Inflammationsmarker, wie dem Calprotectin oder Lactoferrin. Über endoskopische Verfahren, einschließlich Stufenbiopsie für die histopathologische Beurteilung sowie radiologische Verfahren, wird die Diagnose gesichert. [38][11] Lässt es sich anhand der Ergebnisse der endoskopischen Diagnostik nicht

genau zuordnen, ob es sich um einen MC oder eine CU handelt, bezeichnet man das Krankheitsbild als Colitis indeterminata.

2.1.7. Therapie

Die Therapieempfehlungen für pädiatrische und adulte CED-Patienten differieren. Das liegt zum einen daran, dass in der Pädiatrie andere Medikamentenzulassungen gelten, zum anderen sprechen pädiatrische Patienten im Vergleich mit adulten Patienten anders auf die Medikation an. Sie sind beispielsweise häufiger auf Immunsuppressiva und Biologika angewiesen als adulte Patienten. [70][89]

Ziel der Therapie ist zunächst die Remissionsinduktion, nachfolgend die Verhinderung eines Rezidivs. Durch die Kontrolle der intestinalen Inflammation soll Komplikationen durch die Erkrankung oder Behandlung vorgebeugt werden. Es wird ein normaler Ernährungszustand, normales Wachstum und somit insgesamt eine gute Lebensqualität angestrebt. [76][77]

Vor Therapiebeginn ist eine Überprüfung des Impfschutzes sowie der Ausschluss einer latenten Tuberkulose notwendig. Zudem sollte beim Einsatz von Thiopurinen eine Bestimmung der Thiopurin-Methyltransferase-Aktivität (TPMT-Aktivität) erfolgen, um Komplikationen durch eine toxische Wirkung auf das Knochenmark vorzubeugen. [11]

Die pädiatrische CED wird primär konservativ medikamentös therapiert. Eine grobe Einteilung in Remissionsinduktion und Remissionserhaltung ist möglich. Eine Ernährungstherapie ist Therapie der ersten Wahl für die Remissionsinduktion beim MC aller Schweregrade, es sei denn, es liegen Risikofaktoren vor, die zu einer direkten Gabe von Tumornekrosefaktor- α -Blockern (TNF- α -Blockern) führen. Da eine Beendigung der Ernährungstherapie zumeist zu einem Rezidiv führt, wird oft schon gleichzeitig eine Therapie mit Immunmodulatoren begonnen. Bei ausbleibendem Effekt oder Ablehnung der Ernährungstherapie durch den Patienten werden Kortikosteroide eingesetzt. Liegt eine moderate Ausprägung der Aktivität bei einem ileozökalen Befall vor, kann mit einem topisch wirksamen Glukokortikoid therapiert werden, wie zum Beispiel Budesonid. [11][70]

Bei der CU werden zur Remissionsinduktion bei milder bis moderater Ausprägung Aminosalicylate und bei schwerer Ausprägung Kortikosteroide oder gegebenenfalls Calcineurin-Inhibitoren oder Biologika eingesetzt. [11]

Kortikosteroide können aufgrund multipler Nebenwirkungen nicht zur Remissionserhaltung eingesetzt werden. Aus diesem Grund wird beim MC zur Remissionserhaltung auf Immunmodulatoren, Biologika oder eine Kombination dieser beiden Wirkstoffklassen zurückgegriffen. Die CU wird mit Aminosalicylaten behandelt, die bei ausgeprägterem Befall mit Immunmodulatoren oder Biologika kombiniert werden. Biologika kommen ebenso bei therapierefraktärem Verlauf zum Einsatz. [11] Insgesamt betrachtet kommen Biologika, wie beispielsweise der TNF- α -Blocker Infliximab, vor allem bei Kindern zum Einsatz, bei denen die Erkrankung steroidrefraktär verläuft, oder bei denen sich trotz immunmodulatorischer Therapie ein steroidabhängiger Verlauf zeigt. [76]

Eine weitere Therapieoption bieten chirurgische Interventionen. Während bei der CU bei refraktärem Verlauf durch eine subtotale Kolektomie mit Anlage eines Ileostomas Heilung erfolgen kann, werden beim MC durch chirurgische Maßnahmen vor allem Komplikationen wie beispielsweise Fisteln und Strikturen behandelt. [76] Zu einem ganzheitlichen Therapieprinzip gehört zudem eine Ernährungsberatung und psychosoziale Betreuung. [11]

Im weiteren Verlauf sollte mindestens alle drei Monate eine Kontrolle erfolgen, eine erneute endoskopische oder histologische Untersuchung wird vor größeren Therapieumstellungen sowie bei fraglichem Therapieansprechen empfohlen. [11] Die Transition in die adulte Therapie hat begleitet und ohne Unterbrechungen zu erfolgen, um trotz dauerhafter Medikation, psychosozialen Komorbiditäten und gerade bei dieser Altersgruppe oft kritischer Therapieadhärenz ein gutes Therapieresultat zu erhalten. [11][1]

Obwohl Rezidive und Komplikationen bei der CED nicht selten sind und insgesamt eine erhöhte Morbidität besteht, ist bei optimaler Behandlung von einer normalen Lebenserwartung auszugehen.

2.1.8. Zusammenfassende Übersicht über die CED

Tabelle 1: Übersicht über die Differenzen der beiden Hauptentitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, in Anlehnung an [17][5]

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Klinik		
Stuhlfrequenz und Stuhllart	Stuhlfrequenz gering erhöht, Obstipation, Stühle weichschleimig, nächtliche Stühle, gelegentlich blutiger Stuhl	Stuhlfrequenz stark erhöht, wässrige Stühle, vorwiegend morgens oder nachts, fast immer blutiger Stuhl
Ernährungszustand	reduziert, fast immer Appetitlosigkeit sowie Gewichtsverlust	meist normal, gelegentlich Appetitlosigkeit sowie Gewichtsverlust
Bauchschmerzen	meist durchgehend, von den Mahlzeiten unabhängig	meist nur vor oder während der Defäkation
Erbrechen	gelegentlich	ausnahmsweise
Druckschmerz und tastbare Restistenzen	vorwiegend rechter Unterbauch, häufig tastbare Walze im rechten unteren Quadranten	vorwiegend linker Unterbauch, meist keine tastbaren Resistenzen
Wachstum und Pubertät	ausgeprägte Verzögerung	wenig beeinflusst

Ausdehnung		
Ausbreitungsmuster	diskontinuierlich, gesamter GIT, aber vor allem terminales Ileum und Kolon	kontinuierlich mit Beginn am Rektum, kein Befall des oberen GIT, Dünndarmbefall nur bei backwash illeitis
Komplikationen		
Intraintestinale Komplikationen	Stenosen, Abszesse, Fisteln	kolorektales Karzinom
Extraintestinale Komplikationen	insgesamt häufiger, vor allem Haut, Augen, Gelenke aufgrund der Lokalisation im Dünndarm häufiger: Gewichtsabnahme, Gallensäure-Mangel, Vitamin-B-12-Mangel	Leber: Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) Dünndarm Komplikationen vor allem bei backwash illeitis
Diagnostik		
Endoskopie	diskontinuierlich, längliche Ulzerationen, Pflastersteinrelief, Strikturen	kontinuierlich, Schleimhaut-Erythem, Kontaktblutungen, oberflächliche Ulzera
Radiologie	Strikturen, Abszesse, Fisteln	Fahrradschlauchaspekt
Histologie	transmuraler Befall, Granulome, Riesenzellen	nur Mukosa und Submukosa betroffen, keine Granulome, teils Kryptenabszesse

2.2. Biomarker im Rahmen der CED

Um die Therapie der CED adäquat an den Schweregrad der Erkrankung anzupassen, wird in der Pädiatrie neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung sowohl auf Scoring-Systeme, wie den Pediatric Crohn`s Disease Activity Index (PCDAI) für den MC und den Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) für die CU als auch auf laborchemische Werte zurückgegriffen. Gegenüber dem Goldstandard Endoskopie bringt die Bestimmung von Biomarkern aufgrund des nichtinvasiven Vorgehens einerseits geringere Risiken mit, andererseits ist sie auch deutlich kostengünstiger. Zudem kann bei endoskopischen Verfahren die Verfügbarkeit ein Problem darstellen.

Bisher gelang es jedoch nicht, aus dem Serum einen Laborwert als maßgeblich für die entzündliche Aktivität zu etablieren, sodass nun vorrangig auf Stuhlanalysen ausgewichen werden muss. Deren Werte für Sensitivität und Spezifität waren denen aus Bestimmungen im Serum, wie zum Beispiel C-reaktiven Protein (CRP), in bisherigen Studien stets überlegen. Leitsubstanz der Stuhlanalysen ist das Calprotectin. Es wurden jedoch verschiedene Substanzen als Alternative zur Calprotectin-Bestimmung vorgeschlagen, darunter unter anderem Neopterin, CRP, Lactoferrin und 100A12.

2.2.1. Calprotectin

Calprotectin ist ein sogenannter unspezifischer Biomarker, welcher nicht spezifisch für die CED ist, jedoch für die Einschätzung der Inflammationsaktivität im Darm zur Hilfe genommen werden kann. Calprotectin wird auch als humanes Leukozytenprotein bezeichnet, da es mit einem Anteil von etwa 60 % den dominierenden Protein-Anteil im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten darstellt. [46][93] In geringen Mengen wird Calprotectin auch von Monozyten und Makrophagen gebildet. [58]

Besteht nun eine Störung der Barrierefunktion des Darms, führt das zu einem vermehrten Übertritt von Leukozyten in das Darmlumen. Da die Zellen Calprotectin freisetzen, sobald sie aktiviert werden, lässt ein erhöhter Calprotectin-Wert somit den Schluss auf eine erhöhte Entzündungsaktivität im Darm zu. [93] Das Vorhandensein des fäkalen Calprotectins korreliert dabei quantitativ mit der Migration von neutrophilen Granulozyten in den GIT. [15]

Im Umkehrschluss bedeutet das, dass man eine Entzündung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen kann, wenn der Calprotectin-Wert im Normbereich liegt. [10]

Der Calprotectin-Wert ist jedoch nicht nur bei einer aktiven CED erhöht, sondern bei jeglicher Form der Entzündung im Darm, so zum Beispiel auch bei Infektionen, Neoplasien, einer Divertikulose, Gastritis, Ösophagitis, oder einem Ulkus, sodass die Differenzierung der Ursache nicht immer möglich ist. [70][93] Da es sich um einen nichtinvasiven Biomarker handelt, wird der Calprotectin-Wert gerade in der Pädiatrie gerne auch zur Differenzierung entzündlicher und funktioneller Erkrankungen verwendet. Bei funktionellen Erkrankungen, wie zum Beispiel Zöliakie, Laktoseintoleranz oder dem Reizdarmsyndrom, ist das Calprotectin im Stuhl nicht erhöht. [70] Mehrere Studien konnten zeigen, dass das fäkale Calprotectin bei adulten und pädiatrischen CED-Patienten im Gegensatz zu gesunden Personen und Patienten mit Reizdarmsyndrom signifikant erhöht ist. [42]

Für die Sensitivität und Spezifität des Calprotectin-Wertes lassen sich variable Zahlen finden. Diese sind unter anderem abhängig vom jeweils angenommenen, bisher nicht genormten Schwellenwert. So ergab eine Metaanalyse von von Roon bei einem angesetzten Grenzwert von 50 µg/g eine Sensitivität von 89 % und Spezifität von 81 %, bei einem angenommenen Grenzwert von 100 µg/g ergaben sich eine Sensitivität von 98 % und Spezifität von 91 %. Zudem ergab die Metaanalyse, bei der sowohl adulte als auch pädiatrische Patienten untersucht wurden, dass ein Cut-off-Wert von 100 µg/g in der Pädiatrie zu höheren Sensitivitäts- und Spezifitätswerten führt. [75] [93] [46] Für die Diagnosestellung einer CED in der Pädiatrie ergab eine Metaanalyse von Degraeuwe et al. eine Sensitivität von 97 %, sowie eine Spezifität von 71 %. [13]

In einer Studie zur Korrelation zwischen der endoskopisch festgestellten Aktivität der Entzündung und verschiedenen Biomarker (unter anderem Calprotectin, CRP, Thrombozyten, Hämoglobin und Leukozyten) bei der CU wurde herausgefunden, dass es unter diesen Parametern nur anhand des fäkalen Calprotectinwertes möglich war, verschiedene endoskopische Abstufungen zu differenzieren. [79]

2.2.2. Neopterin

Neopterin ist ein vorrangig von Makrophagen, aber auch von dendritischen Zellen, produzierter und sezernierter Botenstoff des Immunsystems. Die Makrophagen werden dabei hauptsächlich durch Interferon- γ (IFN- γ) aktiviert, welches von aktivierten T-Lymphozyten

produziert wird, aber auch von verschiedenen anderen proinflammatorischen Signalstoffen. [29][18] Das führt dazu, dass sich anhand des Neopterin-Wertes indirekt die Aktivierung des zellulären Immunsystems ablesen lässt. Genutzt wird der Neopterin-Wert bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen sowie chronischen Entzündungen, beispielsweise bei rheumatischer Arthritis, systemischer Lupus erythematosus und Psoriasis. Auch bei Viruserkrankungen wie zum Beispiel Borreliose, Tuberkulose oder einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein Anstieg des Neopterins zu verzeichnen. [23][18] Die Bestimmung von Neopterin kann unter anderem aus dem Serum, dem Stuhl oder dem Urin erfolgen.

Es konnte gezeigt werden, dass die fäkalen Neopterin-Werte (Cut-off-Wert von 200 pmol/g), ähnlich den Calprotectin-Werten (Cut-off-Wert von 250 µg/g), sowohl in der klinisch als auch endoskopisch aktiven Erkrankung bei MC und CU signifikant höher waren als in der Remissionsphase. [58]

2.2.3. CRP

Das CRP ist ein Akute-Phase-Protein, das im klinischen Alltag als allgemeiner Entzündungsmarker sehr häufig genutzt wird. Es ist ein durch die Blutentnahme leicht zu gewinnender und vergleichsweise kostengünstiger Parameter. Während es beim MC bei nahezu allen Patienten in der akuten Phase erhöht ist, zeigt sich bei der CU in der akuten Phase nur bei etwa der Hälfte der Patienten ein erhöhter CRP-Wert. Die CED betreffend ist das CRP mit einer Sensitivität von 49 % dem oben beschriebenen Calprotectin jedoch deutlich unterlegen.

Auch bei der Differenzierung endoskopischer Aktivitätsgrade ist es dem fäkalen Calprotectin unterlegen, sodass eine alleinige Betrachtung des CRP-Wertes in der Zusammenschau der genannten Faktoren bei vielen CED-Patienten zu einer verspäteten Diagnosestellung führen würde. [46]

2.2.4. Lactoferrin

Lactoferrin ist ein Eisen-bindendes Protein, das sowohl in neutrophilen Granulozyten als auch im Serum zu finden ist. Es ist resistent gegen Degradierung und Proteolyse, jedoch insgesamt weniger stabil als Calprotectin. [46] Auch bei Lactoferrin besteht das Problem, dass es nicht

spezifisch für die CED ist. [93] Nach Gisbert et al. ergaben sich für Lactoferrin eine Sensitivität von 80 %, sowie eine Spezifität von 82 %. [20]

2.2.5. S100A12

100A12 ist ein Protein, das Calprotectin sehr ähnlich ist, beide gehören zur Familie der S-100-Proteine. Es besitzt den Vorteil, dass es auch im Serum gemessen werden kann, jedoch nicht mit der gleichen Sensitivität und Spezifität wie bei einer Stuhlanalyse. [46] Für diese Parameter ergab eine Studie mit pädiatrischen Patienten Werte von 96 % für die Sensitivität und 92 % für die Spezifität. [36]

2.3. Zytokine: Definition, Funktionen und Einteilung

Zytokine sind Proteine, die im Körper eine tragende Rolle für die Interaktion und Kommunikation der Zellen untereinander haben. Dies trifft vorrangig auf die Zellen des Immunsystems zu, welche die Zytokine als Antwort auf Infektionen oder Gewebeschädigung synthetisieren und freisetzen. [71] Zytokine haben im Immunsystem vor allem eine regulatorische Funktion, das heißt, sie fördern oder hemmen die Abwehr gegen pathogene Strukturen. Zudem haben sie einen wichtigen Anteil bei Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen. [73][8][27] Sie werden von zahlreichen verschiedenen Zellarten produziert und sezerniert, die Hauptproduzenten sind dabei T-Helferzellen und Makrophagen. [100]

Zytokine können sowohl autokrin (in der gleichen Zelle), parakrin (in der benachbarten Zelle) und weniger häufig auch endokrin (systemisch in entfernten Zielzellen) wirken. [73] Über Bindung an spezifische Zytokinrezeptoren auf ihren Zielzellen wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die eine Veränderung der Zielzelle hervorruft. Die Zielzelle kann bspw. proliferieren, differenzieren, zur Veränderung ihrer Genstruktur angeregt werden oder zu Migration oder Apoptose veranlasst werden. [24] Einerseits kann ein Zytokin je nach Zielzelle verschiedene Effekte hervorrufen (Pleiotropie), andererseits können verschiedene Zytokine die gleiche Wirkung erzielen (Redundanz). [100] In den meisten Fällen wirken Zytokine nicht alleine, sondern als ein Zusammenspiel verschiedener Zytokine. Sie können sowohl synergistisch, additiv, als auch antagonistisch wirken. [81][100][4]

Zu den Zytokinen zählt man Interleukine, Interferone, Chemokine, die Familie der Tumornekrosfaktoren sowie Wachstumsfaktoren. [24][73][27]

2.3.1. Interleukine

Das Wort Interleukin (lat. inter = "zwischen" und griech. leukos = "weiß") beschreibt bereits ihre Hauptfunktion: Die Interleukine sind für die Regulation der Kommunikation zwischen den Leukozyten (weiße Blutzellen) zuständig. So sind sie bspw. an der Hämatopoese beteiligt, haben aber auch eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion. [24][14]

2.3.2. Interferone

Die Interferone werden nach ihrer Funktion nochmals unterteilt in die vorwiegend antiviral wirksamen Typ-I-Interferone (z. B. IFN- α und IFN- β) und das Typ-II-Interferon IFN- γ , dem in der allgemeinen Entzündungsreaktion wichtige Funktionen obliegen. Unter anderem ist es für die Aktivierung von verschiedenen Immunzellen zuständig und beeinflusst die Differenzierung von nativen T-Zellen mit einer Förderung der Typ-1-T-Helferzellen (TH1-Zellen) und einer Hemmung der Typ-2-T-Helferzellen (TH2-Zellen). [24][14]

2.3.3. Chemokine

Das Wort Chemokin ist eine Zusammensetzung aus den Wörtern chemotaktisch und Zytokin und beinhaltet damit auch die Hauptaufgabe der Chemokine, die dafür zuständig sind, dass Leukozyten zum Ort der Entzündung geleitet werden. [24][82][14]

2.3.4. TNF-Superfamilie

Bei der TNF-Superfamilie handelt es sich um eine Gruppe von verschiedenen Proteinen, denen die Vermittlung ihrer Signale über den TNF-Rezeptor gemeinsam ist.

