

Universitätsklinik Ulm, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

**Bedeutung genetischer Veränderungen im NOD2-Gen bei  
pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit chronisch  
entzündlichen Darmerkrankungen für Krankheitsaktivität,  
Knochendichte und Therapie**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der medizinischen  
Fakultät der Universität Ulm

Verfasserin: Veronika Pfalzer

Geburtsort: Stuttgart

Jahr der Vorlage im Promotionssekretariat: 2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

2. Berichterstatter: PD Dr. Georg von Boyen

Tag der Promotion: 15.06.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	III
<b>1. Einleitung</b>	1
<a href="#">1.1 Morbus Crohn</a>	1
<a href="#">1.2 Colitis Ulcerosa</a>	2
<a href="#">1.3 Extraintestinale Manifestationen und Folgeerkrankungen</a>	3
<a href="#">1.4 Pathogenese</a>	3
<a href="#">1.5 Verminderte Knochendichte</a>	8
<a href="#">1.6 Fragestellung</a>	9
<b>2. Material und Methoden</b>	11
<a href="#">2.1 Patienten</a>	11
<a href="#">2.2 Knochendichtemessung</a>	11
<a href="#">2.3 Genanalyse</a>	12
<a href="#">2.4 Erhebung der Körpermaße</a>	12
<a href="#">2.5 Beurteilung der Krankheitsaktivität</a>	12
<a href="#">2.6 Datenauswertung</a>	17
<a href="#">2.7 Ethikantrag</a>	17
<b>3. Ergebnisse</b>	18
<a href="#">3.1 Pädiatrische Patienten</a>	18
<a href="#">3.1.1 MC-Patienten</a>	18
<a href="#">3.1.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten</a>	25
<a href="#">3.2 Erwachsene Patienten</a>	27
<a href="#">3.2.1 MC-Patienten</a>	27
<a href="#">3.2.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten</a>	32
<b>4. Diskussion</b>	34
<a href="#">4.1 Pädiatrische Patienten</a>	34
<a href="#">4.1.1 MC-Patienten</a>	34
<a href="#">4.1.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten</a>	40
<a href="#">4.2 Erwachsene Patienten</a>	41
<a href="#">4.2.1 MC-Patienten</a>	41
<a href="#">4.2.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten</a>	43

<a href="#">4.3 Schlussfolgerungen</a>	44
<b>5. Zusammenfassung</b>	46
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	48
<b>Danksagung</b>	54
<b>Lebenslauf</b>	55

## Abkürzungsverzeichnis

AZ	Allgemeinzustand
Aza	Azathioprin
bp	Basenpaare
BMI	body mass index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CARDs	N-terminale Caspaserekrutierungsdomänen
CD4+	Cluster of differentiation 4 positiv
CDAI	Crohn's disease activity index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
DEXA	Dual energy x-ray absorptiometry
DNA	Desoxyribonuclein acid
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIM	Extraintestinale Manifestationen
GIT	Gastrointestinaltrakt
Hk	Hämatokrit
HSTL	hepatosplenisches T-Zell Lymphom
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura
LRRs	Leucin-rich repeat Domänen
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MC	Morbus Crohn
MTX	Methotrexat
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NOD2	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2
NOD2wt	NOD2-Wildtyp
OP	Operation
P.	Perzentile

PCDAI	Padiatric Crohn's disease activity index
PCR	Polymerase chain reaction
PRRs	Pattern recognition receptors
PUCAI	Padiatric ulcerative colitis activity index
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
SD	Standard Deviation
SNPs	single nucleotid polymorphismen
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
Th	T-Helferzelle
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
UCAI	Ulcerative colitis activity index
WHO	World Health Organisation

## 1. Einleitung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden in die zwei Hauptformen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) eingeteilt. In Deutschland sind über 300 000 Menschen an CED erkrankt, jeder Fünfte davon ist ein Kind oder Jugendlicher [7].

Beide Erkrankungen haben als Leitsymptome Bauchschmerzen und Durchfall. Da diese Symptome aber unspezifisch sind und natürlich auch bei vielen anderen Krankheiten auftreten (z.B. lymphozytäre Kolitis, eosinophile Kolitis, infektiöse Kolitis, Reizdarmsyndrom), ist es wichtig die Diagnose einer CED klinisch, histopathologisch, radiologisch und endoskopisch zu sichern.

Trotz ihrer Gemeinsamkeiten manifestieren sich MC und CU unterschiedlich, so dass bei den meisten Patienten eine klare Diagnose gestellt werden kann. Aber es gibt auch Fälle einer Dickdarmentzündung bei denen keine eindeutige Zuteilung zu einer der beiden Erkrankungen gemacht werden kann. Dann spricht man von Colitis indeterminata [7].

### 1.1 Morbus Crohn:

Morbus Crohn ist durch eine transmurale Entzündung der Mukosa im gesamten Gastrointestinaltrakt gekennzeichnet, die schubweise verläuft. Von der Mundhöhle bis zum Anus kann jeder Abschnitt betroffen sein, typischerweise findet man ein diskontinuierliches Befallsmuster. Am Häufigsten sind Dünndarm und Dickdarm gleichzeitig betroffen. Das Befallsmuster unterscheidet sich im Kindesalter von dem bei Erwachsenen. Je früher die Erkrankung auftritt desto häufiger liegt nur ein Dickdarmbefall vor [43]. Histologisch lassen sich Epitheloidzellgranulome nachweisen. [7]

Blutiger Durchfall ist bei MC seltener als bei Colitis ulcerosa. Ein Dünndarmbefall geht oft mit einer Malnutrition und weiteren Folgeerscheinungen wie Gewichtsstillstand oder -verlust einher. Diese Symptome treten bei den meisten Kindern und Jugendlichen mit dieser Erkrankung auf und können manchmal auch der alleinige Hinweis auf eine CED sein.

Häufige Komplikationen sind Strikturen, Abszesse und Fisteln. Es können auch Fieberschübe auftreten. Im Laborbefund kann man eine erhöhte BSG, ein erhöhtes CRP oder eine Anämie finden [8].

Die Montreal-Klassifikation teilt Morbus Crohn nach den unterschiedlichen Befallsformen ein (Abb.1) [7].

Montreal Klassifikation:	
<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
A1 < 16 Jahre bei Diagnose	E1 Proktitis
A2 > 17-40 Jahre bei Diagnose	E2 Linksseitenkolitis
A3 > 40 Jahre	E3 Pankolitis
L1 terminales Ileum	
L2 Kolon	
L3 Ileokolon	
L4 oberer GI – Trakt	
L4+ unterer GI – Trakt	
B1 nicht strikturierend, nicht penetrierend	
B2 strikturierend	
B3 intern penetrierend	
B3p perianal penetrierend	

Abb. 1: Montreal – Klassifikation [7]

## 1.2 Colitis ulcerosa:

Die Colitis ulcerosa verläuft ebenfalls in Schüben, die Entzündung bleibt jedoch auf das Kolon beschränkt und ist nicht transmural. Sie beginnt am Rektum und breitet sich von dort kontinuierlich in Richtung Dünndarm aus. Endoskopisch finden sich bei der CU typischerweise Ulcera der Dickdarmschleimhaut und histologisch sind Kryptenabszesse vorhanden.