Zu ihren Aufgaben gehören die Regulation der Immunantwort ebenso wie die Beeinflussung von Überleben und Apoptose von Zellen. Zudem sind sie regulatorisch beteiligt bei der Entwicklung und Homöostase einiger Gewebearten. Ein wichtiger Vertreter der TNF-Superfamilie ist TNF- α , welches eine wichtige Rolle als Vermittler in akuten Entzündungsreaktionen innehat. In manchen Zytokin-Einteilungen wird TNF- α den Interleukinen zugerechnet. [14]

2.3.5. Wachstumsfaktoren

Zu den Zytokinen gehören neben den allgemeinen Wachstumsfaktoren, welche sowohl embryonale als auch adulte Wachstumsprozesse regulieren, auch die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, die regulatorisch an der Blutbildung mitwirken. [14]

2.3.6. Pro- und antiinflammatorische Zytokine

Vereinfacht lassen sie sich die Zytokine nach ihrer Funktion einteilen in pro- und antiinflammatorische Zytokine, wobei diese Einteilung mit den T-Helferzellen assoziiert ist. Dabei werden die proinflammatorischen Zytokine vorrangig von aktivierten TH1-Zellen ausgeschüttet, wohingegen die antiinflammatorischen Zytokine den TH2-Zellen zugeordnet werden.

Werden die TH1-Zellen aktiviert, kommt es über zytotoxische Reaktionen zu einer Eliminierung intrazellulärer Pathogene, im Gegensatz dazu führt eine Aktivierung der TH2-Zellen zu einer humoralen Immunantwort, wodurch extrazelluläre, lösliche Pathogene eliminiert werden.

Tabelle 2: Funktionelle Einteilung der untersuchten Zytokine [47]

Proinflammatorische Zytokine	Antiinflammatorische Zytokine	Chemokine	Wachstumsfaktoren
IL-1 α	IL-10	IL-8	G-CSF
IL-1 β		MIP-1 α	GM-CSF
IL-6		MCP-1	
IL-12p40		MCP-3	
IP-10			
TNF- α			
IFN- γ			

2.4. Zytokine im Rahmen einer CED

Veränderungen im Zytokinmuster von CED-Patienten wurden erstmals in den mittleren bis späten 1980ern beschrieben, dabei blieb die Relevanz dieser Veränderungen jedoch unklar.

Inzwischen weiß man, dass die genaue Betrachtung der Zytokine einerseits für das bessere Verständnis der Pathogenese, andererseits auch für Prävention und Therapie von CED von Nutzen ist. [60]

Derzeit besteht, wie zuvor bereits genauer beschrieben, die Hypothese, dass es über exogene Faktoren zu einer veränderten Barrierefunktion im Darm kommt, was zur Folge hat, dass eine gesenkte Immuntoleranz gegenüber intestinaler Pathogene vorhanden ist.

Als Reaktion auf die in die Darmwand eindringenden Pathogene kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen, welche ihrerseits die Differenzierung naiver T-Zellen zu TH1-, TH2- und TH17-Zellen sowie zu regulatorischen T-Zellen fördern. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Produktion und Ausschüttung von Zytokinen. Diese Zytokine fördern wiederum die Entstehung von CD4+-T-Zellen, sodass eine positive Rückkopplung initiiert wird.

Die Zytokine nehmen als Signalstoffe des Immunsystems eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen ein. Dabei ist es wichtig, dass das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ausgewogen ist. Wird diese Balance gestört, kann es, vor allem bei einer gesteigerten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, zu einer akuten Entzündung kommen, welche bei der CED chronifiziert. [59]

Früher war man der Meinung, dass es sich bei MC um eine TH1-assozierte Erkrankung handelt, also das Zytokinegleichgewicht in die Richtung der proinflammatorischen Zytokine verschoben ist, wohingegen bei der CU von einer TH2-assozierten Entität mit einer Dominanz der antiinflammatorischen Zytokine ausgegangen wurde. [59] Heutzutage geht man davon aus, dass bei beiden Entitäten auch den TH17-Zellen sowie den regulatorischen T-Zellen (TReg-Zellen) wichtige Funktionen obliegen.

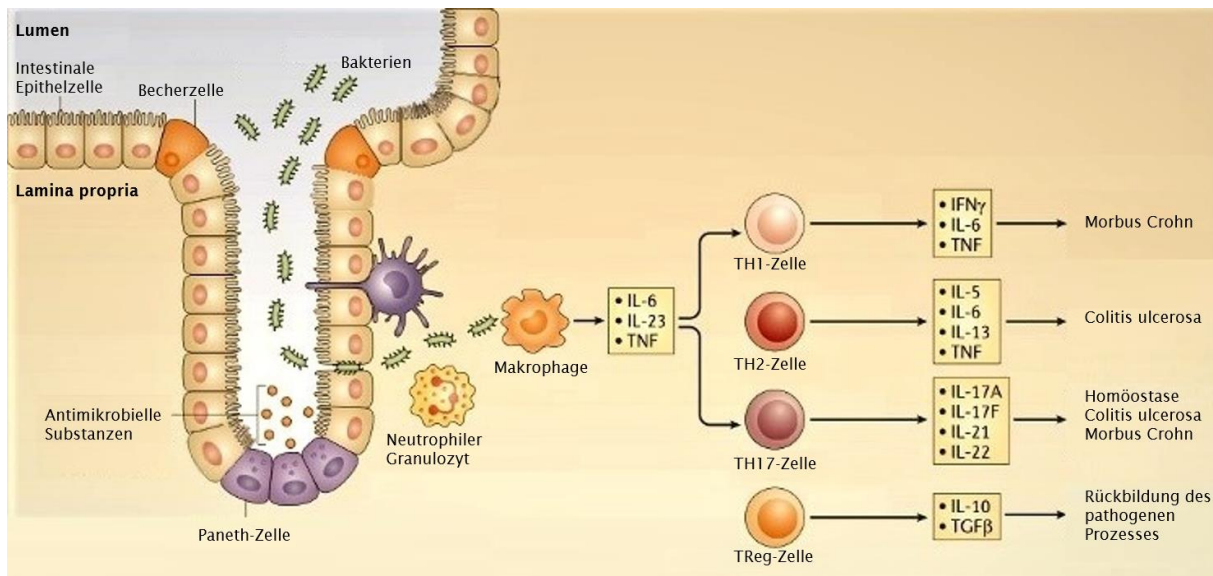


Abbildung 3: Zytokine im Rahmen einer CED

Zytokine werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems als Antwort auf auslösende Faktoren ausgeschüttet, darunter neutrophile Granulozyten, Makrophagen, TH1-, TH2-, TH17- sowie TReg-Zellen. Wird das Gleichgewicht zwischen den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gestört, kommt es zur Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion. Ein komplexes Zytokinnetzwerk hat auf diese Weise einen maßgeblichen Anteil an der Regulation der mukosalen Entzündung. Modifiziert nach [60]

2.4.1. TH1-Zellen

Die Differenzierung zu TH1-Zellen wird durch IL-12 und IL-18 gefördert. Sie produzieren vorrangig IL-2, IFN- γ und TNF- α und sind für die Eliminierung von intrazellulären Pathogenen zuständig. [3][73] Die TH1-assoziierten Zytokine hemmen die Differenzierung der naiven T-Zellen zu TH2-Zellen und somit in der Folge auch die antikörper-assoziierte Immunantwort.

2.4.2. TH2-Zellen

Umgekehrt hemmen die von TH2-Zellen produzierten und sezernierten Zytokine die Differenzierung naiver T-Zellen zu TH1-Zellen. TH2-Zellen entstehen in Gegenwart von IL-4 und IL-10 und produzieren hauptsächlich IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 sowie IL-13. Sie sind damit vor allem gegen extrazelluläre gelegene Pathogene gerichtet und haben einen wichtigen Anteil an der allergischen Immunantwort. [3][73]

2.4.3. TH17-Zellen

Die TH17-Zellen wurden erstmals in den späten 1990er Jahren beschrieben und gelten seit dem Jahr 2005 als eigenständige TH-Subpopulation. [78] Mit der Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-21 sowie IL-22 haben sie eine vorrangig proinflammatorische Wirkung. [3] Sie sind wichtig für die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und spielen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. [3] Zudem können nun Autoimmunvorgänge, die bisher durch die Einteilung TH1- und TH2-Zellen alleine nicht in ausreichender Form erklärt werden konnten, mithilfe der TH17-Zellen genauer erfasst werden. [45]

2.4.4. TReg-Zellen

TReg-Zellen zeichnen sich durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften aus, sie unterdrücken sowohl die TH1- als auch die TH2-Immunantwort. Die Zytokine TGF- β 1, IL-35 sowie IL-10 werden von ihnen produziert und sezerniert. [3]

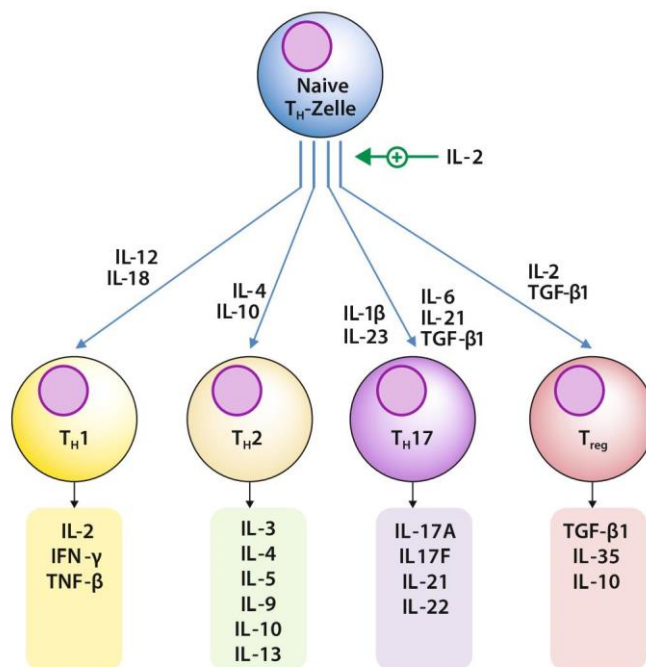


Abbildung 4: Subpopulationen der T-Helferzellen.

Exemplarische Darstellung der Proliferation der naiven TH-Zelle in die einzelnen Subpopulationen der TH-Zellen. Unter dem Einfluss verschiedener Zytokine können die naiven TH-Zellen zu den Hauptgruppen TH1-, TH2-, TH17- und TReg-Zellen differenzieren und anschließend ihrerseits verschiedene Zytokine produzieren. [3]

2.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Wie im vorangehenden Teil der Arbeit bereits beschrieben, liegt für die CED insgesamt und gerade auch in der Pädiatrie eine steigende Prävalenz vor, woraus sich eine wachsende klinische Problematik ergibt. Nach wie vor liegt jedoch kein nicht-invasiver, kostengünstiger und gut verfügbarer diagnostischer Parameter vor, der die Bestimmung der aktuellen inflammatorischen Aktivität erlaubt. Aus diesem Grunde wird bisher vor allem auf den Wert des fäkalen Calprotectins zurückgegriffen. Da dieser jedoch nicht spezifisch für die CED ist, sind sowohl die Diagnosestellung als auch die Verlaufsbeurteilung und das Therapiemanagement erschwert.

Die Bestimmung von Zytokinmustern ermöglicht eine genauere Differenzierung der systemischen Entzündungszeichen und kann so möglicherweise zum besseren Verständnis der Pathogenese der CED beitragen. Je mehr man über die genauen immunologischen Vorgänge einer Erkrankung weiß, desto höher sind in der Folge die Chancen für eine gute Diagnostik und die Entwicklung eines möglichst individuellen und schonenden Therapiekonzeptes. Gerade in der Pädiatrie, in welcher die Komplikationsrate bei einer CED und damit auch die Auswirkungen der Erkrankung oft noch weitreichender sind als bei adulten Patienten, wäre ein möglichst wenig invasiver, spezifischer, sensitiver, kostenarmer und gut verfügbarer Biomarker daher von immenser Bedeutung.

Aus diesem Grunde sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich die Zytokinmuster im Serum von Patienten mit MC und CU?
2. Liegen innerhalb der jeweiligen untersuchten Erkrankung Unterschiede im Zytokinmuster zwischen den beiden Aktivitätsphasen Remission und Schub vor?
3. Liegt eine signifikante Korrelation vor zwischen den Zytokinen, den herkömmlichen Biomarkern fäkales Calprotectin sowie CRP und der Krankheitsaktivität entsprechend der gebräuchlichen klinischen Aktivitätsscores PCDAI und PUCAI?

Die vorliegende Arbeit soll mit der Beantwortung der genannten Fragen langfristig einen Beitrag zur besseren Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und möglichen Anpassung des Therapieregimes juveniler CED-Patienten leisten.

3. Material und Methodik

3.1. Geräte und Materialien

Die bei der Durchführung der Experimente benötigten Geräte und Materialien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien

Artikel	Bezugsquelle
Aqua dest	
Biosphere Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) S-Monovetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Ethanol 70 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Luminex 100/200 Calibration Kit	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA

Ref: LX200-CAL-K25	
Luminex 100/200 Performance Verification Kit Ref: LX200-CON-K25	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Luminex xMAP Technology CS 1000 Autoplex Analyzer	Luminex Corporation, Austin, Texas, USA
Magnetic Separation Block	
Mehrkanalpipette 20-200 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Messzylinder 100 ml	
Messzylinder 500 ml	
Micro tube 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Milliplex MAP Human Cytokine/ Chemokine Magnetic Bead Panel Cat#: HCYTOMAG-60K	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Natriumhypochloritlösung 12 % Cl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PD-Tips 1,25 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
PD-Tips 2,5 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim

PD-Tips 5 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Pipette Multipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette P100	Gilson Incorporated, Middleton Wisconsin, USA
Pipette P1000	Gilson Incorporated, Middleton Wisconsin, USA
Pipette P200	Gilson Incorporated, Middleton Wisconsin, USA
Reagent Reservoirs	Biotix Incorporated, San Diego, California, USA
Sheath fluid	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Sonorex RK 102 M	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Thermomixer comfort MTTP	Eppendorf AG, Hamburg
Ultra Pure Water L0020	Biochrom GmbH, Berlin
Vortex-Schüttler, lab dancer	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Zentrifuge Rotixa/RP	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

3.2. Patientenkollektiv

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums in Homburg. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten im Alter von unter 20 Jahren, welche an einer CED erkrankt sind. Die Diagnosestellung begründete sich hierbei auf der Kombination von Klinik und Laborparametern und wurde über endoskopische Verfahren und folgende histopathologische Beurteilung der entnommenen Stufenbiopsien aus dem unteren und oberen Gastrointestinaltrakt verifiziert. Vor der Probenentnahme wurden jeweils der Patient und mindestens eine erziehungsberechtigte Person ausführlich über Inhalte und Risiken der Studie aufgeklärt. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie wurde hierbei schriftlich festgehalten und war Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie. Der Rückzug einer gegebenen Einwilligung zählte als Ausschlusskriterium. Die Erkrankungsdauer sowie die getroffenen Therapiemaßnahmen waren für die Fragestellung nicht von Belang. Die Blutentnahmen fanden im Zeitraum von Oktober 2015 bis April 2017 statt. Da die Blutentnahmen sowohl während aktiven Phasen als auch in Remission im Rahmen der Routineblutuntersuchungen stattfanden, konnte eine zusätzliche Venenpunktion vermieden werden. Das Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes (Nummer 222/15) vom 23. November 2015 liegt vor.

3.2.1. Begriffserläuterung zu den Patientendaten

Für die statistische Auswertung wurden verschiedene Parameter erhoben, die im Folgenden näher definiert und erläutert werden sollen.

3.2.1.1. *Alter*

Das Alter der Patienten wurde definiert als Alter bei der letzten im Rahmen der Studie vorgenommenen Blutentnahme. Das Alter bei Diagnosestellung hingegen bezeichnet das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Sicherung der Diagnose. Hierbei wurde eine Einteilung in die Kategorien ≤ 10 Jahre und > 10 Jahre vorgenommen.

3.2.1.2. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum wurde definiert als Zeitdifferenz zwischen der ersten und letzten Blutentnahme bei einem Patienten im Rahmen der Studie. Bei einigen Patienten wurde die Diagnose während des Studienzeitraumes gestellt und teilweise wurde nur eine Probe entnommen, sodass bei diesen Patienten eine verkürzte Beobachtungsdauer bestand oder nur ein Zeitpunkt relevant war.

3.2.1.3. Erkrankungsdauer

Der Begriff Erkrankungsdauer beschreibt den Zeitraum von der Sicherung der Diagnose bis zum jeweiligen Zeitpunkt der verschiedenen Blutentnahmen bei einem Patienten.

3.2.1.4. Medikamente

Die Medikamenteneinnahme betreffend wurden Kortikosteroide, Immunsuppressiva, Biologicals, Sulfasalazin, Protonenpumpeninhibitoren sowie die Gabe von Vitamin D dokumentiert.

3.2.2. PCDAI und PUCAI

Zur Abschätzung der Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Blutentnahme wurden zwei klinische Indizes gewählt. Die Gesamtpunktzahl des jeweiligen Scores wurde jeweils den zwei Gruppen Remission und Schub zugeteilt, wobei der Grenzwert bei 10 Punkten lag.

Tabelle 4: Einteilung in Remission und Schub anhand der Krankheitsaktivität entsprechend der Aktivitätsscores

	PCDAI Punkte	PUCAI Punkte
Remission	0-10	0-10
Schub	≥ 11	≥ 11

Falls kein direkter Wert zum Messdatum vorhanden war, wurden sowohl beim PCDAI als auch beim PUCDAI bei gleichbleibendem klinischem Status die jeweils nächstliegenden Werte verwendet.

3.2.2.1. PCDAI

Als klinischer Score für Patienten mit Morbus Crohn wurden der PCDAI verwendet. Dabei wurde anstelle der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) der CRP-Wert genutzt.

Tabelle 5: Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) [32][11]

Kategorie		Punkte
Bauchschmerzen	keine	0
	gering: Kurz andauernd, die tägliche Aktivität nicht störend	5
	moderat bis schwer: Täglich, andauernd, auch nachts, die tägliche Aktivität beeinträchtigend	10
Stuhlgang	0-1 wässrige Stühle am Tag, nicht blutig	0
	bis 2 geformte und wenig blutige oder 2-5 wässrige Stühle am Tag	5
	deutliche Blutbeimengungen oder ≥ 6 wässrige Stühle oder nächtlicher Stuhlgang	10
Allgemeinbefinden	Wohlbefinden, keine Einschränkungen der Aktivität	0
	leicht reduziertes Allgemeinbefinden, gelegentliche Einschränkungen der Aktivität	5

	Missbefinden, deutliche Einschränkung der Aktivität								10
Hämatokrit (%)	< 10 Jahre	> 33	11-14 Jahre	> 35	15-19 Jahre	< 37	11-19 Jahre	> 34	0
		28-32	♂	30-34	♂	32-36	♀	29-33	2,5
		< 28		< 30		< 32		< 29	5
CRP (mg/l)	< 10								0
	10-50								2,5
	> 50								5
Albumin (g/dl)	≥ 3.5								0
	3.1-3.4								5
	≤ 3.0								10
Gewicht	Gewichtszunahme, gewollt gleichbleibendes Gewicht oder gewollter Gewichtsverlust								0
	ungewollt gleichbleibendes Gewicht oder ungewollter Gewichtsverlust von 1-9 %								5
	Gewichtsverlust von ≥ 10 %								10
Größe	bei Erstdiagnose		Absinken um < 1 Hauptperzentile					0	
			Absinken um > 1, jedoch < 2					5	

	Hauptperzentilen		
	Absinken um ≥ 2 Hauptperzentilen		10
	oder		
	im Follow-up	Wachstumsgeschwindigkeit ≥ -1 Standard Deviation Score (SDS)	0
		Wachstumsgeschwindigkeit < -1 SDS, aber > -2 SDS	5
Wachstumsgeschwindigkeit ≤ -2 SDS		10	
Abdomen	unauffällig, keine Resistenz, keine Abwehrspannung		0
	schmerzhafte Abwehrspannung oder schmerzlose Resistenz		5
	schmerzhafte Resistenz		10
Perirektale Manifestationen	unauffällig, asymptomatische Anhängsel		0
	1-2 indolente Fisteln, wenig sezernierend, keine Druckdolenz		5
	aktive Fistel, deutlich sezernierend, Druckdolenz oder Abszess		10
Extraintestinale Manifestationen	Fieber ≥ 38.5 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) für 3 Tage innerhalb der letzten Woche, Arthritis, Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum	keine	0
		eine	5
		zwei oder mehr	10

Das allgemeine Befinden der Patienten wurde anhand der Möglichkeit des Schulbesuches wie folgt festgelegt:

Tabelle 6: Einteilung des Allgemeinbefindens anhand der Möglichkeit des Schulbesuches

Schulbesuch	Punkte
normaler Schulbesuch	0
Schulbesuch noch möglich	5
kein Schulbesuch möglich	10

3.2.2.2. PUCAI

Für die Patienten mit der Diagnose Colitis ulcerosa wurde der PUCAI verwendet. Dabei wurde das Allgemeinbefinden der Patienten analog zum PCDAI am Schulbesuch bemessen.

Tabelle 7: Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) [85][11]

Kategorie		Punkte
Bauchschmerzen	keine	0
	können ignoriert werden	5
	können nicht ignoriert werden	10
Rektale Blutung	keine	0

	nur geringe Mengen und in < 50 % aller Stühle	10
	geringe Mengen in fast allen Stuhlgängen	20
	große Mengen (> 50 % der Stuhlmenge)	30
Überwiegende Stuhlkonsistenz	geformt	0
	wechselnd, teilweise geformt	5
	vollständig ungeformt	10
Anzahl an Stühlen (in 24 h)	0-2	0
	3-5	5
	6-8	10
	> 8	15
Nächtlicher Stuhlgang	nein	0
	ja	10
Alltagsaktivität	keine Einschränkungen der Alltagsaktivität	0
	geringe Einschränkungen, Schulbesuch noch möglich	5
	deutliche Einschränkungen, kein Schulbesuch	10

3.2.3. Paris-Klassifikation

Die pädiatrische Paris-Klassifikation wird in Anlehnung an die adulte Montreal-Klassifikation verwendet und dient einerseits der Festlegung des Erkrankungsphänotyps andererseits zur Abschätzung des individuellen Risikos.

Voraussetzung ist eine vollständige Diagnostik, die Einteilung wird anhand der endoskopischen sowie histologischen und radiologischen Ergebnisse bei Diagnosestellung vorgenommen. Bei der Paris-Klassifikation für Morbus Crohn Patienten werden zusätzlich das Alter bei Diagnosestellung, Wachstumsretardierung sowie Fisteln, Strikturen und perianale Erkrankungen berücksichtigt. [11]

Für die Auswertung der Daten wurde aufgrund der kleinen Fallzahl eine Zusammenfassung der einzelnen Kategorien vorgenommen. Für die Morbus Crohn Patienten wurden die Kategorien L1 bis L3 zur Kategorie "ileokolisch" sowie L4a und L4b zur neuen Kategorie "oberer Gastrointestinaltrakt" zusammengefasst. Für die Colitis ulcerosa Patienten wurden die Kategorien E1 bis E3 zur neuen Kategorie "keine Pancolitis" zusammengefasst, die Kategorie E4 blieb als "Pancolitis" bestehen.

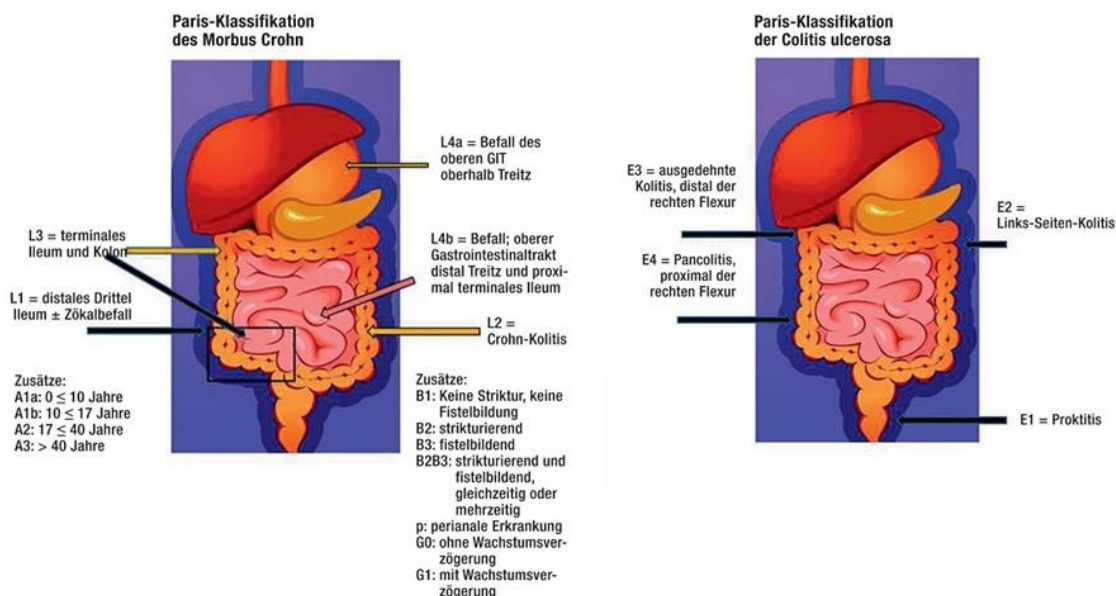


Abbildung 5: Die Parisklassifikation

Innerhalb der Paris-Klassifikation findet je nach Lokalisation des betroffenen Darmabschnittes eine Zuordnung zu einer der dargestellten Kategorien statt. [10]

3.3. Messung der Zytokinkonzentrationen

3.3.1. Vorbereitung der entnommenen Blutproben

Das im Rahmen von Routineuntersuchungen entnommene Blut wurde in EDTA-Monovetten gesammelt und für 10 bis 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert. Anschließend wurde das durch Pipettieren gewonnene Serum bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Zytokinkonzentrationen wurden unter Zuhilfenahme der Milliplex Map Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels analysiert. Insgesamt wurden vier Messungen mit jeweils 39 Proben gemacht. Zur Überprüfung der Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Messungen wurde ein Pool angelegt, der bei jeder Messung mitbestimmt wurde.

3.3.2. Luminex-xMAP-Technologie

Die Luminex-xMAP-Technologie ermöglicht die simultane Klassifizierung und Quantifizierung von bis zu 100 verschiedenen Parametern. Das Verfahren beruht auf der Nutzung von mikroskopisch kleinen Polystyrolpartikeln, den sogenannten Beads, die sich durch verschiedene intrinsische Fluoreszenzfarbstoffe in Bead-Typen einteilen lassen. Diese dienen analog zum enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und Western Blot als Festphase. Die einzelnen Bead-Typen tragen auf der Oberfläche einen spezifischen Antikörper für den jeweiligen Analyten. Die Messung wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt, in welcher der Bead-Mix zusammen mit den Proben inkubiert wird. Dabei bindet jeder Bead-Typ mit seinem spezifischen Nachweisreagenz an das entsprechende Zielmolekül.

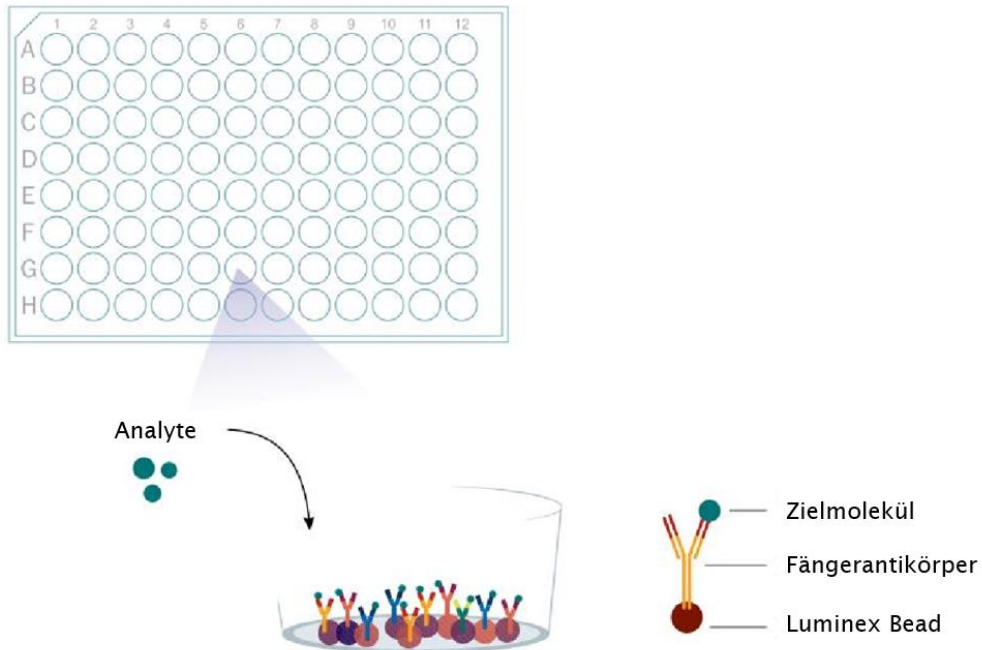


Abbildung 6: Luminex-Assay Schritt 1:

Die Proben werden zu einer Mischung aus farbcodierten Beads hinzugegeben, die auf ihrer Oberfläche einen spezifischen Antikörper für den jeweiligen Analyten tragen. [49]

In einem weiteren Schritt wird durch ein Detektionsmolekül, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, der quantitative Nachweis der einzelnen Analyten ermöglicht.

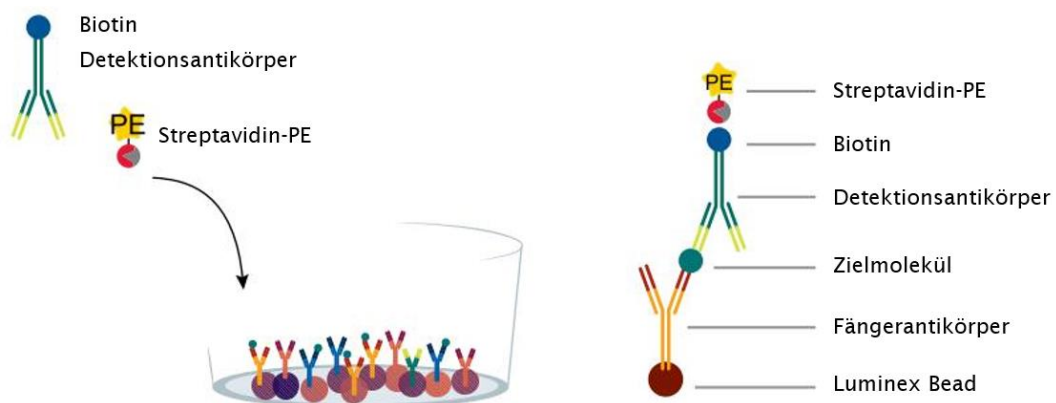


Abbildung 7: Luminex-Assay Schritt 2:

Für das Zielmolekül spezifische biotinylierte Detektionsantikörper werden hinzugegeben und bilden einen Antikörper-Antigen-Komplex. Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin wird hinzugefügt und bindet an die biotinylierten Detektionsantikörper. [49]

Da die intrinsischen Farbstoffe der Beads in einem anderen Wellenlängenbereich liegen als der Fluoreszenzfarbstoff des Detektionsmoleküls, sind mittels Durchflusszytometrie eine simultane Klassifizierung der Beads sowie die Quantifizierung des nachzuweisenden Analyten möglich.

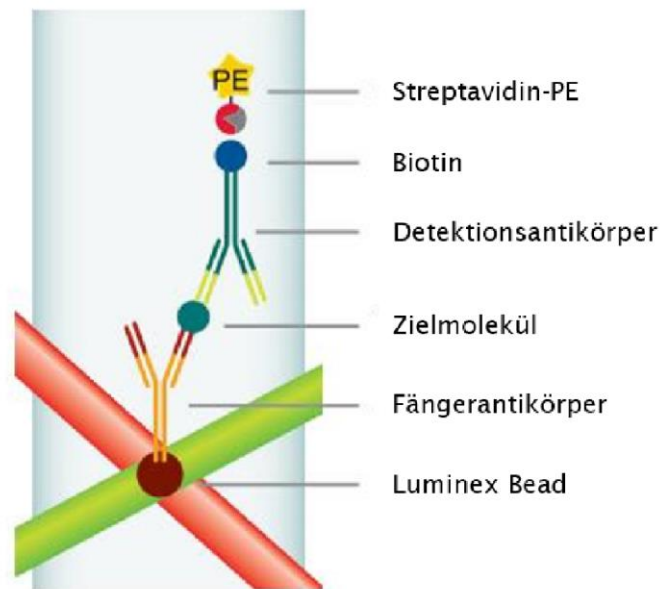


Abbildung 8: Luminex-Assay Schritt 3:

Die Beads werden mit zwei Lasern gleichzeitig angeregt. Während durch den einen Laser die farbkodierten Beads angeregt werden und so der spezifische Analyt direkt erkannt wird, regt der zweite Laser die fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper an, sodass die Menge der gebundenen Zielmoleküle erkannt werden kann. [49]

Für die Messung wurde eingestellt, dass minimal 100 Beads pro Analyt gemessen werden müssen, damit ein Ergebnis erhalten wird. Die Nachweisgrenze für alle Zytokine lag bei 3,2 pg/ml, wobei für die Angabe < 3,2 pg/ml der Schwellenwert 3,2 pg/ml definiert wurde.

Mithilfe der Luminex-Technologie erfolgte in jeder Blutprobe die quantitative Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-12p40, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IP-10 und TNF- α , des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 sowie der Chemokine IL-8, MCP-1, MCP-3 und MIP1 α als auch der Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF.

3.3.3. Ablauf der Messung

Die Messung wurde anhand des Protokolls der Firma Millipore durchgeführt. [55] Die aufbewahrten Blutproben wurden zur weiteren Verarbeitung zunächst aufgetaut, gevortext

und anschließend zentrifugiert. Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt, die Reagenzien wurden hierfür 30 Minuten vor Versuchsbeginn aus dem Kühlschrank genommen.

3.3.3.1. Vorbereitung der Reagenzien

Zuerst wurden die Antikörper-immobilisierten Beads jeweils 30 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert und 1 Minute gevortext. Von jedem Bead-Gefäß wurden 60 µl in die mixing bottle gegeben, das Volumen in der mixing bottle mit Bead Diluent auf insgesamt 3,0 ml gebracht und anschließend gevortext.

Als nächstes wurden die beiden Qualitätskontrollen mit jeweils 250 µl destilliertem Wasser gelöst, die Gefäße mehrmals über Kopf gedreht, gevortext und anschließend für 5-10 Minuten stehen gelassen.

Der Waschpuffer wurde zur Vorbereitung zunächst gemischt, um alle Salze in Lösung zu bringen. Anschließend wurden 60 ml Waschpuffer mit 540 ml destilliertem Wasser verdünnt.

Die lyophilisierte Serum Matrix wurde mit 1 ml destilliertem Wasser gemischt und für 10 Minuten stehen gelassen.

Anschließend wurde eine Standardreihe (10.000, 2.000, 400, 80, 16, 3,2 pg/ml) mit einer 1:4 Verdünnung hergestellt. Als 0 pg/ml Standard (Background) wurde der Assay Buffer verwendet.

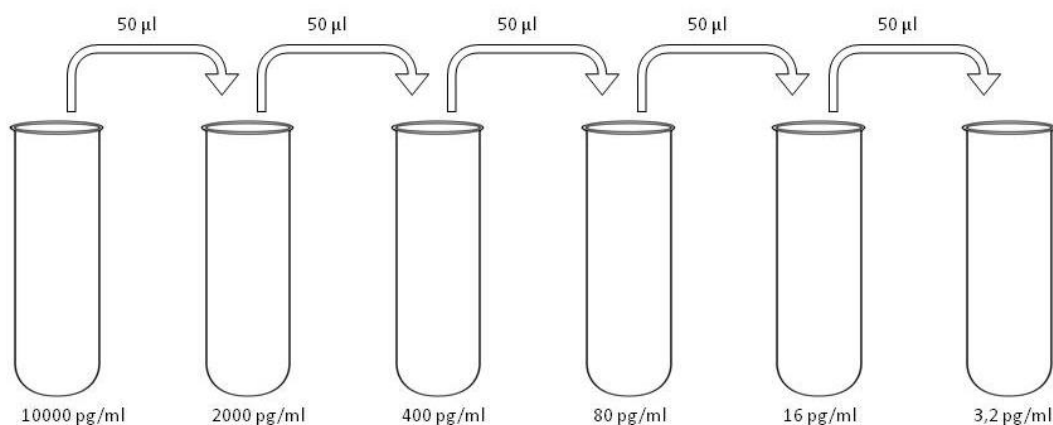


Abbildung 9: Herstellung einer Standardreihe.

Im Rahmen der Herstellung einer Standardreihe wurde zuerst ein Reagenzglas mit einem Standard der Konzentration 10000 pg/ml vorbereitet. In die fünf verbliebenen Reagenzgläser wurde 200 µl Assay Buffer gegeben und durch das Übertragen von je 50 µl von einem Gefäß in das jeweils Nächste eine Verdünnung mit dem Faktor vier von 10000 pg/ml auf 3,2 pg/ml erreicht. Modifiziert nach [55]

3.3.3.2. Durchführung der Messung

Alle Standards, Kontrollen und Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung gemessen.

Zunächst wurden 200 µl Waschpuffer in jedes Well gefüllt und die Platte für 10 Minuten bei 500-600 UpM in den Thermomixer gestellt. Nachdem der Waschpuffer ausgekippt worden war, wurden jeweils 25 µl von den Standards und Kontrollen in die passenden Wells gegeben. Anschließend wurden jeweils 25 µl des Assay Buffers in die Proben-Wells gegeben und jeweils 25 µl Matrix Solution zu Background, Standards und Controls hinzugeben. Danach wurden jeweils 25 µl Plasmaprobe in die Proben-Wells gegeben.

Nachdem die mixing bottle nochmals gevortext worden war, wurden 25 µl Beads in jedes Well geben. Während des Hinzufügens der Beads wurden diese in kurzen Abständen nochmals gemischt, um ein Absetzen zu vermeiden.

Anschließend wurde die Platte mit Folie verschlossen und für 2 Stunden bei 500-600 UpM in den Thermomixer gestellt. Danach wurde die Platte mit 200 µl Waschpuffer pro Well gewaschen.

Nachdem 25 µl Detektions-Antikörper in jedes Well geben worden waren, wurde die Platte erneut für 1 Stunde bei 500-600 UpM in den Thermomixer gestellt.

Es folgte das Hinzufügen von 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin pro Well, hiernach wurde die Platte nochmals für 30 Minuten bei 500-600 UpM in den Thermomixer gestellt.

In der Folge wurde die Platte zweimal, wie bereits zuvor beschrieben, gewaschen und 150 µl Sheath Fluid pro Well hinzugefügt. Die Platte wurde für 5 Minuten bei 500-600 UpM in den Thermomixer gestellt und schließlich im Luminex-Gerät ausgelesen.

3.4. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes IBM SPSS Statistics, Version 23.0.0.2 (64-Bit-Version). Die untersuchten Variablen zeigten keine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test). Alle Daten wurden als Median mit der Spannweite (Minimum und Maximum) angegeben. Die Prüfung der Häufigkeitsunterschiede bei diskreten Variablen erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Testes. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben. Der Gruppenvergleich von zwei verbundenen Stichproben erfolgte mittels Wilcoxon-Test. Zur Analyse von Zusammenhängen zwischen stetigen Variablen wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient r angewendet. Als statistisch signifikant wurden p -Werte $< 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkohorte

Im Studienzeitraum von Oktober 2015 bis April 2017 wurden insgesamt 145 Proben von 33 Patienten untersucht. Dabei nahmen 23 MC- sowie 10 CU-Patienten an der Studie teil. Im Ganzen konnten 99 Blutproben der MC-Patienten und 46 Blutproben von CU-Patienten untersucht werden.