Kennzeichnend für die CU sind die blutig-schleimigen Durchfälle. Perianale Auffälligkeiten und verzögertes Wachstum sind seltener als bei MC. Auch die extraintestinalen Manifestationen treten nicht so häufig auf.

Die typischen Laborbefunde, die bei MC anzutreffen sind, findet man auch hier, vor allem die Eisenmangelanämie.

Die Erkrankung an einer CU geht auch mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome einher [9].

Bei einer Proktitis oder einer Linksseitenkolitis ist der Krankheitsverlauf nicht so schwerwiegend wie bei einer Pankolitis.

Ist das terminale Ileum auch von der Entzündung betroffen, so spricht man von einer „backwash ileitis“ [7].



### 1.3 Extraintestinale Manifestationen und Folgeerkrankungen:

Extraintestinale Manifestationen können parallel zu einer CED auftreten oder schon vor Beginn der intestinalen Symptome in Erscheinung treten.

Betroffen sind die Gelenke durch periphere Arthritiden oder axiale Arthropathien. Als dermatologische Manifestationen findet man das Erythema nodosum, vor allem bei MC, und das Pyoderma gangränosum. Letzteres ist sehr selten und öfters bei CU als bei MC. Am Auge können eine Uveitis, Episkleritis oder Skleritits auftreten. Eine primär sklerosierende Cholangitis, eine Autoimmunhepatitis, sowie eine Autoimmuncholangitis können als hepatobiliäre Manifestationen auftreten [7]. Außerdem gibt es noch einige Komplikationen, die meist eine Folge der CED sind, z.B. Mangelzustände, Nieren- und Gallensteine oder Osteoporose.

Zusätzlich sind die CED mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen assoziiert, die in Tabelle 1 aufgelistet sind [7].

Tab. 1: assoziierte Autoimmunerkrankungen [7].

#### Assoziierte Autoimmunerkrankungen:

Morbus Addison	Zöliakie
autoimmunhämolytische Anämie	Polymyalgia rheumatica
idiopathisch thrombozytopenische Purpura (ITP)	Asthma
Myasthenia gravis	Thyreoiditis
Multiple Sklerose	Autoimmunpankreatitis
systemischer Lupus erythematoses	Pericarditis
Psoriasis	Nephritis
Bronchitis	Diabetes mellitus Typ 1

### 1.4 Pathogenese:

Die Entstehung der CED ist bisher nicht vollständig geklärt. Unser derzeitiges Wissen basiert auf klinischen und epidemiologischen Untersuchungen, Genassoziations Studien und Laboruntersuchungen. Es spielen sowohl Umweltfaktoren, wie zum Beispiel die Hygiene, Infektionen mit bestimmten Viren oder Bakterien und Rauchen (bei MC), eine Rolle.

Im Darm des Menschen befinden sich unterschiedliche Mikroorganismen deren Zusammensetzung die Gewebshomöostase und den Wirtsmetabolismus beeinflussen. Die Mikroorganismen kommunizieren untereinander und mit dem Wirt. Bäckhed et al. beschreiben zum Beispiel den Einfluss auf den

Energiestoffwechsel. Es wurde gezeigt, dass Mäuse deren Darmschleimhaut nicht mit Mikroorganismen besiedelt ist, einen niedrigeren Körperfettanteil haben als Mäuse die seit Geburt mit Mikroorganismen in Kontakt gekommen sind [4]. Bei CED ist diese Kommunikation zwischen dem Immunsystem der Mukosa und den kommensalen Bakterien verändert. Beweise dafür, dass diese gestörte Kommunikation an der Entstehung von CED beteiligt ist, sind der therapeutische Nutzen von Antibiotika bei der Behandlung von zumindest einem Teil der Patienten, und die Erkenntnis dass so genannte „gesunde Bakterien“ oder probiotische Kombinationen den Krankheitsverlauf der CED beeinflussen können [20, 22, 57].

Die interstinale Schleimhaut trennt das intestinale Mikrobiom von dem mucosaassoziierten lymphatischen Gewebe und bildet somit eine wichtige Barriere für Bakterien- und Antigenübertritt in die Submucosa. Bei CED besteht eine erhöhte Permeabilität in den parazellulären Räumen und die Regulation der Tight-Junctions zwischen den Epithelzellen ist gestört [64]. Außerdem bilden Becherzellen Schleim, der die Epithelheilung und Entzündung reguliert [58] und Paneth-Zellen sezernieren antimikrobiologische Peptide.

In Familienuntersuchungen und Zwillingsstudien wurde die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Entstehung insbesondere von MC, aber auch bei CU gezeigt [18]. Interessanterweise fanden sich aber auch beide Erkrankungen im selben familiären Hintergrund, sodass angenommen wird, dass gemeinsame Suszeptibilitätsgene für beide Erkrankungen vorliegen.

Die Bedeutung der Regulation der Reaktion auf intestinale Bakterien wurde durch das erste Suszeptibilitätsgen, das für MC 2001 gefunden wurde, die Nucleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2 (NOD2 / CARD15) evident [24, 44]. Das NOD2 – Gen befindet sich auf dem Chromosom 16 in der perizentrometrischen Region und kodiert einen intrazellulären Sensor für Peptidoglycane, die Bestandteile der Bakterienwände sind. Muramyldipeptide, die in allen Bakterien vorkommen, sind der spezifische Ligand für NOD2 [36]. Die Assoziation mit MC beinhaltet drei Polymorphismen, welche jeweils zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen und die zelluläre Reaktion auf Peptidoglycane beeinträchtigt. Ungefähr 30 Prozent der Patienten europäischer Abstammung haben mindestens einen der drei Polymorphismen [18]. Träger dieser NOD2

Veränderungen haben ein höheres Risiko für Befall des terminalen Ileums und Komplikationen aufgrund eines fibrostenosierenden Verlaufes, sowie für einen früheren Beginn der Krankheit und Untergewicht [24, 44, 56, 61]. Heterzygotie für einen Polymorphismus führt zu einem 3-fach erhöhten Risiko an MC zu erkranken, Homozygotie steigert das Risiko 20-fach und ist somit der bisher höchste relative genetische Risikofaktor für MC [40]. Dennoch sind die Polymorphismen für sich alleine noch nicht ausreichend um eine Crohn Erkrankung auszulösen und zeigen die Komplexität einer multifaktoriellen Erkrankung.

Das NOD2-Protein besteht aus zwei N-terminalen Caspaserekrutierungsdomänen (CARDs), einer zentralen nukleotid-bindenden Oligomerisationsdomäne und zehn C-terminalen Leucin-rich repeat Domänen (LRRs) [56]. Es wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, Darmepithelzellen und Paneth-Zellen gebildet [70]. NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor der bakterielle Peptidoglykane bindet und den Nuklear Faktor kappa B (NFκB) und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) Signalwege aktiviert. Dies führt zur Produktion von z.B. Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin 1beta und antimikrobieller Peptide. Die NF-κB-Signalkaskade ist wichtig für die Erhaltung der normalen Homöostase der Schleimhaut und für die pathogenspezifische Antwort [36, 70].