4.1.1. Geschlecht

Unter den insgesamt 33 CED-Patienten waren 23 männliche (69,7 %) sowie 10 weibliche (30,3 %) Studienteilnehmer. 19 der MC-Patienten waren männlich (82,6 %) und 4 weiblich (17,4 %). Die Gruppe der CU-Patienten beinhaltete 4 männliche (40,0 %) sowie 6 weibliche (60,0 %) Studienteilnehmer. Mit einem p-Wert von 0,014 zeigte sich die Geschlechterverteilung zwischen den beiden Krankheitsentitäten signifikant unterschiedlich.

4.1.2. Alter

Es wurden Patienten im Alter von 9,0 bis 19,3 Jahren untersucht, wobei sie im Median 16,9 Jahre alt waren. Die MC-Patienten waren bei einer Altersspanne von 9,0 bis 19,3 im Median 16,9 Jahre alt. Die Altersspanne der CU-Patienten lag bei 12,9 bis 18,2 Jahren, im Median waren sie somit 16,5 Jahre alt. Bei einem p-Wert von 0,969 war bezüglich des Alters kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Krankheitsentitäten vorhanden.

4.1.3. BMI

Für die statistische Auswertung wurde der BMI zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme des jeweiligen Patienten im Rahmen der Studie verwendet. Der mediane BMI lag für die gesamte Patientenkohorte bei 20,4 kg/m² [16,0-39,2 kg/m²], wobei für die MC-Patienten ein Wert von 19,60 kg/m² [16,0-26,0 kg/m²] und für die CU-Patienten ein Median von 21,25 kg/m²

[17,0-39,2 kg/m²] vorlag. Zwischen den beiden Gruppen lag mit einem p-Wert von 0,113 kein signifikanter Unterschied vor.

4.1.4. Alter bei Diagnosestellung

Das Alter bei der Diagnosestellung, das heißt das Alter zum Zeitpunkt der Sicherung der jeweiligen Diagnose, lag bei den Studienteilnehmern insgesamt im Mittel bei 12,7 Jahren, wobei die MC-Patienten im Mittel 11,5 Jahre und die CU-Patienten 15,0 Jahre alt waren und sich nicht signifikant unterschieden (p = 0,213).

Insgesamt waren 26 CED-Patienten zum Zeitpunkt der Sicherung der jeweiligen Diagnose älter als 10 Jahre, 4 CED-Patienten waren 10 Jahre alt oder jünger. Bei allen 4 Patienten im Alter von 10 Jahren oder jünger handelte es sich um MC-Patienten, 17 der MC-Patienten waren älter als 10 Jahre. 9 der CU-Patienten waren zu Zeitpunkt der Sicherung der Diagnose älter als 10 Jahre. Es ergab sich hinsichtlich dieser Einteilung zwischen den beiden Erkrankungen mit einem p-Wert von 0,160 kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 8: Unterteilung der Patienten anhand des Alters

Alter zum Zeitpunkt der Sicherung der jeweiligen Diagnose	Gesamt	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
≤ 10 Jahre	4 (13,3 %)	4 (19 %)	0 (0 %)
> 10 Jahre	26 (86,7 %)	17 (81 %)	9 (100 %)

4.1.5. Erkrankungsdauer

Für die Erkrankungsdauer, das heißt die Zeitdifferenz zwischen Diagnosestellung und Zeitpunkt der jeweiligen Probenentnahme, ergaben sich im Mittel 24 Monate, wobei die maximale Dauer bei 98 Monaten lag. Die minimale Erkrankungsdauer (0 Monate) ergab sich daraus, dass bei einigen Patienten, wie oben bereits beschrieben, die Diagnose während des

Studienzeitraumes gestellt wurde. Mit einem Median von 30 Monaten [0-98 Monate] war die Erkrankungsdauer bei den MC-Patienten im Gegensatz zu den CU-Patienten mit einer mittleren Erkrankungsdauer von 18 Monaten [0-74 Monate] signifikant länger ($p < 0,001$).

4.1.6. Beobachtungszeitraum

Der mittlere Beobachtungszeitraum, das heißt die Zeitspanne zwischen der ersten und der letzten Blutentnahme eines Patienten innerhalb des Studienzeitraumes, lag bei 6,44 Monaten. Der minimale Beobachtungszeitraum lag bei 0 Monaten, da bei einigen Patienten nur eine Blutentnahme durchgeführt wurde. Der maximale Beobachtungszeitraum lag bei 16,03 Monaten. Die MC-Patienten wurden mit 7,6 Monaten [0-14,82 Monate] Beobachtungszeitraum im Median über einen längeren Zeitraum untersucht als die CU-Patienten mit einer medianen Beobachtungsdauer von 4 Monaten [1,38-16,03 Monate], dies ergab mit einem p-Wert von 0,153 jedoch keinen signifikanten Unterschied.

4.1.7. Probenanzahl pro Patient

Von den insgesamt 145 untersuchten Blutproben konnten 99 Blutproben von MC-Patienten sowie 46 Blutproben von CU-Patienten untersucht werden. Im Median stammen dementsprechend 4 Proben von einem Patienten, wobei minimal eine Probe entnommen wurde und der Maximalwert an Blutproben eines Patienten während des Studienzeitraums bei 15 Blutproben lag.

4.1.8. Übersicht über die Patientenkohorte

Tabelle 9: Übersicht über die Patientenkohorte

	Fallzahl		Gesamt	MC-Patienten	CU-Patienten	p-Wert
Patienten-Anzahl	33		33 (100 %)	23 (69,7 %)	10 (30,3 %)	
Geschlecht [m/w]	33		23/10 (69,7 %/ 30,3 %)	19/4 (82,6 %/ 17,4 %)	4/6 (40 %/ 60 %)	0,014
Alter zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme in Jahren	33	Median	16,93	16,93	16,52	0,969
		Minimum	9,04	9,04	12,88	
		Maximum	19,33	19,33	18,16	
BMI in kg/m²	31	Median	20,40	19,60	21,25	0,113
		Minimum	16,00	16,00	17,00	
		Maximum	39,20	26,00	39,20	
Alter bei Diagnosestellung in Jahren	30	Median	12,65	11,46	14,98	0,213
		Minimum	3,4	3,4	11,6	
		Maximum	17,9	17,9	16,5	

Erkrankungs- dauer in Monaten zum Zeitpunkt der Probenentnahme	135	Median	24,00	30	18	< 0,001
		Minimum	0	0	0	
		Maximum	98	98	74	
Beobachtungszeit- raum in Monaten	33	Median	6,44	7,60	3,98	0,153
		Minimum	0	0	1,38	
		Maximum	16,03	14,82	16,03	
Probenanzahl pro Patient	33	Median	4,00	5,00	3,50	0,843
		Minimum	1	1	2	
		Maximum	15	9	15	

4.1.9. Medikamenteneinnahme

Die Medikamenteneinnahme betreffend wurden Kortikosteroide, Immunsuppressiva, Biologicals, Sulfasalazin, Protonenpumpeninhibitoren und die Gabe von Vitamin D dokumentiert. Kortikosteroide wurden bei einer Anzahl von 25 (75,8 %) CED-Patienten eingesetzt, darunter 16 (69,6 %) MC-Patienten und 9 (90 %) CU-Patienten. Biologicals erhielten mit 4 (17,4 %) MC-Patienten und 2 (20 %) CU-Patienten insgesamt nur 6 (18,2 %) der CED-Patienten. Die Einnahme von Kortikosteroiden und Biologicals unterschied sich zwischen den beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,208 für die Kortikosteroide und einem p-Wert von 0,858 für die Biologicals nicht signifikant. Immunsuppressiva erhielten insgesamt 20 (60,6 %) der CED-Patienten, darunter 17 (73,9 %) der MC-Patienten sowie 3 (30 %) der CU-Patienten, was sich mit einem p-Wert von 0,018 als signifikanter Unterschied zeigte.

Tabelle 10: Übersicht über die Medikamenteneinnahme

	Gesamt	MC-Patienten	CU-Patienten	p-Wert
Kortikosteroide	25 (75,8 %)	16 (69,6 %)	9 (90,0 %)	0,208
Immunsuppressiva	20 (60,6 %)	17 (73,9 %)	3 (30,0 %)	0,018
Biologicals	6 (18,2 %)	4 (17,4 %)	2 (20,0 %)	0,858

4.1.10. Krankheitsphase

Von den insgesamt 145 Blutproben wurden 82 (56,6 %) in einer Remissionsphase und 63 (43,4 %) im Schub entnommen. Für die MC-Patienten ergab sich eine Verteilung von 57 Blutproben (57,6 % der Proben von MC-Patienten) aus der Remissionsphase und 42 Proben (42,4 % der Proben von MC-Patienten) während der klinisch aktiven Phase. Bei den CU-Patienten wurden 25 Blutproben (54,3 % der Proben von CU-Patienten) in der Remissionsphase entnommen und 21 Proben (45,7 % der Proben von CU-Patienten) während einer Schubphase. Mit einem p-Wert von 0,715 zeigte sich bei dieser Einteilung kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 11: Übersicht über die Krankheitsphasen und die Anzahl der untersuchten Blutproben

	Gesamt	MC-Patienten	CU-Patienten
Remission	82 (56,6 %)	57 (57,6 %)	25 (54,3 %)
Schub	63 (43,4 %)	42 (42,4 %)	21 (45,7 %)

4.1.11. Verteilung der Blutproben

Für den Vergleich der Zytokine zwischen den Krankheitsphasen mussten pro Fall maximal eine Probe im Schub beziehungsweise in der Remission ausgewählt werden. Bei mehreren vorhandenen Proben erfolgte die Auswahl der Probe nach dem Zufallsprinzip. Insgesamt wurden 51 Blutproben zusammengestellt. Bei 18 Patienten waren in beiden Krankheitsphasen Blutproben vorhanden (36 Blutproben), bei 10 Fällen nur in der Remission (10 Blutproben) und bei 5 Fällen ausschließlich in der aktiven Phase (5 Blutproben). Die Verteilung der Blutproben nach Fall zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 12: Verteilung der eingeschlossenen Blutproben bezüglich der Krankheitsphasen

		Gesamt	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Probeneinschluss eingeteilt nach Krankheitsphasen	Blutproben während Remission und Schub vorhanden	36 (70,6 %)	26 (72,2 %)	10 (66,7 %)
	Blutproben nur in Remission vorhanden	10 (19,6 %)	6 (16,7 %)	4 (26,7 %)
	Blutproben nur im Schub vorhanden	5 (9,8 %)	4 (11,1 %)	1 (6,7 %)
Probeneinschluss insgesamt		51 (100 %)	36 (100 %)	15 (100 %)

4.2. Zytokinmuster

4.2.1. Lagerungszeitraum und Temperatur

In einer vorangehenden Studie der Universität des Saarlandes wurde bereits der Einfluss des Zeitraums und der Lagerungstemperatur zwischen Blutentnahme und Zentrifugation auf die Zytokinkonzentrationen in den Blutproben bestimmt. Dabei ergaben sich für einen Lagerungszeitraum zwischen 0 und 4 Stunden sowie für eine Lagerungstemperatur von 4 °C bis Raumtemperatur keine signifikanten Unterschiede, sodass auf eine erneute Untersuchung verzichtet wurde. [31]

4.2.2. Messbare Zytokinkonzentrationen

Von den untersuchten Zytokinen waren alle bis auf das G-CSF in 95,1 % bis 100% der Blutproben nachweisbar. Das G-CSF konnte nur in 80,7 % (117 von 145) Blutproben nachgewiesen werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Erkrankung und der Rate der messbaren Zytokinspiegel konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.3. Intra-individuelle Zytokinkonzentrationen im Verlauf der Aktivitätsphasen

Alle untersuchten Zytokinkonzentrationen zeigten unabhängig von der CED-Erkrankung während verschiedenen Schub- oder Remissionsphasen mit einem p-Wert von 0,078-0,988 nur geringe und nicht signifikante Schwankungen (Durbin-Skilling-Mack-Test).

4.2.4. Vergleich von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bezüglich der Zytokinmuster

Zu Beginn wurde untersucht, ob die beiden Krankheitsentitäten MC und CU bezüglich der Zytokinmuster differieren. Bei den MC-Patienten fielen die Zytokine MCP-3 ($p = 0,003$) und MIP-1 α ($p = 0,013$) im Vergleich zu den CU-Patienten als signifikant erhöht auf. Bei der CU hingegen wurde verglichen mit dem MC ein signifikant erhöhtes Calprotectin ($p = 0,019$) festgestellt.

4.2.4.1. *Remission und Schub*

Um zu überprüfen, inwiefern die Aktivitätsphase der Erkrankung Einfluss auf die oben genannten Differenzen im Zytokinprofil zwischen den beiden Entitäten nimmt, erfolgte die Unterteilung in die Subkategorien Remission und Schub. Dabei zeigte sich in der Remission das MCP-3 bei den MC-Patienten im Vergleich zu den CU-Patienten signifikant erhöht ($p = 0,026$), im Schub war mit einem p-Wert von 0,054 lediglich ein Trend erkennbar.

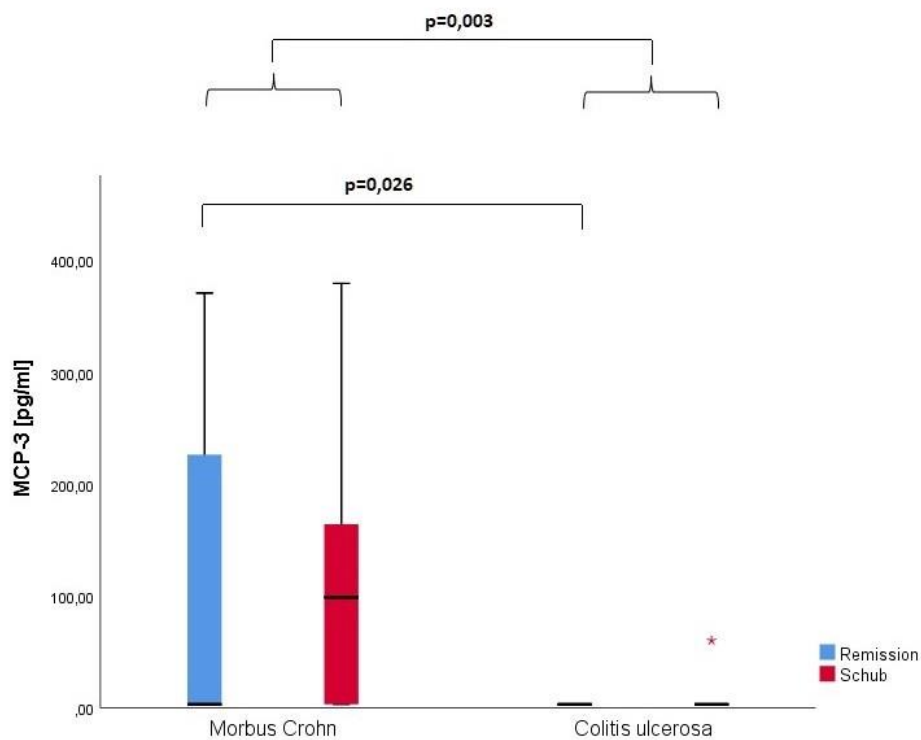


Abbildung 10: Boxplot: Verteilung des Zytokins MCP-3 gruppiert nach den Krankheitsentitäten.

Der dargestellte Boxplot zeigt die Verteilung des Zytokins MCP-3 innerhalb der Gruppen MC und CU unterteilt in die Kategorien Remission und Schub.

Für das MIP-1 α konnte weder in der Remission ($p = 0,076$) noch im Schub ($p = 0,091$) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Krankheitsentitäten nachgewiesen werden.

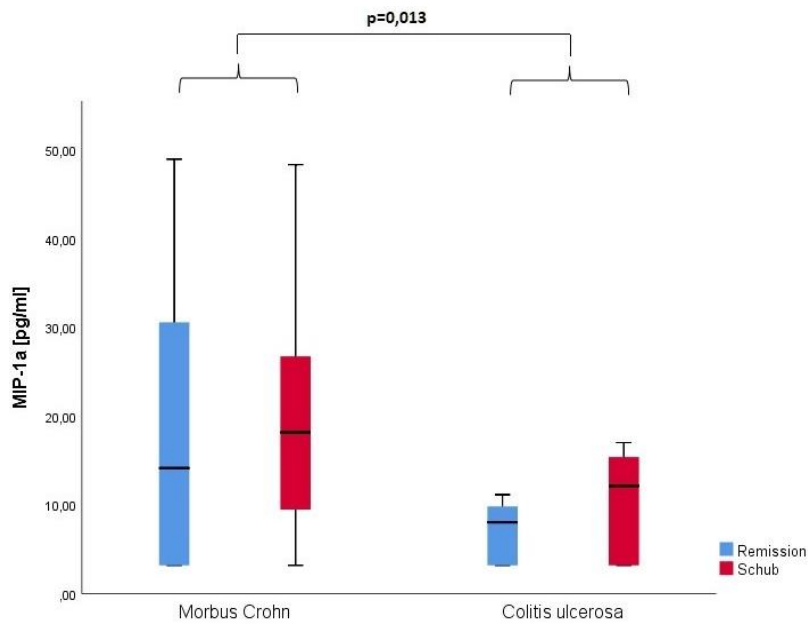


Abbildung 11: Boxplot: Verteilung des Zytokins MIP-1 α gruppiert nach den Krankheitsentitäten.

Der dargestellte Boxplot zeigt die Verteilung des Zytokins MIP-1 α innerhalb der Gruppen MC und CU unterteilt in die Kategorien Remission und Schub.

Die CU-Patienten wiesen im Vergleich zu den MC-Patienten nur im Schub eine signifikante Erhöhung des Calprotectins auf ($p = 0,020$).

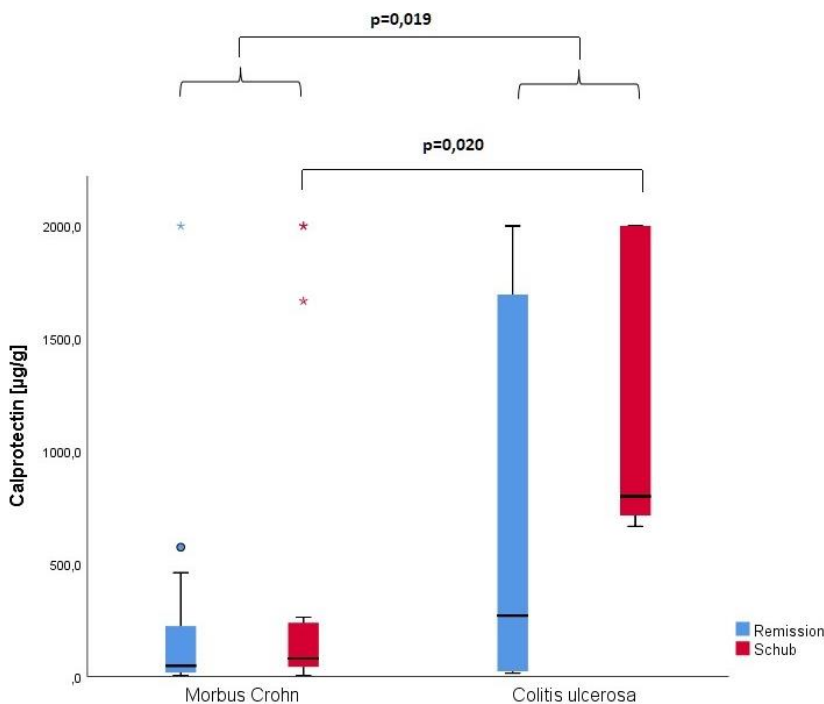


Abbildung 12: Boxplot: Verteilung des Calprotectins gruppiert nach den Krankheitsentitäten.

Der dargestellte Boxplot zeigt die Verteilung des Calprotectins innerhalb der Gruppen MC und CU unterteilt in die Kategorien Remission und Schub.

4.2.5. Vergleich der Krankheitsphasen Remission und Schub bezüglich der Zytokinmuster

Als nächstes wurde nach Unterschieden im Zytokinmuster zwischen den beiden Aktivitätsphasen Remission und Schub unabhängig von der jeweiligen Erkrankungsentität gesucht. Hierbei wurde im Schub im Vergleich zur Remission eine signifikante Erhöhung von sowohl CRP ($p = 0,043$) als auch IP-10 ($p = 0,013$) festgestellt.

4.2.5.1. *Morbus Crohn und Colitis ulcerosa*

Um zu überprüfen, inwiefern die Krankheitsentität Einfluss auf die oben genannten Differenzen im Zytokinmuster zwischen den beiden Aktivitätsphasen nimmt, folgte eine weitere Unterteilung anhand der beiden Krankheitsbilder MC und CU. Dabei zeigten sich folgende Unterschiede: Es war bei den MC-Patienten eine signifikante Erhöhung des Zytokines IP-10 im Schub im Vergleich zur Remission ($p = 0,033$). Bei der CU-Gruppe war ein signifikant erhöhter CRP-Wert im Schub im Vergleich zur Remission erkennbar ($p = 0,043$).

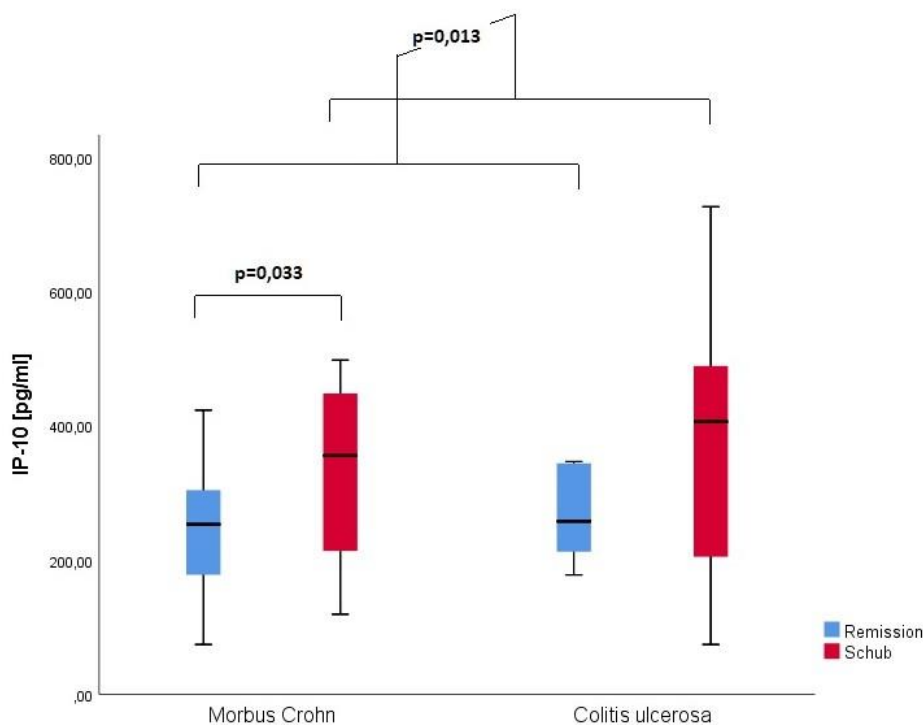


Abbildung 13: Boxplot: Verteilung des Zytokins IP-10 gruppiert nach den Krankheitsentitäten.

Der dargestellte Boxplot zeigt die Verteilung des Zytokins IP-10 innerhalb der Gruppen MC und CU unterteilt in die Kategorien Remission und Schub.

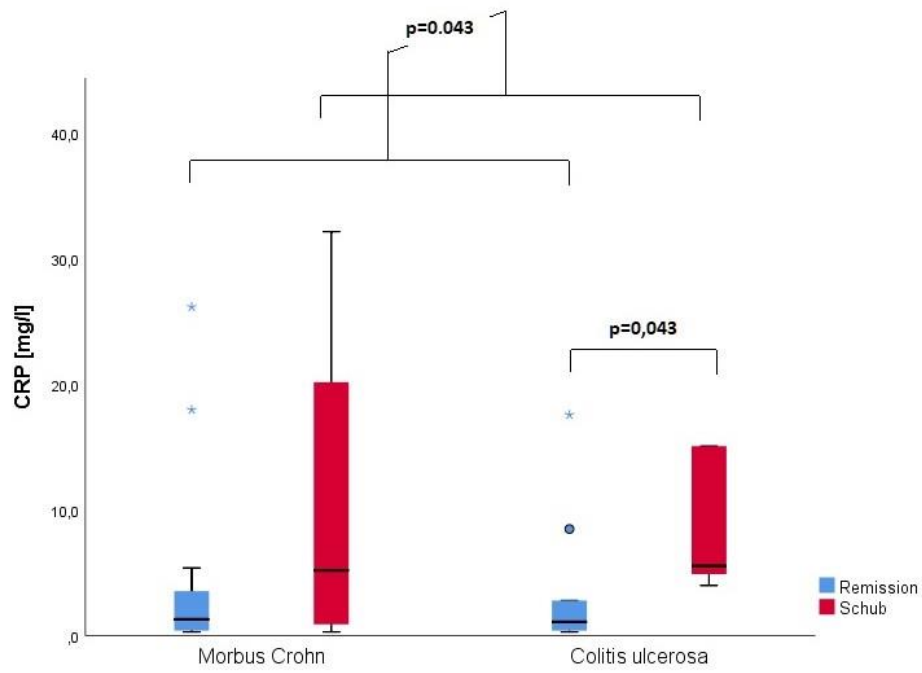


Abbildung 14: Boxplot: Verteilung des CRP gruppiert nach den Krankheitsentitäten.

Der dargestellte Boxplot zeigt die Verteilung des CRP innerhalb der Gruppen MC und CU unterteilt in die Kategorien Remission und Schub.

4.2.6. Korrelation der Zytokinmuster mit der Krankheitsaktivität entsprechend der Aktivitätsscores

4.2.6.1. PCDAI und PUCAI

Für die Betrachtung der Korrelation der Zytokinmuster mit der Krankheitsaktivität entsprechend der beiden Aktivitätsscores PCDAI und PUCAI wurden zunächst die Ergebnisse der beiden Scores näher betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl der PCDAI mit einem p-Wert von $\leq 0,001$ als auch der PUCAI mit einem p-Wert von 0,043 zwischen den beiden Aktivitätsphasen Remission und Schub jeweils signifikant unterschiedlich waren.

Tabelle 13: Übersicht über die Auswertung der Aktivitätsscores PCDAI und PUCAI während Remission und Schub

	PCDAI Remission	PCDAI Schub	PUCAI Remission	PUCAI Schub
Fallzahl	19	17	9	6
Median	10,00	15,00	10,00	55,00
Minimum	0	12,5	0	15
Maximum	10	50	10	75
Asymptotische Signifikanz	$\leq 0,001$		0,043	

Als nächstes wurden beide Aktivitätsscores auf Korrelationen mit dem Zytokinmuster untersucht. Für den PCDAI konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden, für den PUCAI hingegen zeigten sich eine positive Korrelation sowohl für das CRP ($r = 0,566$, $p = 0,028$) als auch für die beiden Zytokine G-CSF ($r = 0,575$, $p = 0,032$) und IL-8 ($r = 0,521$, $p = 0,047$).

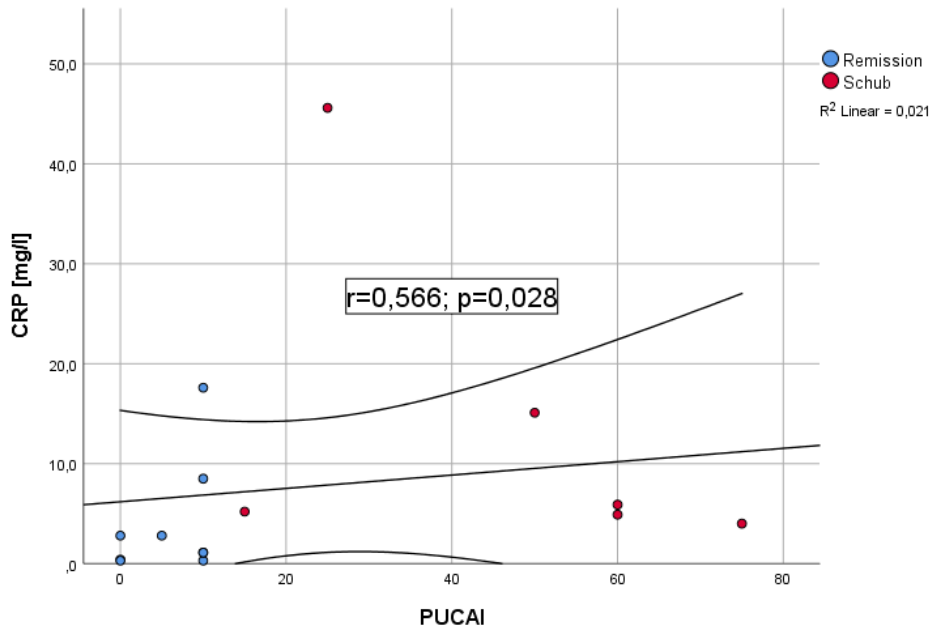


Abbildung 15: Streudiagramm: Korrelation zwischen dem CRP und dem PUCAI

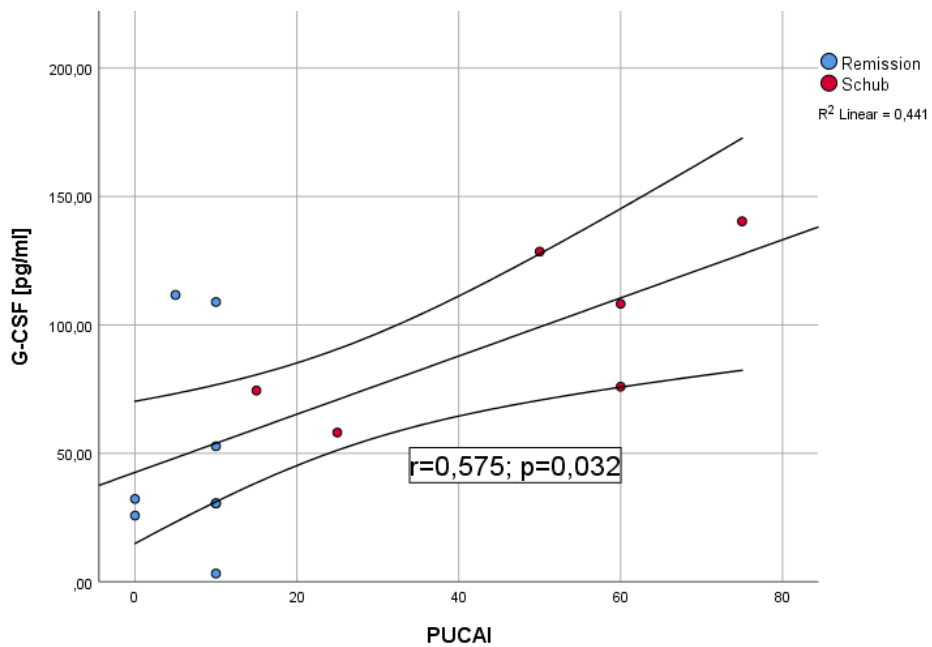


Abbildung 16: Streudiagramm: Korrelation zwischen dem G-CSF und dem PUCAI

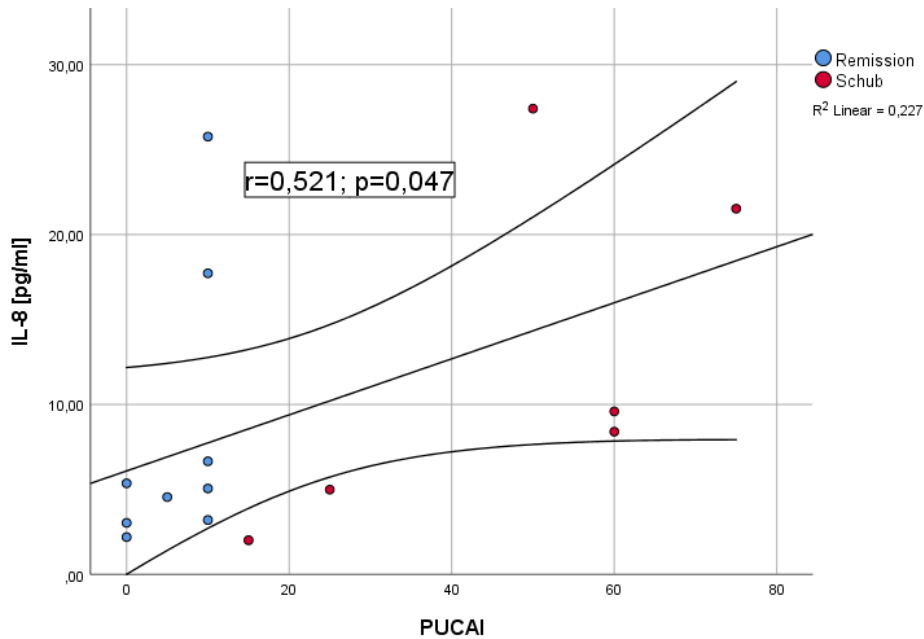


Abbildung 17: Streudiagramm: Korrelation zwischen dem IL-8 und dem PUCAI

4.2.7. Korrelation der Zytokinmuster mit Calprotectin und CRP

Ebenfalls untersucht wurde die Korrelation der beiden für die CED gebräuchlichsten Aktivitätsmarker Calprotectin und CRP mit den Zytokinmustern sowie den Aktivitätsscores. Die Calprotectin- und CRP-Werte korrelierten dabei untereinander signifikant ($r = 0,562$, $p < 0,001$). Weder die Zytokinmustern noch die Aktivitätsscores standen mit dem Calprotectin in einem signifikanten Zusammenhang. Die CRP-Werte hingegen korrelierten sowohl mit den Zytokinen G-CSF ($r = 0,291$, $p = 0,047$) und IL-6 ($r = 0,281$, $p = 0,045$) als auch mit dem PUCAI ($r = 0,566$, $p = 0,028$).

5. Diskussion

5.1. Stärken und Limitationen der vorliegenden Arbeit

Da nur wenige Ausschlusskriterien für die Studie vorlagen, Krankheitsdauer und Therapiemaßnahmen für die Fragestellung nicht von Belang waren und lediglich Patienten eines Zentrums eingeschlossen wurden, spiegelt die Patientenkohorte den klinischen Alltag gut wider. Limitationen der vorliegenden Arbeit liegen hingegen in der begrenzten Anzahl von 33 Patienten sowie dem Fehlen einer gesunden Kontrollgruppe. In vielen vorangegangenen Studien zu Zytokinmustern bei juvenilen CED-Patienten an lediglich einem Zentrum zeigte sich die Problematik eines kleinen Patientenkollektives jedoch sogar noch ausgeprägter. [19][39][74][83][89]

Im Vergleich mit der 958 CED-Patienten umfassenden Patientenkohorte von Buderus und Scholz et al., die im Jahr 2015 eine Charakterisierung von neuerkrankten pädiatrischen Patienten des 2004 von der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (GPGE) gegründeten Registers CEDATA-GPGE vornahm, welches Kinder und Jugendliche mit CED aus 84 Kliniken und Ambulanzen in Deutschland und Österreich einschließt, ergaben sich folgende Übereinstimmungen und Unterschiede:

Die Verteilung der Patienten auf die beiden Krankheitsentitäten bei Buderus und Scholz et al. lag bei 64,3 % MC-Patienten, 29 % CU-Patienten und 6,7 % Patienten mit unklassifizierter CED. In der vorliegenden Studie lag mit 69,7 % MC-Patienten und 30,3 % CU-Patienten eine sehr ähnliche Verteilung vor. Patienten mit einer unklassifizierten CED wurden aufgrund der geringen Fallzahl nicht in die Studie aufgenommen, was somit ebenfalls dem geringen Prozentsatz des CEDATA-GPGE entspricht. [10]

Während bei Buderus und Scholz et al. 23,2 % der Patienten zum Zeitpunkt der Sicherung der jeweiligen Diagnose jünger als 10 Jahre alt waren, fielen in der vorliegenden Studie 13,3 % der Patienten in diese Kategorie. Die genaue Verteilung um das Alter von 10 Jahren innerhalb der beiden Krankheitsentitäten zeigte für den MC eine Verteilung von 19,4 % < 10 Jahre und 80,6 % ≥ 10 Jahre, was der vorliegenden Studie mit 19 % der MC-Patienten ≤ 10 Jahre und 81 % älter als 10 Jahre entsprach. Die CU-Patienten betreffend lag bei Buderus und Scholz et

al. ein Verteilung von 26 % < 10 Jahre sowie 74 % ≥ 10 Jahre vor, während in der vorliegenden Studie alle CU-Patienten älter als 10 Jahre alt waren. [10] Mit einem medianen Alter von 13 Jahren für die MC-Patienten und 12,6 Jahren für CU-Patienten bei Buderus und Scholz et al. war die Patientenkohorte in der vorliegenden Studie mit 16,93 Jahren für die MC-Patienten und 16,52 Jahren für die CU-Patienten etwas älter. [10]

Die Geschlechtsverteilung betreffend überwog bei beiden Studien beim Morbus Crohn das männliche Geschlecht mit 58,3 % (Buderus und Scholz et al.) und 82,6 % (vorliegende Studie). Bei der CU hingegen differierte die Verteilung insofern, als innerhalb des CEDATA-GPGE die männlichen Patienten mit 52,2 % knapp überwogen, in der vorliegenden Studie hingegen das weibliche Geschlecht mit 60 % stärker vertreten war. [10]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie durchaus einem Querschnitt der allgemeinen Bevölkerung in Deutschland und Österreich nahekommt.

Die verwendeten Blutproben wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen sowie krankheitsbedingten Aufenthalten der Patienten im Krankenhaus gesammelt, um den Patienten eine zusätzliche Blutentnahme im Rahmen der Studie zu ersparen. Nach der Entnahme wurden die Blutproben schnellst möglich zentrifugiert und das Serum bei - 20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt, wodurch eine Verfälschung der Zytokinwerte durch Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen oder eine zu lange Zeitdauer bis zur Zentrifugation vermieden werden sollte. Die Sammlung der Blutproben zu nicht festgelegten und standardisierten Zeitpunkten bedingte unterschiedliche Zeitabstände zwischen den einzelnen Blutproben bei den verschiedenen Patienten sowie eine unterschiedliche Anzahl an Proben pro Patient. Ein möglicher Einflussfaktor auf die Ergebnisse ist sicherlich, dass die Blutproben alle aus demselben Zentrum stammen, was jedoch den Vorteil mit sich brachte, dass alle Patienten dem gleichen im Zentrum üblichen Therapieregime unterlagen.