Untersuchungen zur Homöostase des intestinalen Immunsystems bei Gesunden und die Bedeutung genetischer Veränderungen bei CED standen deshalb in den letzten Jahren zunehmend im Focus wissenschaftlicher Untersuchungen und haben zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von CED geführt. Genetische Veränderungen im NOD2-Gen könnten durch Funktionsverlust oder Funktionsgewinn die Antwort des angeborenen unspezifischen Immunsystems („innate immunity“) beeinflussen und somit zur Entstehung von CED beitragen.

1. Funktionsverlust: Die Immunantwort durch verschiedene Zellen ist abgeschwächt. Paneth-Zellen zum Beispiel produzieren antimikrobielle Mediatoren wie α-Defensine. Durch die Veränderung im NOD2-Gen wird weniger von diesen Mediatoren sezerniert und somit können selbst harmlose kommensale Bakterien die intestinale Mukosa durchdringen. Das wiederum führt zu einer chronischen Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, also zu einer chronischen Entzündung. Da Paneth-Zellen vor allem im terminalen Ileum in den Lieberkühn-Krypten sitzen, lässt sich erklären, warum NOD2-Mutationen mit einem vermehrten Befall dieses Darmabschnittes assoziiert sind. Eine weitere Zellgruppe

die von einem Funktionsverlust betroffen ist, sind die Makrophagen in der Mukosa. Sie produzieren weniger IL-8 was zu einer verminderten und verzögerten Rekrutierung von Neutrophilen führt. Da Neutrophile für die Entfernung von Bakterien von der Mukosaoberfläche zuständig sind, können die nun nicht entfernten Bakterien wie oben beschrieben, eine chronische Entzündung auslösen [36].

2. Funktionsgewinn: Der Defekt der durch die Veränderung im NOD2-Gen entsteht führt zu einer Hyperresponsibilität des Rezeptors auf mikrobielle Stimuli. Dadurch werden selbst bei physiologischer Mikrobiota in hohem Maße Chemokine ausgeschüttet, die wiederum Abwehrzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems anlocken und somit eine Entzündung verursachen [36] (Abb. 2).

Im Jahr 2003 wurden die NOD2 – Polymorphismen zum ersten Mal an Kindern untersucht. Die 3 Genvarianten 1007fsinsC, R702W und G908R waren wie bei den Erwachsenen mit einem erhöhten Risiko an MC zu erkranken assoziiert. Ebenso war bei Kindern vor allem das terminale Ileum betroffen. Außerdem konnten die Mutationen mit einem geringeren Gewicht bei Diagnosestellung, sowie mit einer tendenziell geringeren Größe im Vergleich zu Kindern ohne Genveränderung in Verbindung gebracht werden [61].

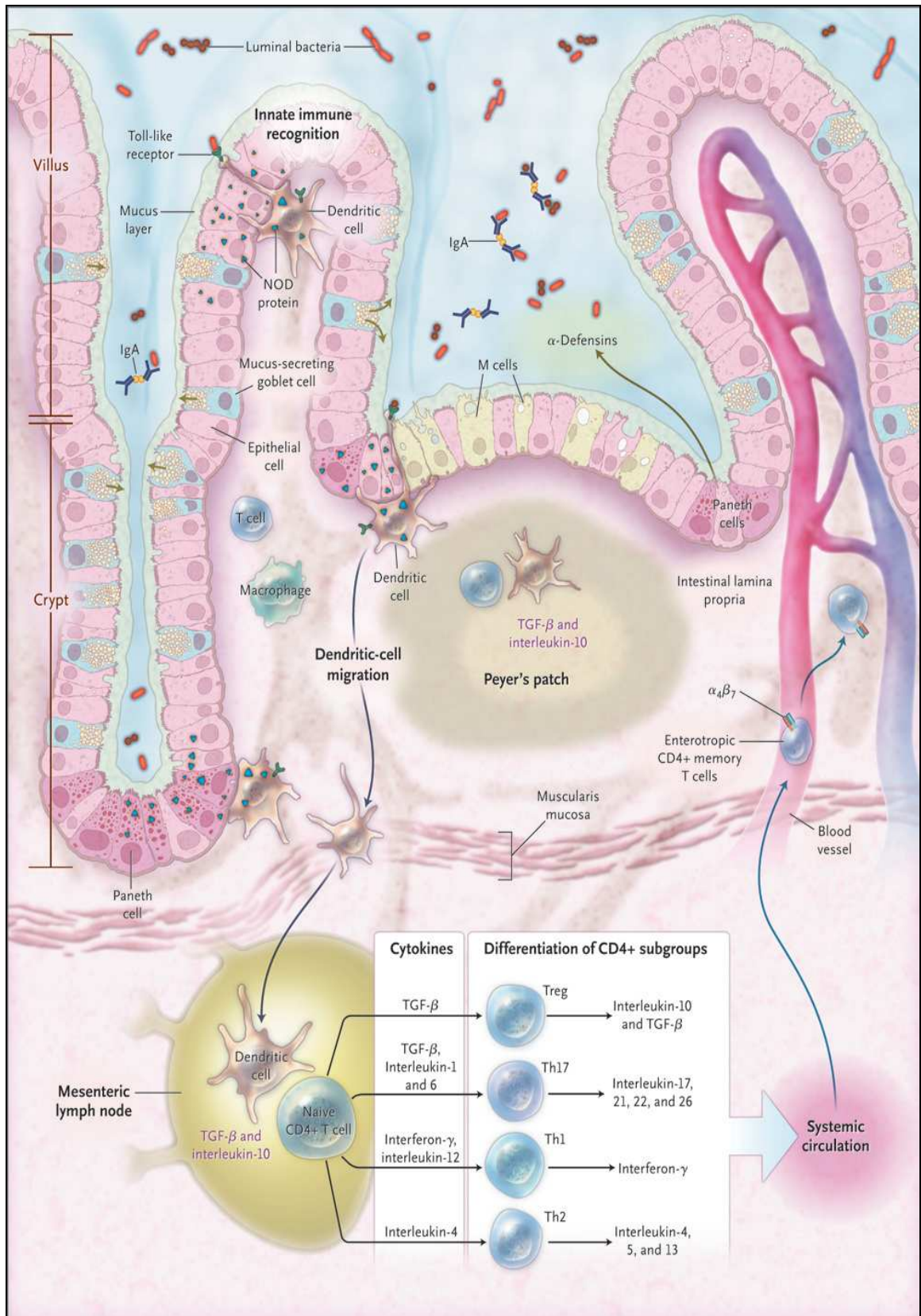


Abb. 2 Das intestinale Immunsystem. [1: C. Abraham, J.H.Cho. Mechanisms of Disease: IBD. N Engl J Med 2009;361:2070.]