Die klinischen Aktivitätsscores PCDAI und PUCAI werden oft zum Maß der Krankheitsaktivität in Studien herangezogen, im klinischen Alltag spielen sie eher eine bestätigende Rolle. Ein etablierter Score zur subjektiven Beurteilung der Krankheitsaktivität durch die Patienten ist bisher nicht vorhanden. [90] Die beiden klinischen Aktivitätsscores

PCDAI und PUCAI werden häufig aufgrund ihrer Abhängigkeit vom jeweiligen Untersucher kritisiert. [90] Zudem ist die Erfassung mit einem beträchtlichen Zeitaufwand verbunden. [15] Ein großer Vorteil der klinischen Scores ist jedoch, dass sie nur wenige Laborwerte enthalten und somit nur wenig invasiv sind, was insbesondere in der Pädiatrie von Bedeutung ist.

Beide Scores setzen sich aus subjektiveren Elementen, wie zum Beispiel den Bauchschmerzen und objektiveren Werten, wie beispielsweise den Laborparametern zusammen. Hoekman und Diederens et al konnten im Jahr 2016 in einer Studie zu der Korrelation zwischen den Biomarkern Calprotectin und CRP mit den beiden Aktivitätsscores Abbreviated Pediatric Crohn's Disease Activity Index (aPCDAI) und PUCAI verschiedene Aspekte aufzeigen: Einerseits korrelierte das fäkale Calprotectin in dort genannten vorausgegangen Studien besser mit dem PCDAI als mit dem in ihrer Studie verwendeten aPCDAI, welcher nur klinische Komponenten enthält. Andererseits konnten sie zeigen, dass das Calprotectin innerhalb des aPCDAI nur mit den einzelnen Komponenten abdominale Untersuchung und perianale Erkrankung korrelierte, welche zu den objektiver beurteilbaren klinischen Komponenten des Scores zählen. [26]

Wir versuchten Fehlerquellen dieser Art zu minimieren, indem wir beispielsweise für den Parameter Allgemeinbefinden (PCDAI)/Alltagsaktivität (PUCAI) die Möglichkeit des Schulbesuches als objektivere Einteilung verwendeten.

Die Bestimmung der Zytokinwerte aus den Blutproben mittels Multiplexanalyse bietet im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren einige Vorteile: Das Verfahren ermöglichte uns die simultane Bestimmung von 14 Zytokinen, wodurch im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, wie zum Beispiel dem ELISA-Verfahren, ein Zeitersparnis erreicht werden konnte. Neben der Zeitersparnis geht die simultane Bestimmung der Zytokine bei der Multiplexanalyse mit einem geringeren Verbrauch an Labormaterialien und somit auch geringeren Kosten einher. [7][72][43] So ist eine Reduktion der Kosten bereits durch die simultane Messung von sechs Parametern möglich und die Einsparungen an Kosten, Zeit und Reagenzien steigen mit jedem hinzukommenden gemessenen Zytokin. [91] Theoretisch ist eine simultane Messung von bis zu 100 Parametern gleichzeitig möglich, meist werden jedoch nicht mehr als etwa 30 Parameter bestimmt um Kreuzreaktionen zu vermeiden. [43]

Ein Nachteil der Multiplexanalyse ist, dass die Spezifität stark abhängig von der Qualität der jeweiligen Beads ist. Abhängig von dieser Qualität kann es auch hier zu Kreuzreaktionen

kommen, welche das Ergebnis verfälschen können. [91] Die Sensitivität betreffend hingegen konnte verglichen mit dem ELISA-Verfahren gezeigt werden, dass die Multiplexanalyse mit einer höheren Sensitivität aufwarten kann. [91] Hinzu kommt eine hohe Reliabilität, welche sich in der Minimierung von Fehlern durch die Bestimmung des Mittelwerts aus mehreren Beads begründet. [91]

Ein weiterer Vorteil der Luminex-Analyse besteht darin, dass sehr kleine Probenvolumina ausreichend sind, was insbesondere in der Pädiatrie von Bedeutung ist, in welcher das Blut aufgrund des insgesamt kleineren Blutvolumens ein noch wertvolleres biologisches Gut darstellt, als dies bei Erwachsenen der Fall ist. Während beim ELISA-Verfahren ein Probenvolumen von > 1 ml benötigt wird [28], ist beim Bead-basierten Assay ein Volumen von 25-50 μ l ausreichend. [43]

Die Sammlung und Lagerung der Proben bis zur Zentrifugation und Messung stellt hingegen eine Limitation des Luminex-Verfahrens dar. Messfehler durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren versuchten wir durch das jeweilige Verteilen des Serums einer Blutprobe auf drei Eppendorf-Gefäße zu vermeiden. Zudem konnte, wie im vorangegangenen Teil der Arbeit bereits erwähnt, in einer Studie der Universität des Saarlandes aus dem Jahr 2013 gezeigt werden, dass sich für einen Lagerungszeitraum zwischen 0 und 4 Stunden sowie für eine Lagerungstemperatur von 4 °C bis Raumtemperatur keine signifikanten Unterschiede ergaben. [31] Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Messungen zu haben, legten wir zudem einen Pool an, welcher bei jeder Messung mitbestimmt wurde. Da die Nachweisgrenze für die einzelnen Zytokine bei 3,2 pg/ml lag, kann unterhalb dieses Wertes keine Aussage getroffen werden, es ist jedoch unklar, ob Zytokine in solch niedrigen Konzentrationen relevante Funktionen haben. [31] Es ist jedoch zu sagen, dass für die Beurteilung von Zytokinmustern die Veränderung mehrerer Zytokine wesentlich aussagekräftiger ist, als die Bestimmung von Einzelparametern. [73]

5.2. Veränderungen im Zytokinmuster von CED-Patienten

Schon früh konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im Zytokinprofil von CED-Patienten bestehen, so konnten Ebert et al. bereits im Jahr 1984 Veränderungen des Zytokins IL-2 bei CED-Patienten feststellen. [16] Zudem fand man heraus, dass sich sowohl rekombinante antiinflammatorische Zytokine, als auch spezifische Antikörper zur Neutralisation proinflammatorischer Zytokine zur Therapie und Prävention nutzen lassen. Mit Infliximab, einem neutralisierenden Antikörper für TNF- α , wurde ein wichtiger Schritt gemacht. Enttäuschend waren jedoch Studien in Bezug auf die Einsetzbarkeit anderer Medikamente zur Neutralisation der Zytokine, wie zum Beispiel Fontolizumab (neutralisierender Antikörper für IFN- γ), sowie Secukinumab (neutralisierende Antikörper für IL-17A). [60]

Die Relevanz der veränderten Zytokine bei CED ist inzwischen gut etabliert, allerdings weiß man deutlich mehr über adulte als über juvenile Patienten. Während viele bisher durchgeführte Studien nur eine der beiden Krankheitsentitäten untersuchten und diese oder beide Krankheitsentitäten getrennt jeweils mit einer Kontrollgruppe verglichen [80][89][39][83][19] oder aber juvenile und adulten Patienten einer oder beider Entitäten untereinander als auch mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen [66], geben nur wenige Studien Auskunft über die Differenzen zwischen den beiden Krankheitsbildern, insbesondere bei pädiatrischen Patienten.

Da die Unterscheidung zwischen dem MC und der CU manchmal schwierig bis unmöglich sein kann [42] und der Verlauf der beiden Krankheitsentitäten sowie das Ansprechen auf die Therapie signifikant unterschiedlich sind, ist es außerordentlich wichtig, die Diagnose frühzeitig richtig zu stellen. [41]

Erkenntnisse über Differenzen im Zytokinmuster zwischen dem MC und der CU könnten helfen, die beiden Entitäten diagnostisch besser unterscheiden und dementsprechend intervenierend reagieren zu können. Aus diesem Grund beschäftigten wir uns mit den Differenzen in den Zytokinmustern zwischen den beiden Krankheitsentitäten und den beiden Aktivitätsphasen Remission und Schub.

5.2.1. Vergleich der beiden Krankheitsentitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der beiden Aktivitätsphasen Remission und Schub

Sowohl MCP-3 als auch MIP-1 α werden zu den Chemokinen gezählt. Bis heute sind etwa 50 Chemokine und 20 Chemokin-Rezeptoren bekannt. [50][67] Anhand der genauen Anordnung der Cysteinreste am Amino-Terminus lassen sich die Chemokine in vier Familien unterteilen: CC, CXC, CX3C und XC. [30] Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind Chemokine dafür zuständig, Leukozyten zum Ort der Entzündung zu leiten. [30] Neben chemotaktischen und proinflammatorischen Effekten sind sie vor allem an der Hämostasis beteiligt. [53] Chemokine wirken an ihren Zielzellen über die Bindung an über 20 verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diesen Wirkungsmechanismus macht man sich zum Beispiel bei einer HIV-Infektion mithilfe eines Rezeptorantagonisten (CCR5-Inhibitor: Maraviroc) als Therapieansatz zunutze. [98] Für die Therapie der CED ist bisher kein Chemokin-Rezeptorantagonist bekannt.

MCP-3, welches man auch als CCL7 bezeichnet, ist Teil der CC-Chemokin-Familie und wurde erstmals im Jahr 1992 beschrieben. [88] MCP-3 wird von vielen verschiedenen Zellen gebildet, darunter Bindegewebszellen, Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur, Keratinozyten und Tumorzellen. [48]

Wedemeyer et al., die bereits im Jahr 1998 mithilfe einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachweisen konnten, dass die Produktion von MCP-3 in Bereichen der aktiven Entzündung bei CED-Patienten erhöht ist, fanden diese Erhöhung bei den CU-Patienten stärker erkennbar als bei den MC-Patienten. Sie führten dies darauf zurück, dass die Wandschichten bei den beiden Entitäten mit einem transmuralen Befall beim MC und einem auf die Mukosa und Submukosa begrenzten Befall bei der CU in unterschiedlichem Ausmaß betroffen sind. [94]

Uguccioni et al. konnten nur ein Jahr später zeigen, dass die Anzahl der Zellen in der Lamina propria, welche die Zytokine IP-10, IL-8, MCP-1 und MCP-3 exprimieren, in intestinalen Biopsien von adulten CU-Patienten (n = 30) im Gegensatz zu Biopsien gesunder Kontrollen erhöht waren und zudem positiv mit der Krankheitsaktivität korrelierten. [87]

Während also bei Wedemeyer et al. das MCP-3 bei der CU und beim MC verglichen mit gesunden Kontrollen erhöht war, dies allerdings verstärkt bei der CU, und bei Uguccioni et al. die Erhöhung nur für CU-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt wurde, kamen wir zum Ergebnis des erhöhten MCP-3 beim MC verglichen mit der CU. Diese

Ergebnisse legen insgesamt betrachtet die Vermutung nahe, dass das Zytokin MCP-3 bei den immunologischen Abläufen beider Krankheitsentitäten von Bedeutung ist. Zu beachten ist allerdings, dass wir keine gesunden Kontrollen hatten und somit ein exakter Vergleich mit oben genannten Studien, welche die Entitäten nicht untereinander verglichen, nicht möglich ist. Interessanterweise zeigte sich das MCP-3 bei uns im Vergleich zwischen dem MC und der CU vor allem in der Remission signifikant erhöht, während diese Erhöhung im Schub nur als Trend erkennbar war, es zeigte sich im Gegensatz zu Ugucioni et al. also eine negative Korrelation mit der Krankheitsaktivität.

Bei der Suche nach vergleichbarer neuerer Literatur zeigte sich, dass das MCP-3 im Gegensatz zu einigen anderen Zytokinen, wie beispielsweise IL-6 oder TNF- α , vergleichsweise selten untersucht wurde. [41]

Ein weiteres der bisher wenig untersuchten Zytokine ist das MIP-1 α [41], welches sich bei Ugucioni et al. bei den CU-Patienten im Vergleich mit den gesunden Kontrollen unverändert zeigte. [87] Das Chemokin MIP-1 α , welches auch CCL3 genannt wird, wurde erstmals im Jahr 1988 beschrieben [96] und gehört zusammen mit denen ihm nah verwandten Chemokinen MIP-1 β , MIP-1 γ und dem MIP-1 δ ebenfalls der CC-Chemokin-Familie an. [54] Diese MIP-Proteine werden vor allem von Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten produziert. [53] Die Produktion von MIP-1 kann durch verschiedene proinflammatorische Zytokine induziert werden, darunter TNF- α , IFN- γ , IL-1 α und IL-1 β , während die Produktion durch die antiinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-4 und IL-10 gehemmt wird. [53]

Pender et al. konnten zeigen, dass die systemische Verabreichung des Zytokins MIP-1 α die intestinale Entzündung bei Mäusen verschlimmert. Sie führten dies darauf zurück, dass MIP-1 α die Fähigkeit besitzt, die TH1-Antwort in der Darmwand zu verstärken. [68] Unsere Ergebnisse können diese Hypothese unterstützen, da sich das MIP-1 α im Vergleich der beiden Krankheitsentitäten beim MC im Gegensatz zur CU erhöht zeigte, was dafür sprechen könnte, dass dieses Zytokin in der Pathogenese der MC, bei welchem eine Dominanz der TH1-Zellen bekannt ist, einen höheren Stellenwert hat.

Korolkova et al. beschäftigten sich ebenfalls mit der Fragestellung nach Differenzen im Zytokinmuster zwischen MC- und CU-Patienten um die Diagnostik zu erleichtern und den Patienten direkt die zutreffende Therapie zukommen lassen zu können. Sie verglichen die adulten CED-Patienten, die sich alle im Schub befanden, hierbei sowohl untereinander als

auch jeweils mit einer gesunden Kontrollgruppe. Während bei den CU-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ein erhöhter Wert für TNF- α gezeigt werden konnte, waren bei den MC-Patienten IFN- γ und IL-6 erhöht. Bei beiden Entitäten war zudem das IL-8 im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Zwischen den beiden Krankheitsentitäten MC und CU hingegen konnte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit kein Unterschied festgestellt werden. [41] Ähnliche Ergebnisse wie Korolkova et al. hinsichtlich der erhöhten Zytokine IL-6 und TNF- α zeigten auch Fujitake et al., welche die Zytokinmuster juveniler japanischer MC-Patienten unterteilt in die Subkategorien Remission (n = 20) und Schub (n = 11) im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe untersuchten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die IL-6- und TNF- α -Werte im Schub verglichen mit den gesunden Kontrollen erhöht waren, in der Remission waren diese erhöhten Werte im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe nicht mehr vorhanden. [19] In der vorliegenden Arbeit waren IL-6, TNF- α und IFN- γ betreffend keine Veränderungen zwischen den beiden Entitäten erkennbar, es ist aber nicht auszuschließen, dass die genannten Zytokine bei beiden Entitäten im gleichen Rahmen erhöht waren und somit nicht als verändert auffielen.

Neben den Zytokinmustern wurden auch die Unterschiede der bisher bekannten Biomarker Calprotectin und CRP zwischen den beiden Krankheitsentitäten und Aktivitätsphasen untersucht. Unsere Ergebnisse diesbezüglich sind vergleichbar mit jenen von Komraus et al., bei welchen sich das Calprotectin bei pädiatrischen CU-Patienten im Vergleich zu den MC-Patienten ebenfalls erhöht zeigte. [40] Auch Mosli et al. konnten zeigen, dass das Calprotectin für die CU verglichen mit dem MC eine höhere Spezifität aufweist, während die Sensitivität für beide Entitäten ähnlich ist. [57] Mit einer signifikanten Erhöhung des Calprotectins im Schub bei isolierter Betrachtung der Aktivitätsphasen konnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie das Calprotectin weiterhin als etablierten Biomarker für die Krankheitsaktivität bestätigen.

Viele vorangegangene Studien beinhalten keine Unterteilung in die beiden Aktivitätsphasen Schub und Remission, sondern unterteilen lediglich nach CED-Patienten und gesunden Kontrollen. Erkenntnisse in diese Richtung könnten jedoch helfen, bei CED-Patienten das Eintreten einer aktiven Phase besser zu erkennen und somit schneller intervenieren zu können.

Mosli et al. beschrieben für das CRP als Biomarker bei der CED eine hohe Spezifität. [57] Die Sensitivität ist hingegen limitiert, da die Produktion des CRP bei den meisten systemischen, inflammatorischen Erkrankungen erhöht ist. [57] Ein weiterer Vorteil des CRP-Wertes ist jedoch, dass die Produktion nicht von antiinflammatorischen oder immunsuppressiven Medikamenten beeinflusst wird und folglich eine Veränderung des Wertes als Effekt des Medikaments gedeutet werden kann. [52][25]

Die Erhöhung des CRP-Wertes im Schub in der vorliegenden Studie geht mit vielen bisherigen Studien einher und konnte das CRP als etablierten Entzündungsmarker erneut bekräftigen. Überraschender war hingegen, dass bei der Untersuchung des Einflusses der Entität auf den erhöhten CRP-Wert ein signifikant erhöhtes CRP bei den CU-Patienten im Vergleich mit den MC-Patienten erkennbar war. So geht aus der aktualisierten S3-Leitlinie Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten hervor, dass der Anstieg des CRP in der Regel bei den MC-Patienten stärker ausgeprägt ist als bei den CU-Patienten. [42]

IP-10 gehört zur CXC-Familie der Chemokine und wird auch als CXCL10 bezeichnet. Es ist bekannt, dass IP-10 über die Bindung an den CCR3-Rezeptor entscheidend dazu beiträgt, Leukozyten zum Ort der Inflammation zu leiten, auf diesem Wege die Entzündung aufrecht zu erhalten und das Gewebe zu schädigen. [44] Für verschiedene entzündliche Erkrankungen konnten bereits erhöhte IP-10-Werte nachgewiesen werden, darunter die rheumatoide Arthritis und der systemische Lupus erythematoses. [44]

Unser Ergebnis das IP-10 betreffend ist vereinbar mit dem Ergebnis einer Studie von Vasilyeva et al., welche mithilfe einer Multiplex-Analyse zeigen konnten, dass alle Patienten ihrer nur MC-Patienten enthaltenden Kohorte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Level an IP-10 hatten, unabhängig vom Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem Stadium der Erkrankung. [89] Wir können keine Aussage darüber machen, ob das IP-10 in der vorliegenden Arbeit auch im Vergleich zu gesunden Personen erhöht ist, es scheint bei der Betrachtung aller Ergebnisse jedoch vor allem in der Pathogenese des MC eine wichtige Rolle innezuhaben.

Die Patientenkohorte von Vasilyeva et al. enthielt sowohl juvenile (n = 12) als auch adulte (n = 52) MC-Patienten. Während die Erhöhung des IP-10 bei adulten Patienten bereits vorher bekannt war, konnten Vasilyeva et al. erstmals eine Erhöhung des IP-10 auch bei pädiatrischen Patienten nachweisen. [89] Die Erhöhung des IP-10 führte zu der Annahme,

dass IP-10 die Infiltration der TH1-Zellen erleichtern und somit die intestinale Entzündung aufrechterhalten kann. [89] Während die Erhöhung von IP-10 bei Vasilyeva et al. im Vergleich zu den gesunden Kontrollen sowohl im Schub als auch während der Remission vorhanden war, fanden wir ein signifikant erhöhtes IP-10 beim Vergleich zwischen den beiden Aktivitätsphasen nur im Schub. [89]

Hyun et al. konnten zeigen, dass die Reduktion von IP-10 die Aktivierung von TH1-Zellen beeinträchtigt und die Rekrutierung der TH1-Zellen reduziert. [33] Wir können mit unseren Ergebnissen (wie auch Vasilyeva et al. [89]) die Hypothese unterstützen, dass die Erhöhung von IP-10 die intestinale Infiltration durch TH1-Zellen erleichtern und aufrechterhalten kann. Betont wird diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit vor allem dadurch, dass sich das IP-10 bei einer Unterteilung in die beiden Krankheitsentitäten beim MC signifikant erhöht zeigte, welcher als vor allem durch TH1-Zellen gesteuerte Erkrankung bekannt ist.