### **1.5 Verminderte Knochendichte:**

Radiologische Knochendichtemessungen mittels „dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA)“ zeigen eine hohe Prävalenz von Osteoporose bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Je nach Studie schwankt die Prävalenz zwischen 18 – 42 % [13, 48, 49, 52] und 2 – 16 % [29, 50, 54, 55]. Damit stellen Osteopenie und Osteoporose eine häufige Komplikation der CED dar, wenngleich das Frakturrisiko bei Patienten mit CU nicht erhöht scheint. Bei Patienten mit MC ist das Risiko leicht erhöht [65]. Die Knochendichte nimmt im Kindesalter stetig zu bis das Maximum ungefähr im Alter von 25 – 30 Jahren erreicht wird. Störungen der Knochenmineralisierung im Rahmen von CED bei Kindern sind deshalb eine ernstzunehmende Komorbidität.

Osteoporose entsteht entweder, wenn Osteoblasten zu wenig Knochensubstanz bilden, dann spricht man von „low-turnover“-Osteoporose, oder wenn sie wie bei der „high-turnover“-Osteoporose zuviel abbauen.

Die Pathogenese von Osteoporose bei CED ist noch nicht vollständig geklärt, am wahrscheinlichsten ist ein multifaktorielles Geschehen. Die drei Faktoren die als Hauptursachen vermutet werden sind Malabsorption bei Dünndarmbefall, Nebenwirkung durch Glucocorticoidtherapie und die chronische Entzündung selbst.

1. Malabsorption: Durch die dauerhaft entzündete und hierdurch geschädigte Dünndarmmukosa kann die Nährstoffabsorption gestört sein. Dies kann über einen längeren Zeitraum zu einem Calcium- und Vitamin-D-Mangel führen, aus dem wiederum eine Verminderung der Knochendichte resultiert [11].

2. Glucocorticoidtherapie: Glucocorticoide vermindern die Knochendichte dadurch, dass sie die Osteoblastenaktivität hemmen, die Kalziumabsorption im Darm reduzieren und die renale Kalziumexkretion erhöhen [39]. Diese Faktoren führen zu einer „low-turnover“-Osteoporose. Da Osteoporose aber auch bei Patienten beobachtet wird, die keine Glucocorticoide als Therapie erhalten haben, müssen noch andere Ursachen eine Rolle spielen [60].

3. Entzündung: Chronische Entzündung führt zu einer „high-turnover“-Osteoporose. Der Verlust der Knochenmasse wird durch mehrere Mediatoren reguliert:  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{RANK}$ ,  $\text{RANKL}$  und Osteoprotegrin.  $\text{RANKL}$  wird durch aktivierte T-Zellen produziert. Es bindet an  $\text{RANK}$ , das auf den Osteoklastenvorläuferzellen sitzt. Durch diesen Stimulus wird die Bildung von

Osteoklasten induziert. Osteoprotegrin wird von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert und blockiert RANKL (Abb. 3). Somit wird die Osteoklastogenese gehemmt. Dennoch können auch hohe Osteoprotegrinspiegel den RANKL-Effekt nicht antagonisieren.

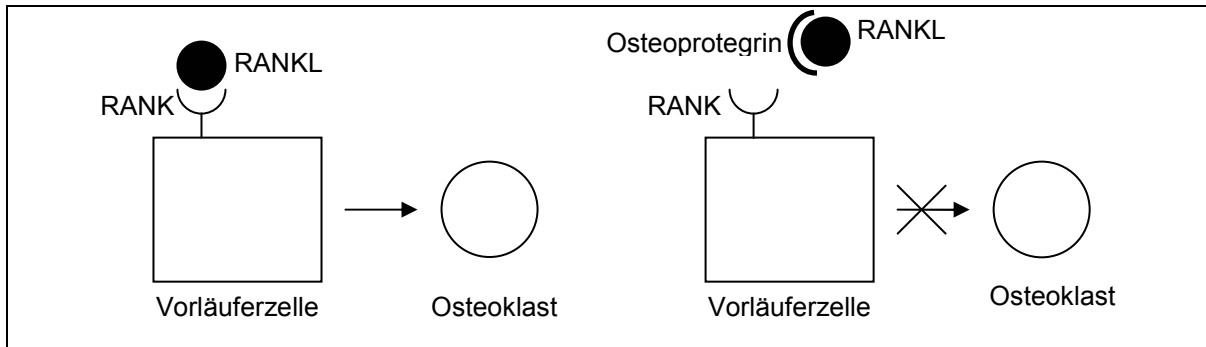


Abb. 3: Funktion von RANK, RANKL und Osteoprotegrin. RANK: receptor activator of nuclear factor kappa B; RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. (Eigene Abbildung)

Die proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  unterstützen die Bildung von Osteoklasten in Kombination mit RANKL.  $\text{IFN}\gamma$  kann zwar auf direktem Weg die RANKL-vermittelte Osteoklastogenese behindern, aber es kann auch die Antigen-Präsentation hochregulieren und somit T-Zellen aktivieren die wiederum RANKL und  $\text{TNF}\alpha$  produzieren. Da dieser Effekt überwiegt, führt  $\text{IFN}\gamma$  indirekt zu einem Verlust der Knochensubstanz [60].

Wie in Absatz 1.4 beschrieben wird durch NOD2 NF- $\kappa$ B aktiviert, welches seinerseits zur Transkription von  $\text{IL-1}$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-6}$  führt. Wenn nun durch eine Veränderung im NOD2-Gen diese Signalkaskade verstärkt wird, könnte man daraus ableiten, dass Patienten die eine solche Veränderung tragen stärker von Osteoporose betroffen sind als Patienten ohne Mutation.

### 1.6 Fragestellung:

In der vorliegenden Doktorarbeit sollen die klinischen und molekulargenetischen Daten eines universitären Crohn- und Kolitiszentrums mit pädiatrischen und adulten CED Patienten hinsichtlich NOD2 Genotyp und Osteoporose ausgewertet werden.

Hierzu werden Kinder und Erwachsene, die an Morbus Crohn erkrankt sind und Veränderungen des NOD2-Gens tragen im Vergleich zu Erkrankten mit einem genetischen Wildtyp, hinsichtlich Befallsmuster, Krankheitsaktivität,

Krankheitsdauer, Knochendichte, Alter bei Erstdiagnose, Untergewicht, Minderwuchs, extraintestinalen Manifestationen, Hospitalisation, Therapie, Operationen und Komplikationen untersucht. Als weiteres Vergleichskollektiv wurden die gleichen Daten bei Kindern und Erwachsenen mit Colitis ulcerosa erfasst. Die Auswertung der erhobenen Daten soll klären, ob Kinder mit NOD2-Veränderungen einen schwereren Krankheitsverlauf und häufiger Osteoporose haben.

Zusätzlich werden die Daten hinsichtlich dem Vorliegen einer Osteoporose bei Patienten mit CED ausgewertet und der Frage nachgegangen, ob die Entzündungsaktivität der Hauptgrund für die verminderte Knochendichte ist.

Anhand der erhobenen Daten ist zu diskutieren, ob sich bei Vorliegen von NOD2 Polymorphismen oder Osteoporose therapeutische Konsequenzen ableiten lassen.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten:**

Es wurden die Daten von 72 pädiatrischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die in der gastroenterologischen Ambulanz der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm behandelt werden, erhoben. Davon konnten 60 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Die Patienten und ihre Eltern gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. 44 Patienten haben Morbus Crohn und 16 Patienten Colitis ulcerosa. Von den MC-Patienten waren 22 weiblich und 22 männlich. Bei den CU-Patienten waren 8 weiblich und 8 männlich. Die Diagnosen wurden gemäß den Porto-Kriterien für CED nach klinischen, endoskopischen, radiologischen und histologischen Gesichtspunkten gestellt [21]. Patienten mit einer Colitis indeterminata oder einer unklaren Diagnose wurden aus der Studie ausgeschlossen, ebenso wie Patienten, die einer Knochendichtemessung oder der NOD2-Diagnostik nicht zustimmten.

Zusätzlich wurden die Daten von 240 erwachsenen Patienten aus der gastroenterologischen Abteilung der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm erhoben. Ähnlich wie bei dem pädiatrischen Kollektiv wurden Patienten mit unklarer Diagnose, Colitis indeterminata und fehlender NOD2-Diagnostik aus der Studie ausgeschlossen. Patienten ohne Knochendichtemessung wurden hier miteinbezogen. Somit wurden insgesamt 168 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 148 Patienten mit MC (82 weibliche, 66 männliche) und 20 Patienten mit CU (8 weibliche, 12 männliche). Alle erwachsenen Patienten die bei der Erstdiagnose jünger als 20 Jahre und deren Krankheitsbeginn im jugendlichen Alter waren wurden gemeinsam mit dem pädiatrischen Kollektiv ausgewertet. Daher ergibt sich ein pädiatrisches Kollektiv von 88 Fällen mit MC (wobei nur bei 71 eine Knochendichtemessung vorlag) und 18 Fällen mit CU. Im Erwachsenenkollektiv verbleiben somit noch 104 Patienten mit MC (davon 60 mit Knochendichtemessung) und 18 Patienten mit CU.

### **2.2 Knochendichtemessung:**

Die Knochendichte wurde an den Lendenwirbelkörpern (L2-L4) mit der Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) Methode mit dem Gerät Hologic QDR 1000 gemessen und in  $g/cm^2$  angegeben. Außerdem wurden der t-Wert und der z-Wert

errechnet. Der t-Wert gibt die Differenz des Patientenwertes zum Mittelwert junger gesunder Erwachsener an. Der z-Wert gibt die Differenz zum Mittelwert gesunder Menschen gleichen Alters an. Bei den pädiatrischen Patienten wurden z-Werte unter -2,0 SD als verminderte Knochendichte gewertet, in Anlehnung an die Empfehlung der International Society for Clinical Densitometry [5]. Für die Bewertung der Knochendichte bei den erwachsenen Patienten wurden nach der Definition der WHO t-Werte unter -1,0 SD als Osteopenie und t-Werte unter -2,5 SD als Osteoporose betrachtet.

### **2.3 Genanalyse:**

Es wurden drei single-nucleotid Polymorphismen (SNPs) im NOD2 Gen untersucht: die Missense-Mutationen in Exon 8 (G908R) und Exon 4 (R702W), sowie die Frameshift-Mutation im Exon 11 (1007fsinsC).

Aus dem eingesandten Material (EDTA-Blut) wurden die kernhaltigen Zellen isoliert und aus diesen Zellen die genomische DNA extrahiert. Dazu wurde das QIAamp Flexi Gen DNA Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Die Exone 4, 8 und 11 (inklusive Exon-/Intron-Grenzen: +/- 20 bp) des NOD2-Gens wurden per PCR mittels CEQ Quick Start Kit und einem CEQ 8800 automatisiertem DNA-Sequenzierer nach Herstelleranleitung (Beckman Coulter) amplifiziert und in beide Richtungen sequenziert [33].

### **2.4 Erhebung der Körpermaße:**

Das Körpergewicht in Kilogramm wurde mit der Personenwaage Seca Modell 920 bestimmt. Die Patienten wurden ohne Schuhe nur mit Unterwäsche und leichter Kleidung gewogen. Die Körpergröße wurde mit dem Ulmer Stadiometer nach Prof. Heinze gemessen. Hierbei trugen die Patienten ebenfalls keine Schuhe.

Daraus wurde mit der Formel Gewicht in kg/Körpergröße in m<sup>2</sup> der Body mass index (BMI) errechnet. Patienten mit einem BMI unter der 10. Perzentile wurden als untergewichtig eingestuft. Ab einer Größe unter der 3. Perzentile wurde ein Minderwuchs diagnostiziert.

### **2.5 Beurteilung der Krankheitsaktivität:**

Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurden für alle pädiatrischen MC-Patienten der PCDAI-Score und für alle pädiatrischen CU-Patienten der PUCAI-Score

bestimmt. Hierbei wurden über den gesamten Krankheitsverlauf maximal 5 Scores ermittelt und daraus der Mittelwert errechnet (Tab. 2 und Tab. 4) [25, 62].

Ab einem PCDAI von  $\geq 30$  spricht man von einer moderaten bis schweren Krankheitsaktivität [27].

Ein PUCAI-Score  $< 10$  weist auf eine Remission hin, bei einem Wert zwischen 10 und 34 spricht man von einer milden Krankheitsaktivität und bei Werten  $\geq 35$  geht man von einer moderaten bis schweren Aktivität der Colitis ulcerosa aus [63].

Für die erwachsenen MC-Patienten wurde der CDAI-Score [15] und für die erwachsenen CU-Patienten der CAI-Score nach Rachmilewitz erhoben (Tab. 3 und Tab. 5) [16]. Bei einem CDAI unter 150 ist die Erkrankung inaktiv. Ab einem Wert von 220 spricht man von einem mittelschweren, ab 450 Punkten von einem sehr schweren Schub [15].

Beim CAI-Score geht man bei einem Wert von weniger als 4 von einer inaktiven Erkrankung aus. Liegt der Wert zwischen 4 und 8 spricht man von einem leichten bis mittelschweren Schub und ab einem Wert von mehr als 9 von einem sehr schweren Schub [16].

Als weitere Kriterien für eine vermehrte Krankheitsaktivität wurden zusätzlich das Auftreten von Komplikationen wie Fisteln und Strikturen, die Notwendigkeit von Operationen, Steroidabhängigkeit, Therapie mit Azathioprin, MTX und Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern sowie eine Hospitalisation von mehr als zwei Wochen verglichen mit der durchschnittlichen Krankheitsdauer verwendet.