Zusätzlich konnten Vasilyeva et al. eine Erhöhung der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α bei allen MC-Patienten und einen Trend zur Erhöhung von IL-8 bei juvenilen MC-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigen, diese Zytokine zeigten bei uns beim Vergleich der beiden Aktivitätsphasen keine Veränderung. Die Zytokine IL-10, IL-12p40, GM-CSF und IFN- μ . waren bei Vasilyeva et al. beim Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe ebenso unverändert wie in unserem Vergleich der Aktivitätsphasen. [89]

Eine Erhöhung des Zytokins IP-10 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe konnten auch Kleiner et. al zeigen. Diese untersuchten in einer Studie unter Zuhilfenahme einer Multiplexanalyse ebenfalls die Zytokinmuster juveniler MC- und CU- Patienten, wobei die Kohorte mit 26 Patienten etwas kleiner war als das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit und lediglich ein Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe ohne Aufteilung in die beiden Krankheitsentitäten vorgenommen wurde. Neben dem IP-10 zeigten sich die Zytokine IL-1 β und IFN- γ bei den CED-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht, diese schienen bei uns im Vergleich der Aktivitätsphasen unverändert. [39] Die Zytokine IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, MCP-1 und MIP-1 α zeigten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen keine Veränderung. [39] Wir fanden bei diesen Zytokinen mit Ausnahme des MIP-1 α beim Vergleich zwischen den Erkrankungsentitäten ebenfalls keine Veränderung, das MIP-1 α zeigte sich jedoch beim MC im Vergleich zur CU signifikant erhöht.

Auch Singh et al., welche eine Kohorte von adulten MC- (n = 24) und CU- (n = 18) Patienten im Schub mit gesunden Kontrollen verglichen, fanden ein erhöhtes IP-10. [80] Im Gegensatz

zu unserer Studie, in welcher wir bei der weiteren Unterteilung in die beiden Krankheitsentitäten MC und CU das IP-10 im Schub lediglich beim MC als signifikant erhöht nachweisen konnten, zeigte sich das IP-10 bei Singh et al. im Vergleich zu den gesunden Kontrollen bei den CU-Patienten erhöht. Zudem konnte Singh et al. eine Erhöhung der Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α sowie des Chemokines MCP-1 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zeigen, diese Zytokine waren bei uns im Vergleich der beiden Krankheitsentitäten alle unauffällig. [80]

Korolkova et al. stellten bei einer zusammenfassenden Literaturrecherche bei PubMed fest, dass innerhalb der gefundenen Ergebnisse zum Thema Zytokine und Chemokine im menschlichen Serum bei CED aus den Jahren 1991 bis 2014 eine Vielzahl an teils auch widersprüchlichen Ergebnissen gefunden werden konnte. [41]

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Differenzen innerhalb der Zytokinmuster der beiden Krankheitsentitäten sowie Aktivitätsphasen festhalten, dass der Vergleich mit vorangegangenen Studien durch verschiedene Faktoren erschwert ist. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen der oben genannten Studien die Zytokinmuster betreffend sind sicher mit dadurch beeinflusst, dass wir ausnahmslos die Zytokinwerte von CED-Patienten bestimmten und keine Kontrollgruppe mit gesunden Personen untersuchten. Daraus erschließt sich, dass keine signifikanten Ergebnisse erhalten werden konnten, falls ein Zytokin bei beiden Entitäten im Vergleich zu gesunden Personen in ähnlichem Rahmen erhöht war, was den Vergleich mit Studien mit gesunden Kontrollgruppen erschwert. Beispielsweise wurden in vielen Studien für beide Krankheitsentitäten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gleichbleibende oder erhöhte Werte für TNF- α , IL-6 und IL-10 gefunden. [41] Es ist also durchaus möglich, dass in der vorliegenden Arbeit diese Zytokine ebenfalls für beide Entitäten erhöht oder gleichbleibend im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe wären, dies aufgrund des Fehlens von gesunden Kontrollen bei der Auswertung aber nicht ersichtlich wurde, da wir im Gegensatz zu den meisten anderen Studien die beiden Entitäten miteinander verglichen.

Ursächlich für die großen Differenzen in der Untersuchung der Biomarker ist möglicherweise auch, dass nur wenige Studien die Biomarker unter Zuhilfenahme einer endoskopischen Untersuchung evaluierten. Diese stellt zwar den Goldstandard dar, ist jedoch invasiv, kostspielig und nicht immer gut verfügbar. [57]

Als weitere mögliche Faktoren für die unterschiedlichen Ergebnisse kommen zudem Unterschiede in den jeweiligen Kohorten, unterschiedliche Aktivitätsphasen, die verwendete Methodik und das jeweilige Fabrikat, die unterschiedliche Aufbewahrung des Serums, die Lokalisation der Entzündung sowie die jeweilige Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme in Betracht. [41]

5.2.2. Korrelation der Zytokine, Calprotectin und CRP mit den Aktivitätsscores sowie der Zytokine mit Calprotectin und CRP

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir zudem die Zusammenhänge zwischen den Zytokinen, den Biomarkern Calprotectin und CRP sowie der Krankheitsaktivität entsprechend der klinischen Aktivitätsscores PCDAI und PUCAI. Ein erweitertes Wissen über die Korrelation der genannten Faktoren kann zu einer besseren Einschätzung der Wertigkeit der einzelnen Komponenten hinsichtlich der diagnostischen und prognostischen Aussage dienen. Auch eine positive Korrelation zwischen den etablierten Entzündungsparametern Calprotectin oder CRP und den neuen Biomarkern könnte das frühere Erkennen einer Exazerbation ermöglichen.

Viele Studien bisher verglichen sowohl die Biomarker Calprotectin und CRP mit der Krankheitsaktivität entsprechend der klinischen Scores PCDAI und PUCAI als auch die beiden Biomarker untereinander. Zusammenhänge zwischen den Zytokinprofilen von CED-Patienten und den Aktivitätsscores wurden unseres Wissens bisher nicht ausreichend untersucht.

So untersuchten beispielsweise Dolinsek et al. die Zusammenhänge zwischen den beiden herkömmlichen Biomarkern Calprotectin und CRP und den beiden klinischen Scores PCDAI und PUCAI. Hierbei korrelierte der PUCAI stärker mit dem Calprotectin als mit dem CRP, wohingegen der PCDAI stärker mit dem CRP als mit dem Calprotectin korrelierte. [15]

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch weitere Studien, so konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass das CRP sowohl mit der Krankheitsaktivität des MC als auch mit der CU korreliert, diese Korrelation beim MC jedoch stärker ausgeprägt war. [42][84][25] Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass der MC aufgrund des transmuralen Befalls eine höhere Auswirkung auf die systemische Entzündungsreaktion hat, während die Reaktion bei der CU mehr auf den GIT begrenzt ist, da diese lediglich Mukosa und Submukosa betrifft. [25]

Im Gegensatz zu oben genannten Ergebnissen zeigte sich bei uns überraschenderweise kein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität entsprechend des PCDAI und dem CRP, jedoch fanden wir einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem CRP und dem PUCAI. Zudem konnten wir im Gegensatz zu vielen vorangegangenen Studien keine Korrelation zwischen Calprotectin und den klinischen Scores nachweisen.

Diese Differenzen sind möglicherweise mit darin begründet, dass die klinischen Symptome der CED nicht immer im Einklang mit dem Grad der intestinalen Inflammation stehen, was besonders bei milder bis moderater CU und/oder distalem Befallsmuster der Fall zu sein scheint. [42]

Jones et al. konnten zeigen, dass der bei adulten MC-Patienten analog zum PCDAI bei pädiatrischen Patienten verwendete Crohn's Disease Activity Index (CDAI) sehr schlecht mit der endoskopischen Entzündungsaktivität korreliert. [35] Da wir aufgrund der fehlenden endoskopischen Untersuchung keine Aussage über die histologischen und makroskopischen intestinalen Läsionen unserer Patienten zum Zeitpunkt der jeweiligen Blutentnahmen machen können, ist es möglich, dass die Entzündungsmarker und Zytokine im Zusammenhang mit der intestinalen Inflammation stehen, bei uns aber als solches nicht zu erkennen waren, da wir zum Vergleich lediglich die klinischen Scores als Maß für die Entzündungsaktivität verwenden konnten.

Die Zusammenhänge zwischen den Zytokinprofilen und den Aktivitätsscores wurden unseres Wissens bisher nur wenig untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Korrelationen der Zytokine IL-8 und G-CSF mit dem PUCAI kann folgenden Studien den Vergleich erleichtern.

IL-8 ist ein proinflammatorisch wirksames Zytokin, welches zur CXC-Familie der Chemokine gehört und deshalb auch als CXCL8 bezeichnet wird. Es wird von verschiedenen Zellen sezerniert, darunter Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten. [22] Die Produktion wird durch verschiedene Zytokine stimuliert, beispielsweise durch IL-6 und TNF- α , in unstimulierten Zellen ist das IL-8 nahezu nicht nachweisbar. [22]

Vasilyeva et al. fanden eine statistisch signifikante Erhöhung des Zytokins IL-8 bei pädiatrischen CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, bei adulten Patienten konnten sie diese Erhöhung hingegen nicht zeigen. Aus diesem Ergebnis ergab sich die

Überlegung, ob das erhöhte IL-8 bei den juvenilen Patienten ein Hinweis auf eine ausgeprägtere systemische Entzündung im Gegensatz zu einer mehr auf den Darm begrenzten Entzündungsreaktion bei adulten Patienten ist. [89]

Da unsere Patientenkohorte keine adulten Patienten enthielt, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Unser Ergebnis kann jedoch die Hypothese unterstützen, dass bei pädiatrischen CED-Patienten das IL-8 eine wichtige Rolle spielt. Die Betonung liegt bei uns mit der Korrelation zwischen dem PUCAI und IL-8 dabei vor allem auf den CU-Patienten. Da keine endoskopischen Befunde zum Zeitpunkt der jeweiligen Blutentnahme vorliegen, ist diese Aussage jedoch auf die klinischen Befunde begrenzt.

Der PUCAI korrelierte zudem signifikant mit dem G-CSF, welches als einziges der gemessenen Zytokine nur in 80,7 % der Blutproben nachgewiesen werden konnte, wodurch die Fallzahl im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen reduziert war. Es konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen der Nachweisrate und den anderen erhobenen Faktoren gezeigt werden, sodass die Messwerte trotz reduzierter Fallzahl als valide zu betrachten sind. Das G-CSF ist ein Glykoprotein, welches zu den Wachstumsfaktoren gezählt wird. Die Produktion von G-CSF wird vor allem durch Infektionen und Gewebeschädigung stimuliert. [97] Es ist unter anderem für die Förderung der Differenzierung und Proliferation der neutrophilen Granulozyten zuständig. [37]

Martinez-Fierro et al. verglichen die Zytokinprofile adulter CED-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe. Sie konnten zeigen, dass CED-Patienten, bei welchen endoskopisch eine entzündliche Aktivität zu erkennen war, im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe erhöhte G-CSF-Werte aufwiesen. [51]

In der vorliegenden Arbeit konnten wir das G-CSF betreffend feststellen, dass es nicht nur mit dem PUCAI, sondern auch mit dem CRP korreliert.

Wenige Studien verglichen bisher die Zytokinmuster von CED-Patienten mit dem fäkalen Calprotectin und dem CRP. In der vorliegenden Studie korrelierte keines der gemessenen Zytokine statistisch signifikant mit dem fäkalen Calprotectin. Das CRP hingegen korrelierte sowohl mit dem IL-6 als auch mit dem G-CSF statistisch signifikant. Die beiden Biomarker CRP und Calprotectin selbst korrelierten untereinander hoch signifikant.

Unser Ergebnis der Korrelation zwischen dem IL-6 und dem CRP ist vergleichbar mit vielen vorangegangenen Studien und kann den beobachteten Zusammenhang unterstützen. IL-6 wird

zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt und ist an der Einleitung einer Entzündungsreaktion beteiligt. Es ist allgemein anerkannt, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen spielt. [61] Mitsuyama et al. konnten bereits 1991 eine positive Korrelation zwischen IL-6 und CRP bei CED-Patienten nachweisen. [56] Dies liegt sicher mit darin begründet, dass IL-6 während der akuten Phase die Hepatozyten zur Produktion der Akute-Phase-Proteine CRP, Fibrinogen, α 1-Antitrypsin und Serum Amyloid A stimuliert. [63] Allerdings wurde nachgewiesen, dass IL-6 verglichen mit dem CRP eine höhere Sensitivität die Entzündungsaktivität der CED betreffend hat. [61] Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass der humane Antikörper Tocilizumab gegen den IL-6-Rezeptor die Krankheitsaktivität beim MC reduziert. [63] Bourgonje et al. konnten zudem einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem fäkalen Calprotectin und sowohl dem CRP als auch dem IL-6 zeigen. [9] Insgesamt betrachtet scheint IL-6 ein möglicher zusätzlicher Marker für die Entzündungsaktivität bei CED-Patienten und zudem ein vielversprechende Therapieansatzpunkt zu sein.

An vergleichbarer Literatur zu der Korrelation zwischen dem Wachstumsfaktor G-CSF und dem CRP im Rahmen einer CED konnte nur wenig gefunden werden. Es ist jedoch bekannt, dass G-CSF zu einer Erhöhung des Zytokins IL-6 führt, was in Zusammenhang mit der oben beschriebenen Korrelation zwischen IL-6 und CRP zu der Hypothese führte, dass ein erhöhtes G-CSF folglich auch mit einem erhöhten CRP einhergeht. [86] Da bei uns sowohl das G-CSF als auch das CRP mit dem PUCAI signifikant korrelierten, ist ein Zusammenhang durchaus denkbar. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Erhöhung des CRP nicht nur Folge des durch G-CSF erhöhten IL-6 ist, sondern dass auch andere Einflussfaktoren mit verantwortlich sind.

In der Zusammenschau der oben genannten Ergebnisse lässt sich sagen, dass wir Korrelationen zwischen den Zytokinprofilen und den Aktivitätsscores sowie zwischen den Zytokinprofilen und dem etablierten Biomarker CRP nachweisen konnten. In weiteren Studien sollten die Korrelation mit den endoskopischen Befunden abgeglichen werden.

5.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei pädiatrischen CED-Patienten Unterschiede im Zytokinprofil sowohl zwischen den beiden Krankheitsentitäten MC und CU (MIP-1 α , MCP-3) als auch zwischen den beiden Aktivitätsphasen Remission und Schub (IP-10) bestehen. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass Zusammenhänge zwischen den Zytokinmustern und dem klinischen Aktivitätsscore PUCAI (IL-8) bestehen. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass positive Korrelationen zwischen dem Zytokinprofil und dem Entzündungsmarker CRP (IL-6, G-CSF) bestehen.

Da wir im Gegensatz zu den meisten vorangegangenen Studien die beiden Entitäten miteinander verglichen und dies insbesondere innerhalb der Pädiatrie unseres Wissens noch nicht ausreichend untersucht wurde, können unsere Ergebnisse nachfolgende, vergleichende Studien vereinfachen und somit auf Dauer möglicherweise zur besseren Unterscheidung zwischen dem MC und der CU in der Diagnostik und folglich zum früheren Einleiten der richtigen Therapie beitragen.

Die Hauptlimitation der Ergebnisse ist sicher der fehlende Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe sowie der Vergleich mit der endoskopisch festgestellten histologischen und makroskopischen Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der jeweiligen Blutentnahme.

Des Weiteren ist mit Werten, welche im Blut gemessen werden, primär eine Aussage über die systemische Immunantwort möglich, sie spiegeln jedoch nicht die exakten und vor allem nicht ausschließlich die intestinalen Reaktionen wider. [83]

Zu beachten ist auch, dass nicht alle Einflussfaktoren auf die Zytokinmuster berücksichtigt werden konnten. Beispielsweise konnten Rolandsdotter et al. zeigen, dass die exklusive enterale Ernährung Einfluss auf das Zytokinmuster individueller neu diagnostizierter juveniler CED-Patienten hat, ein Trend war hierbei jedoch nicht erkennbar. [74]

Wine et al. konnten zeigen, dass eine Erhöhung des IL-6 ein Ausbleiben der Antwort auf eine Therapie mit intravenösen Kortikosteroiden und somit den Bedarf einer Zweitlinien-Therapie vorhersagen kann, sodass auch ein Zusammenhang zwischen der Therapie mit Kortikosteroiden und dem Zytokinmuster vorhanden zu sein scheint. [95]

Faktoren wie die Einnahme von Vitamin D und Protonenpumpeninhibitoren, die Dauer der Erkrankung eines jeden Patienten sowie die Paris-Klassifikation zum Zeitpunkt der Sicherung der Diagnose wurden erfasst, aber nicht als Kovarianzen ausgewertet, da für eine Subgruppenanalyse dieser Art eine größere Patientenkohorte vonnöten ist.