Tab. 2: PCDAI-Score. m: männlich; w: weiblich; SD: standard deviation [25]

		<b>Punkte</b>
Bauchweh	Nein	0
	mild (keine Einschränkung des Alltags)	5
	mittel bis schwer (jeden Tag, nachts, einschränkend)	10
Stühle / Tag	0-1, flüssig, kein Blut	0
	<2, geformt und wenig Blut oder 2-5 flüssige	5
	>6 flüssige, viel Blut, nachts	10
Allgemeinzustand	Gut	0
	vermindert, gelegentlich Einschränkung im Alltag	5
	stark vermindert, eingeschränkt	10
Gewicht	Zunahme oder stabil	0
	Verlust < 10%	5
	Verlust > 10%	10
Größe (bei Erstdiagnose)	<1 Channel Abweichung	0
	1-2 Channel Abweichung	5
	>2 Channel Abweichung	10
<b>oder</b>		
Wachstumsgeschwindigkeit	<-1 SD vom Normwert	0
	-1 bis -2 SD	5
	>2 SD	10
Abdomen	weich, keine Resistenzen	0
	gespannt oder Resistenz ohne Abwehrspannung	5
	gespannt, Resistenz, Abwehr	10
Perirectaler Befall	nein, asymptomatisch	0
	1-2 Fisteln ohne Schmerz	5
	aktive Fistel, Schmerz, Abszess	10
Extraintestinale Manifestationen	Nein	0
	1	5
	>2	10
<b>Laborwerte</b>		
Hämatokrit (%)	bis 10 Jahre: >33	0
	m 11-14: >35	
	w 11-19: >34	
	m 15-19: >37	
	bis 10 Jahre: 28-32	5
	m 11-14: 30-34	
	w 11-19: 29-33	
	m 15-19: 32-36	
	bis 10 Jahre: <28	10
	m 11-14: <30	
	w 11-19: <29	
	m 15-19: <32	
Blutsenkungsgeschwindigkeit	<20	0
	20 bis 50	5
	>50	10
Albumin (g/L)	>35	0
	31 bis 34	5
	<30	10

Tab. 3: CDAI-Score. [15]

								Faktor	Punkte
Tage							Summe		
	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1		
Anzahl der flüssigen oder sehr weichen Stühle in der letzten Woche									x2
Bauchschmerzen (keine = 0, leichte = 1, mäßige = 2, starke = 3)									x5
Allgemeinbefinden (gut=0, leicht beeinträchtigt=1, schlecht=2, sehr schlecht=3, unerträglich=4)									x7
Gelenkschmerzen, Arthritis								nein = 0, ja = 1	x20
Iritis/Uveitis								nein = 0, ja = 1	x20
Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, apthoide Stomatitis								nein = 0, ja = 1	x20
Analfissur, -fistel,-abszess								nein = 0, ja = 1	x20
andere Fisteln								nein = 0, ja = 1	x20
Temperatur > 37,5°C axillar in der letzten Woche								nein = 0, ja = 1	x20
Symptomische Durchfallbehandlung								nein = 0, ja = 1	x30
Resistenz im Abdomen								keine = 0, fraglich = 2, sicher = 5	x10
Hämatokrit								Männer: 47% - aktueller Hämatokrit Frauen: 42% - aktueller Hämatokrit	x6
Körpergewicht								(1-Körpergewicht/Standardgewicht)*100	

Tab. 4: PUCAI-Score. [62]

		<b>Punkte</b>
Abdomen	kein Schmerz	0
	Schmerz erträglich	5
	Schmerz nicht erträglich	10
rektale Blutung	Keine	0
	wenig in <50% der Stühle	10
	wenig in den meisten Stühlen	20
	Viel	30
Konsistenz	Geformt	0
	teilweise geformt	5
	nicht geformt	10
Stuhlfrequenz	0 bis 2	0
	3 bis 5	5
	6 bis 8	10
	>8	15
Stuhl nachts	Nein	0
	Ja	10
Allgemeinzustand	keine Einschränkung	0
	gelegentlich Einschränkung	5
	Schwere Einschränkung	10

Tab. 5: CAI-Score. BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit [16]

		<b>Punkte</b>
Stuhlfrequenz pro Woche	< 18	0
	18 - 25	1
	26 - 60	2
	> 60	3
rektale Blutung	keine	0
	wenig	2
	viel	4
Allgemeinzustand	gut	0
	leicht reduziert	1
	schlecht	2
	sehr schlecht	3
Abdomen	keine Schmerzen	0
	leichte Schmerzen	1
	mittelschwere Schmerzen	2
	starke Schmerzen	3
Körpertemperatur	37 - 38	0
	> 38	3
Extraintestinale Manifestationen	Iritis	3
	Erythema nodosum	3
	Arthritis	3
Laborwerte	BSG > 50 in 1 Std.	1
	BSG > 100 in 1 Std.	2
	Hämoglobin > 100g/l	4

## **2.6 Datenauswertung:**

Sowohl die Daten der Kinder als auch die der Erwachsenen wurden aus den Patientenakten gewonnen und mit dem Computerprogramm Microsoft Excel tabellarisch erfasst. Wegen der geringen Patientenzahl bei den pädiatrischen Patienten wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die Daten wurden daher mittels Tabellen und Schaubildern aufgearbeitet. Dafür wurden die Software Microsoft Excel und das Statistikprogramm GraphPadPrism verwendet.

## **2.7 Ethikantrag:**

Der Ethikantrag wurde mit der Nummer 240/08 unter dem Titel „Erfassung genetischer Risikofaktoren bei Kindern und Jugendlichen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ an die Ethikkommission der Universität Ulm gestellt. Die Kommission hat die Studie bewilligt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Pädiatrische Patienten

##### 3.1.1 MC-Patienten

Tab. 6: Vergleich der MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten der gastroenterologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm. NOD2: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2; SNPs: Single nucleotid polymorphisms; wt: Wildtyp; ED: Erstdiagnose; MTX: Methotrexat; (P)CDAI: (Pediatric) Crohn's disease activity index.

<b>NOD2 Gendiagnostik</b> n=88	<b>NOD2 SNPs</b> n= 39	<b>NOD2 wt</b> n= 49
Alter bei ED (Mittelwert)	15,2	13,7
Alter aktuell (Mittelwert)	27,8	24,2
Geschlecht weiblich	59%	45%
Geschlecht männlich	41%	55%
Befallsmuster:		
L1	18%	13%
L1 + L4	3%	11%
L2	3%	16%
L2 + L4	5%	7%
L3	58%	33%
L3 + L4	13%	18%
L4	0%	2%
Extraintestinale Manifestationen	31%	29%
Untergewicht bei ED	50%	31%
Untergewicht im Verlauf	31%	12%
Osteoporose (z<-2)	37%	19%
Steroidabhängig	77%	70%
Azathioprin / MTX	64%	52%
Anti TNF $\alpha$ -Antikörper	23%	19%
OP	50%	30%
Komplikationen	49%	41%
Durchschnittliche Krankheitsdauer in Jahren	4,82	4,88
>2 Wochen Hospitalisation	65%	48%
Absolute Hospitalisation (Median)	18	13
PCDAI/CAI (Median)	18/118	14/118
PCDAI/CAI (Mittelwert)	21,4/130	15,5/122,3
PCDAI $\geq$ 30/CAI $\geq$ 220	13%	6%



In dem untersuchten Patientenkollektiv der an MC erkrankten Kinder und Jugendlichen gibt es 39 Patienten mit einer oder mehreren Veränderung im NOD2 Gen. Es wurde bei 49 Patienten ein Wildtyp festgestellt.

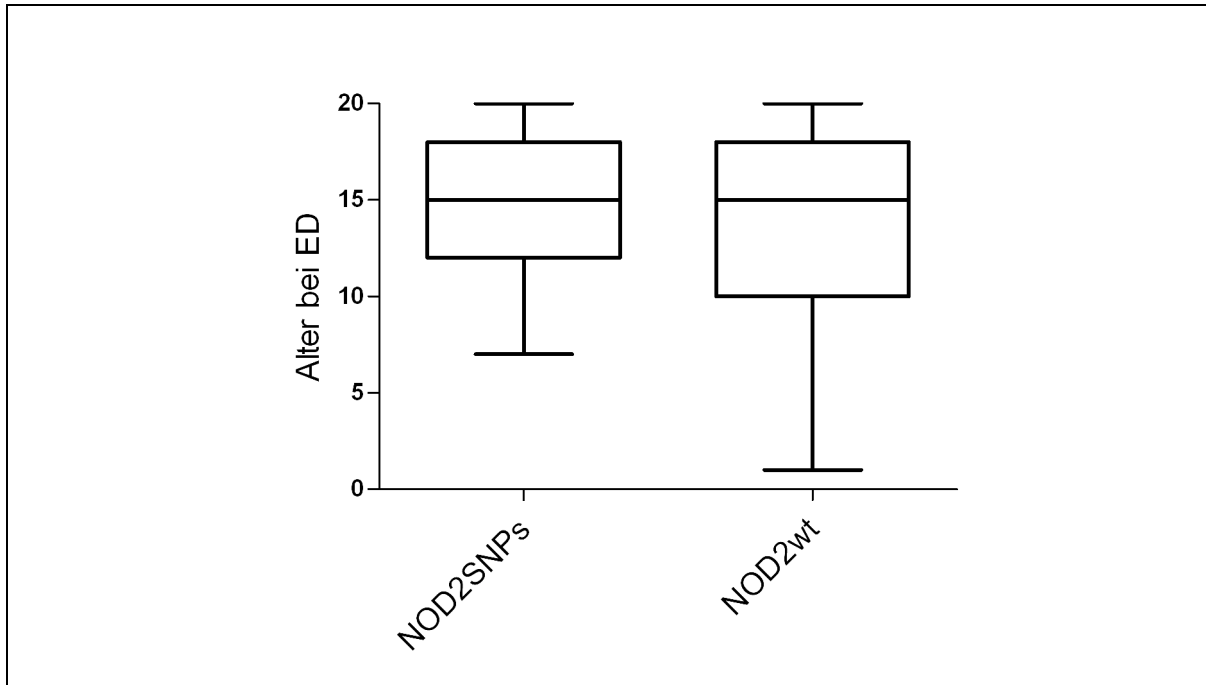


Abb.4: Vergleich des Alters bei Erstdiagnose der MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. NOD2: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2; SNPs: Single nucleotid polymorphisms; wt: Wildtyp; ED: Erstdiagnose.

Es lässt sich erkennen, dass bei den Patienten mit einer Genveränderung das Alter bei Erstdiagnose mit durchschnittlich 15,2 Jahren höher ist als bei Patienten mit genetischem Wildtyp. Hier liegt das Alter bei Erstdiagnose bei 13,7 Jahren. In der Gruppe der Kinder mit NOD2-Polymorphismen gab es mehr Mädchen, in der Gruppe der Kinder mit NOD2-Wildtyp waren die Jungen in der Überzahl (Tab. 6 und Abb. 4).

Auch bei der Betrachtung des Befallsmusters werden Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen sichtbar. Bei 58% der Patienten mit Genveränderung liegt ein ileokolischer Befall vor. Deutlich mehr als bei Patienten mit Wildtyp. In dieser Gruppe hatten 33% einen ileokolischen Befall. Auch ein Befall des terminalen Ileums alleine kam bei Patienten mit NOD2-Veränderung häufiger vor. Ein alleiniger Kolonbefall jedoch konnte bei 16% der Patienten mit genetischem Wildtyp festgestellt werden im Gegensatz zu 3% der Patienten mit NOD2-

Polymorphismus. Insgesamt war der untere GIT aber bei den Patienten mit Genveränderung häufiger betroffen.

Untergewicht war bei Erstdiagnose der Erkrankung bei der Hälfte aller Patienten mit Genveränderung vorhanden. Auch im Verlauf der Krankheit hatten noch 31% der Patienten dieses Problem. Bei den Patienten mit genetischem Wildtyp hatten sowohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch im Verlauf jeweils ca. 20% weniger Untergewicht als bei Patienten mit NOD2-Veränderung (Abb. 5).

Osteoporose trat bei 37% der Patienten mit Genveränderung auf und ist somit in dieser Gruppe eindeutig häufiger als bei Patienten mit Wildtyp, die ein Vorkommen von Osteoporose von 19% haben.

Der PCDAL-, bzw. CDAI-Score, als Marker für die Krankheitsaktivität, ist

bei den Kindern mit NOD2-Veränderung ebenfalls höher (Tab. 6 und Abb. 6), 13% der Patienten hatten einen Punktwert auf Grund dessen die Krankheitsaktivität als mittelschwer bis schwer eingestuft wurde. In der Gruppe der Patienten mit genetischem Wildtyp erreichten nur 6% der Patienten einen so hohen Punktwert. Bei Patienten mit Genveränderung mussten Medikamente wie Steroide, Azathioprin, Methotrexat und Anti-TNF-alpha-Antikörper häufiger eingesetzt werden. Ebenso benötigen diese Patienten häufiger eine OP auf Grund ihrer Erkrankung und waren öfter von Komplikationen wie Strikturen und Fisteln betroffen.

Dies spiegelt sich auch in der Hospitalisation wieder. 65% der Patienten mit Genveränderung mussten auf Grund der MC mehr als zwei Wochen stationär im Krankenhaus verbringen. Bei Kindern mit genetischem Wildtyp war dies in 48% der Fälle nötig. Da die durchschnittliche Krankheitsdauer in beiden Patientengruppen nahezu gleich ist, lassen sich diese Zahlen direkt miteinander vergleichen.

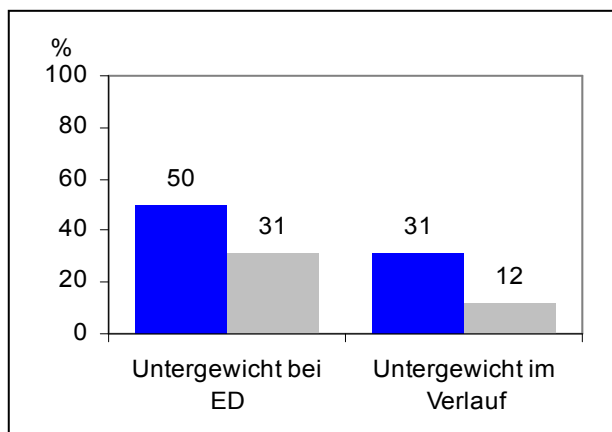


Abb. 5: Vergleich des Untergewichts der MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. Blaue Balken: Patienten mit NOD2SNPs; Graue Balken: Patienten mit NOD2wt. ED: Erstdiagnose; SNPs: single nucleotid polymorphisms.