Weitere Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung der Zytokinspiegel im Verlauf beider Krankheitsentitäten sowie Aktivitätsphasen erscheinen sowohl bei pädiatrischen als auch bei adulten Patienten vor allem unter dem Aspekt der verbesserten Diagnostik, Verlaufsbeurteilung sowie schonender Therapie notwendig. Folgende Studien sollten dabei neben der Betrachtung einer größeren Patientenkohorte eine gesunde Kontrollgruppe sowie eine endoskopische Untersuchung zum Zeitpunkt der Blutentnahme enthalten, um auch die Zusammenhänge zwischen dem Zytokinprofil und dem Vorhandensein von histologischen und makroskopischen Läsionen sowie der Lokalisation der intestinalen Entzündung erkennen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Afzali A, Wahbeh G (2017) Transition of pediatric to adult care in inflammatory bowel disease. Is it as easy as 1, 2, 3? *World J Gastroenterol* 23(20):3624–3631. doi:10.3748/wjg.v23.i20.3624
2. Ahmed I, Roy BC, Khan SA, Septer S, Umar S (2016) Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms* 4(2). doi:10.3390/microorganisms4020020
3. Ansorge S, Täger M (2014) Immunologie. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G (Hrsg) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl. Springer, Berlin, S 893–930
4. Balkwill FR, Burke F (1989) The cytokine network. *Immunology Today* 10(9):299–304. doi:10.1016/0167-5699(89)90085-6
5. Baumgart DC (2009) The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 106(8):123–133. doi:10.3238/arztebl.2009.0123
6. Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, Rabeneck L, Mack DR, Brill H, Howard J, Guan J, To T (2009) Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut* 58(11):1490–1497. doi:10.1136/gut.2009.188383
7. Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, Mumford R (2014) Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res* 186:20–31. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007
8. Borish LC, Steinke JW (2003) 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(2):S460-S475. doi:10.1067/mai.2003.108
9. Bourgonje AR, Martels JZH von, Vos P de, Faber KN, Dijkstra G (2018) Increased fecal calprotectin levels in Crohn's disease correlate with elevated serum Th1- and Th17-associated cytokines. *PLoS ONE* 13(2):e0193202. doi:10.1371/journal.pone.0193202
10. Buderus S, Scholz D, Behrens R, Classen M, Laffolie J de, Keller K-M, Zimmer K-P, Koletzko S (2015) Inflammatory bowel disease in pediatric patients: Characteristics of newly diagnosed patients from the CEDATA-GPGE Registry. *Dtsch Arztebl Int* 112(8):121–127. doi:10.3238/arztebl.2015.0121

11. Däbritz J, Gerner P, Enninger A, Claßen M, Radke M (2017) Inflammatory Bowel Disease in Childhood and Adolescence. *Dtsch Arztebl Int* 114(19):331–338. doi:10.3238/arztebl.2017.0331
12. Day AS, Ledder O, Leach ST, Lemberg DA (2012) Crohn's and colitis in children and adolescents. *World J Gastroenterol* 18(41):5862–5869. doi:10.3748/wjg.v18.i41.5862
13. Degraeuwe PLJ, Beld MPA, Ashorn M, Canani RB, Day AS, Diamanti A, Fagerberg UL, Henderson P, Kolho K-L, van de Vijver E, van Rheezen PF, Wilson DC, Kessels AGH (2015) Faecal calprotectin in suspected paediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 60(3):339–346. doi:10.1097/MPG.0000000000000615
14. Deutzmann R (2016) Zytokine. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R (Hrsg) *Duale Reihe Biochemie*, 4. Aufl. Georg Thieme Verlag
15. Dolinsek J, Riznik P, Sabath L, Micetic-Turk D (2016) Fecal calprotectin as a marker of the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Wien Klin Wochenschr* 128(7-8):253–259. doi:10.1007/s00508-015-0915-3
16. Ebert EC, Wright SH, Lipshutz WH, Hauptman SP (1984) T-cell abnormalities in inflammatory bowel disease are mediated by interleukin 2. *Clinical Immunology and Immunopathology* 33(2):232–244. doi:10.1016/0090-1229(84)90078-3
17. Engelmann G, Wirth S, Dockter G (2018) Erkrankungen des Darms. In: Gortner L, Meyer S (Hrsg) *Duale Reihe Pädiatrie*, 5. Aufl. Georg Thieme Verlag, S 265–291
18. Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H (1992) The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 29(3-4):307–341. doi:10.3109/10408369209114604
19. Fujitake Y, Ohtsuka Y, Ikuse T, Ohtani K, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Ishii M, Shimizu T (2013) Analysis of inflammatory signals in Japanese children with Crohn's disease. *Pediatr Int* 55(6):753–756. doi:10.1111/ped.12159
20. Gisbert JP, McNicholl AG, Gomollon F (2009) Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 15(11):1746–1754. doi:10.1002/ibd.20920

21. Guariso G, Gasparetto M, Visona Dalla Pozza L, D'Inca R, Zancan L, Sturniolo G, Brotto F, Facchin P (2010) Inflammatory bowel disease developing in paediatric and adult age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51(6):698–707. doi:10.1097/MPG.0b013e3181da1db8
22. Ha H, Debnath B, Neamati N (2017) Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* 7(6):1543–1588. doi:10.7150/thno.15625
23. Hamerlinck FF (1999) Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 8(3):167–176. doi:10.1111/j.1600-0625.1999.tb00367.x
24. Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2014) Mediatoren. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G (Hrsg) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Aufl. Springer, Berlin, S 407–410
25. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, Moum B (2008) C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. *Gut* 57(11):1518–1523. doi:10.1136/gut.2007.146357
26. Hoekman DR, Diederens K, Koot BGP, Tabbers MM, Kindermann A, Benninga MA (2016) Relationship of clinical symptoms with biomarkers of inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. *Eur J Pediatr* 175(10):1335–1342. doi:10.1007/s00431-016-2762-2
27. Horn F, Moc I (2015) Grundlagen der Chemie // Biochemie des Menschen. In: Horn F (Hrsg) *Biochemie des Menschen*, 6. Aufl. Georg Thieme Verlag, S 621–648
28. Houser B (2012) Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem* 118(4):192–196. doi:10.3109/13813455.2012.705301
29. Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H (1984) Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 160(1):310–316. doi:10.1084/jem.160.1.310
30. Hughes CE, Nibbs RJB (2018) A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* 285(16):2944–2971. doi:10.1111/febs.14466
31. Hunecke A (2013) Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut reifer Neugeborener nach primärer Sectio caesarea im Vergleich zur Spontangeburt. Dissertation, Universität des Saarlandes

32. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT, Michener WM, Levy JS, Lesser ML (1991) Development and Validation of a Pediatric Crohn's Disease Activity Index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 12(4):439–447
33. Hyun JG, Lee G, Brown JB, Grimm GR, Tang Y, Mittal N, Dirisina R, Zhang Z, Fryer JP, Weinstock JV, Luster AD, Barrett TA (2005) Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice. *Inflammatory Bowel Diseases* 11(9):799–805. doi:10.1097/01.mib.0000178263.34099.89
34. Jakobsen C, Paerregaard A, Munkholm P, Wewer V (2013) Environmental factors and risk of developing paediatric inflammatory bowel disease – a population based study 2007-2009. *J Crohns Colitis* 7(1):79–88. doi:10.1016/j.crohns.2012.05.024
35. Jones J, Loftus EV, Panaccione R, Chen L-S, Peterson S, McConnell J, Baudhuin L, Hanson K, Feagan BG, Harmsen SW, Zinsmeister AR, Helou E, Sandborn WJ (2008) Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6(11):1218–1224. doi:10.1016/j.cgh.2008.06.010
36. Jong NSH de, Leach ST, Day AS (2006) Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 12(7):566–572. doi:10.1097/01.ibd.0000227626.72271.91
37. Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, Miyashita T, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M (2012) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. *PLoS ONE* 7(11):e50391. doi:10.1371/journal.pone.0050391
38. Kaistha A, Levine J (2014) Inflammatory bowel disease. The classic gastrointestinal autoimmune disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 44(11):328–334. doi:10.1016/j.cppeds.2014.10.003
39. Kleiner G, Zanin V, Monasta L, Crovella S, Caruso L, Milani D, Marcuzzi A (2015) Pediatric patients with inflammatory bowel disease exhibit increased serum levels of proinflammatory cytokines and chemokines, but decreased circulating levels of macrophage inhibitory protein-1beta, interleukin-2 and interleukin-17. *Exp Ther Med* 9(6):2047–2052. doi:10.3892/etm.2015.2370

40. Komraus M, Wos H, Wiecek S, Kajor M, Grzybowska-Chlebowczyk U (2012) Usefulness of faecal calprotectin measurement in children with various types of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm* 2012:608249. doi:10.1155/2012/608249
41. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE (2015) Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin Med Insights Gastroenterol* 8:29–44. doi:10.4137/CGast.S20612
42. Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, Bokemeyer B, Esters P, Herrlinger K, Kannengießer K, Kienle P, Langhorst J, Lügering A, Schreiber S, Stallmach A, Stein J, Sturm A, Teich N, Siegmund B (2018) Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol* 56(9):1087–1169. doi:10.1055/a-0651-8174
43. Kupcova Skalnikova H, Cizkova J, Cervenka J, Vodicka P (2017) Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *Int J Mol Sci* 18(12):2697. doi:10.3390/ijms18122697
44. Lee EY, Lee Z-H, Song YW (2009) CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 8(5):379–383. doi:10.1016/j.autrev.2008.12.002
45. Leipe J, Skapenko A, Schulze-Koops H (2009) Th17-Zellen - eine neue proinflammatorische T-Zell-Population und ihre Bedeutung für rheumatologische Autoimmunerkrankungen. *Z Rheumatol* 68(5):405–408. doi:10.1007/s00393-009-0473-z
46. Lewis JD (2011) The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140(6):1817-1826.e2. doi:10.1053/j.gastro.2010.11.058
47. Lindner U, Tutdibi E, Binot S, Monz D, Hilgendorff A, Gortner L (2013) Levels of cytokines in umbilical cord blood in small for gestational age preterm infants. *Klin Padiatr* 225(2):70–74. doi:10.1055/s-0033-1334879
48. Liu Y, Cai Y, Liu L, Wu Y, Xiong X (2018) Crucial biological functions of CCL7 in cancer. *PeerJ* 6:e4928. doi:10.7717/peerj.4928
49. Luminex Assays and Instruments. <https://resources.rndsystems.com/images/site/rnd-systems-luminex-br2.pdf>. Zugegriffen: 04. Juli 2017

50. Marcuzzi E, Angioni R, Molon B, Cali B (2019) Chemokines and Chemokine Receptors: Orchestrating Tumor Metastasis. *Int J Mol Sci* 20(96). doi:10.3390/ijms20010096
51. Martinez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Rocha-Pizaña MR, Cardenas-Vargas E, Cid-Baez MA, Trejo-Vazquez F, Flores-Morales V, Villela-Ramirez GA, Delgado-Enciso I, Rodriguez-Sanchez IP, Ortiz-Castro Y (2019) Serum cytokine, chemokine, and growth factor profiles and their modulation in inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)* 98(38):e17208. doi:10.1097/MD.00000000000017208
52. Masoodi I, Tijjani BM, Wani H, Hassan NS, Khan AB, Hussain S (2011) Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review. *Ger Med Sci* 9:Doc03. doi:10.3205/000126
53. Maurer M, Stebut E von (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36(10):1882–1886. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.019
54. Menten P, Wuyts A, van Damme J (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(6):455–481. doi:10.1016/s1359-6101(02)00045-x
55. MILLIPLEX MAP Kit. Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 96 Well Plate Assay. <https://filgen.jp/Product/Bioscience19-Bioplex/HCYTOMAG-60K.MPX.pdf>. Zugegriffen: 12. Februar 2020
56. Mitsuyama K, Sata M, Tanikawa K (1991) Significance of interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Jpn* 26(1):20–28. doi:10.1007/bf02779504
57. Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, Sandborn WJ, Feagan BG (2015) C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 110(6):802-819. doi:10.1038/ajg.2015.120
58. Nancey S, Boschetti G, Moussata D, Cotte E, Peyras J, Cuerq C, Haybrard J, Charlois A-L, Mialon A, Chauvenet M, Stroeymeyt K, Kaiserlian D, Drai J, Flourie B (2013) Neopterin is a novel reliable fecal marker as accurate as calprotectin for predicting endoscopic disease activity in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 19(5):1043–1052. doi:10.1097/MIB.0b013e3182807577

59. Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH (2017) Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus* 9(4):e1177. doi:10.7759/cureus.1177
60. Neurath MF (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 14(5):329–342. doi:10.1038/nri3661
61. Neurath MF, Finotto S (2011) IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(2):83–89. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.02.003
62. Ni J, Wu GD, Albenberg L, Tomov VT (2017) Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14(10):573–584. doi:10.1038/nrgastro.2017.88
63. Nishimoto N, Kishimoto T (2006) Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(11):619–626. doi:10.1038/ncprheum0338
64. Olén O, Askling J, Sachs MC, Frumento P, Neovius M, Smedby KE, Ekbom A, Malmberg P, Ludvigsson JF (2017) Childhood onset inflammatory bowel disease and risk of cancer: a Swedish nationwide cohort study 1964-2014. *BMJ* 358:j3951. doi:10.1136/bmj.j3951
65. Oliveira SB, Monteiro IM (2017) Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *BMJ* 357:j2083. doi:10.1136/bmj.j2083
66. Pak S, Holland N, Garnett EA, Mileti E, Mahadevan U, Beckert R, Kanwar B, Heyman MB (2012) Cytokine profiles in peripheral blood of children and adults with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54(6):769–775. doi:10.1097/MPG.0b013e3182455bb3
67. Palmqvist C, Wardlaw AJ, Bradding P (2007) Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol* 151(6):725–736. doi:10.1038/sj.bjp.0707263
68. Pender SL-F, Chance V, Whiting CV, Buckley M, Edwards M, Pettipher R, MacDonald TT (2005) Systemic administration of the chemokine macrophage inflammatory protein 1alpha exacerbates inflammatory bowel disease in a mouse model. *Gut* 54(8):1114–1120. doi:10.1136/gut.2004.052779
69. Pérez-Jeldres T, Tyler CJ, Boyer JD, Karuppuchamy T, Bamias G, Dulai PS, Boland BS, Sandborn WJ, Patel DR, Rivera-Nieves J (2019) Cell Trafficking Interference in

Inflammatory Bowel Disease: Therapeutic Interventions Based on Basic Pathogenesis Concepts. *Inflammatory Bowel Diseases* 25(2):270–282. doi:10.1093/ibd/izy269

70. Preiss JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignass A, Hauser W, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC (2014) Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014. *Z Gastroenterol* 52(12):1431–1484. doi:10.1055/s-0034-1385199

71. Prieto GA, Cotman CW (2017) Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 34:27–33. doi:10.1016/j.cytogfr.2017.03.005

72. Radke L, López-Hemmerling D, Lubitz A, Giese C, Franz-Xaver Wildenauer F-X, Frohme M (2010) Etablierung verschiedener Bead-basierter Multiplexmethoden mit einem Suspensions Array-System für molekular diagnostische Zwecke. *Wissenschaftliche Beiträge* 2009/2010 14:6–12. doi:10.15771/0949-8214_2010_1_1

73. RKI (2004) Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis. Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin". *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47(1):73–79. doi:10.1007/s00103-003-0758-3

74. Rolandsdotter H, Jönsson-Videsäter K, L Fagerberg U, Finkel Y, Eberhardson M (2019) Exclusive Enteral Nutrition: Clinical Effects and Changes in Mucosal Cytokine Profile in Pediatric New Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* 11(2):414. doi:10.3390/nu11020414

75. Roon AC von, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, Paraskeva P, Tekkis PP (2007) Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol* 102(4):803–813. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01126.x

76. Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA (2015) Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *JAMA Pediatr* 169(11):1053–1060. doi:10.1001/jamapediatrics.2015.1982

77. Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL et al (2014) Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 8(10):1179–1207. doi:10.1016/j.crohns.2014.04.005

78. Sallusto F, Zielinski CE, Lanzavecchia A (2012) Human Th17 subsets. *Eur J Immunol* 42(9):2215–2220. doi:10.1002/eji.201242741
79. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Safroneeva E, Romero Y, Armstrong D, Schmidt C, Trummler M, Pittet V, Vavricka SR (2013) Fecal calprotectin more accurately reflects endoscopic activity of ulcerative colitis than the Lichtiger Index, C-reactive protein, platelets, hemoglobin, and blood leukocytes. *Inflammatory Bowel Diseases* 19(2):332–341. doi:10.1097/MIB.0b013e3182810066
80. Singh UP, Singh NP, Murphy EA, Price RL, Fayad R, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2016) Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine* 77:44–49. doi:10.1016/j.cyto.2015.10.008
81. Stenken JA, Poschenrieder AJ (2015) Bioanalytical chemistry of cytokines-A Review. *Anal Chim Acta* 853:95–115. doi:10.1016/j.aca.2014.10.009
82. Stone MJ (2017) Regulation of Chemokine-Receptor Interactions and Functions. *Int J Mol Sci* 18(11). doi:10.3390/ijms18112415
83. Toptygina AP, Semikina EL, Bobyleva GV, Miroshkina LV, Petrichuk SV (2014) Cytokine profile in children with inflammatory bowel disease. *Biochemistry Mosc* 79(12):1371–1375. doi:10.1134/S0006297914120116
84. Tsampalieros A, Griffiths AM, Barrowman N, Mack DR (2011) Use of C-reactive protein in children with newly diagnosed inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 159(2):340–342. doi:10.1016/j.jpeds.2011.04.028
85. Turner D, Hyams J, Markowitz J, Lerer T, Mack DR, Evans J, Pfefferkorn M, Rosh J, Kay M, Crandall W, Keljo D, Otley AR, Kugathasan S, Carvalho R, Oliva-Hemker M, Langton C, Mamula P, Bousvaros A, LeLeiko N, Griffiths AM (2009) Appraisal of the pediatric ulcerative colitis activity index (PUCAI). *Inflammatory Bowel Diseases* 15(8):1218–1223. doi:10.1002/ibd.20867
86. Tvedt THA, Melve GK, Tsykunova G, Ahmed AB, Brenner AK, Bruserud Ø (2018) Immunological Heterogeneity of Healthy Peripheral Blood Stem Cell Donors-Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Inflammatory Responses. *Int J Mol Sci* 19(10):2886. doi:10.3390/ijms19102886
87. Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, Baggiolini M (1999) Increased Expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in Ulcerative

Colitis. *The American Journal of Pathology* 155(2):331–336. doi:10.1016/S0002-9440(10)65128-0

88. van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G (1992) Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 176(1):59–65. doi:10.1084/jem.176.1.59

89. Vasilyeva E, Abdulkhakov S, Cherepnev G, Martynova E, Mayanskaya I, Valeeva A, Abdulkhakov R, Safina D, Khaiboullina S, Rizvanov A (2016) Serum Cytokine Profiles in Children with Crohn's Disease. *Mediators Inflamm* 2016:7420127. doi:10.1155/2016/7420127

90. Vernon-Roberts A, Lopez RN, Frampton C, Gearry RB, Lemberg DA, Day AS (2019) A Symptom Self-report Tool for Children With Inflammatory Bowel Disease (IBDnow). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 69(1):e7-e12. doi:10.1097/MPG.0000000000002329

91. Vignali DAA (2000) Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 243(1):243–255. doi:10.1016/S0022-1759(00)00238-6

92. Vindigni SM, Zisman TL, Suskind DL, Damman CJ (2016) The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. *Therap Adv Gastroenterol* 9(4):606–625. doi:10.1177/1756283X16644242

93. Vrabie R, Kane S (2014) Noninvasive Markers of Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 10(9):576–584

94. Wedemeyer J, Lorentz A, Göke M, Meier PN, Flemming P, Dahinden CA, Manns MP, Bischoff SC (1999) Enhanced production of monocyte chemotactic protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. *Gut* 44(5):629–635. doi:10.1136/gut.44.5.629

95. Wine E, Mack DR, Hyams J, Otley AR, Markowitz J, Crandall WV, LeLeiko N, Muise AM, Griffiths AM, Turner D (2013) Interleukin-6 is associated with steroid resistance and reflects disease activity in severe pediatric ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 7(11):916–922. doi:10.1016/j.crohns.2012.12.012

96. Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A (1988) Macrophages secrete a novel heparin-binding protein

with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167(2):570–581.
doi:10.1084/jem.167.2.570

97. Wright CR, Ward AC, Russell AP (2017) Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Potential Application for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Mediators Inflamm* 2017:7517350. doi:10.1155/2017/7517350

98. Xu GG, Guo J, Wu Y (2014) Chemokine receptor CCR5 antagonist maraviroc: medicinal chemistry and clinical applications. *Curr Top Med Chem* 14(13):1504–1514. doi:10.2174/1568026614666140827143745

99. Yu YR, Rodriguez JR (2017) Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg* 26(6):349–355. doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003

100. Zhang J-M, An J (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45(2):27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle allen, die mir bei der Verwirklichung der vorliegenden Dissertation zur Seite gestanden haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Ludwig Gortner bedanken, der die Anregung zur vorliegenden Dissertation gab und stets ein offenes Ohr für Fragen und Anliegen hatte. Durch die Möglichkeit, ihn in zahlreichen Sprechstunden zu begleiten, konnte ich über die Dissertation hinaus vieles auf meinen medizinischen Weg mitnehmen. Ich bedauere sehr, dass er die Fertigstellung der Dissertation nicht mehr erleben konnte.

Herrn Professor Dr. med. Michael Zemlin möchte ich sehr herzlich insbesondere für die spontane Übernahme der Dissertation und seine weitere tatkräftige, immer zeitnahe und verlässliche Unterstützung danken, die sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Erol Tutdibi, der mich mit seiner außerordentlichen Motivation und stets ausgesprochen zügigen und geduldigen Beantwortung jeglicher Fragen bei meiner Dissertation zu jeder Zeit in der bestmöglichen Art und Weise begleitete und betreute.

Danke sagen möchte ich auch dem Team der Kinderklinik und des Labors, wobei insbesondere Ellen Maurer und Dr. Sybelle Goedicke-Fritz mir nicht nur fachlich stets mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern darüber hinaus mit ihrem herzlichen Arbeitsklima und ihrer moralischen Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Freunden gebührt ein großer Dank fürs Korrigieren, Ermutigen und die Ablenkung, die sie mir gegeben haben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich zu jeder Zeit bekräftigend und liebevoll auf meinem Weg begleitet haben und mir auch im Rahmen dieser Arbeit stets mit Zuversicht zur Seite standen.

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.