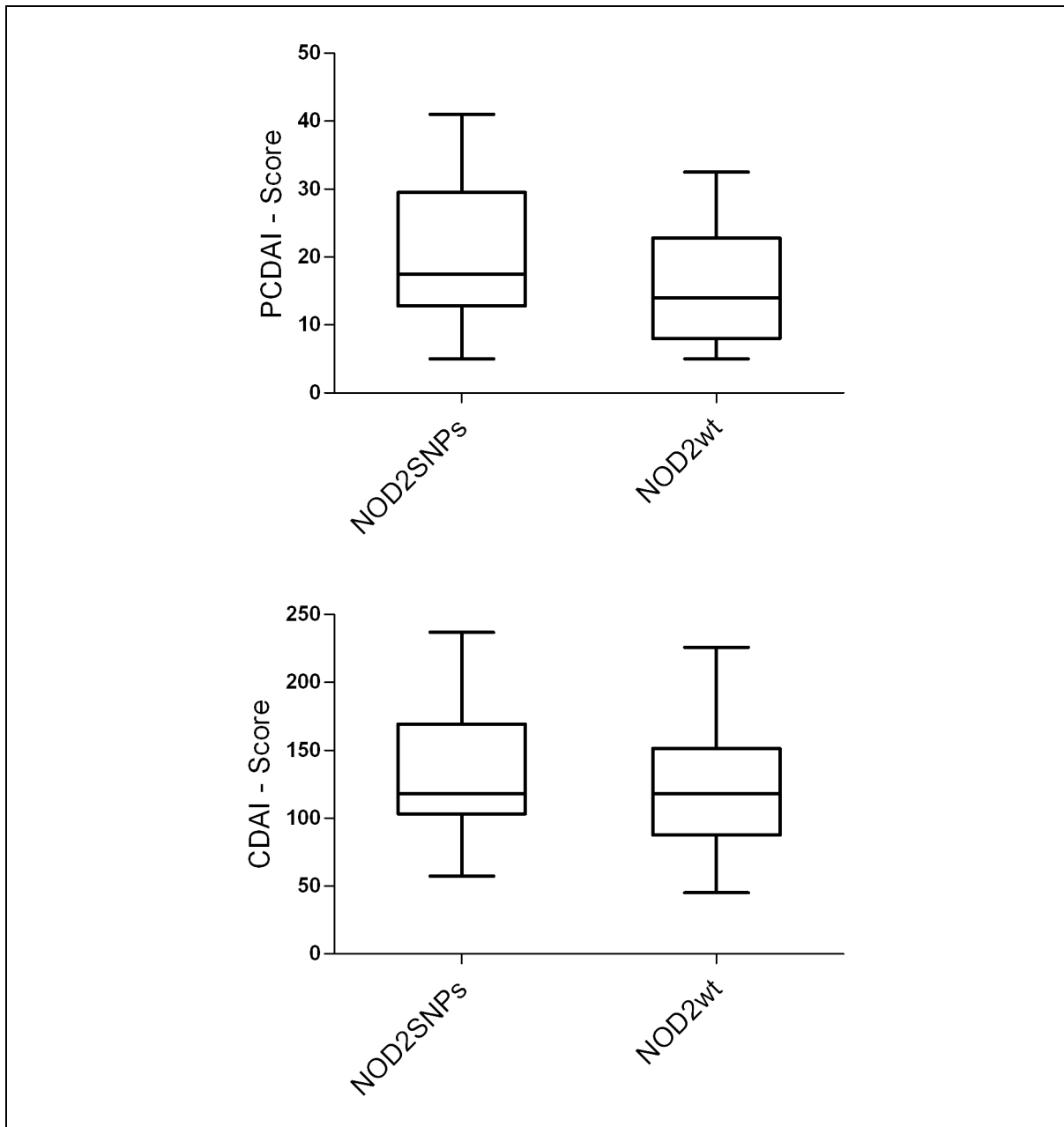


Abb. 6: Vergleich der PCDAI-Scores und der CDAI-Scores der MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. NOD2: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2; SNPs: Single nucleotid polymorphisms; wt: Wildtyp; ED: Erstdiagnose; (P)CDAI: (Pediatric) Crohn's disease activity index.

Lediglich bei der Häufigkeit von extraintestinalen Manifestationen sind keine nennenswerten Unterschiede feststellbar (Tab. 6).

Das Patientenkollektiv lässt sich auch in zwei andere Gruppen einteilen: Patienten mit Osteoporose und Patienten mit normaler Knochendichte (Tab. 7).

Der Befall des terminalen Ileums alleine und der ileokolische Befall waren mit 16%, bzw. 45% bei Patienten mit einer normalen Knochendichte häufiger betroffen im Gegensatz 5%, bzw. 32% bei den Patienten mit Osteoporose. Ein alleiniger Befall des unteren GITs hingegen war bei Patienten mit Osteoporose häufiger.

Des Weiteren zeigt sich, dass erkrankte Kinder mit normaler Knochendichte in 22% der Fälle Untergewicht zum Zeitpunkt der Erstdiagnose hatten und dieses bei 11% der Patienten im Verlauf bestehen blieb, wohingegen 62% der Patienten mit Osteoporose von diesem Problem bei Erstdiagnose betroffen waren und dieses auch bei 36% im Krankheitsverlauf der

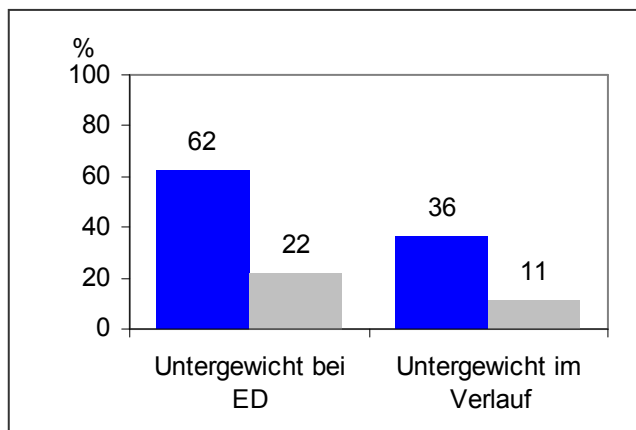


Abb. 7: Vergleich des Untergewichts der MC-Patienten mit Osteoporose und normaler Knochendichte. Blaue Balken: Patienten mit Osteoporose; graue Balken: Patienten mit normaler Knochendichte. ED: Erstdiagnose.

Fall war (Abb. 7). Eine Hospitalisation von mehr als zwei Wochen ist mit Osteoporose in 60% der Fälle assoziiert, bei Kindern mit normaler Knochendichte in 52% der Fälle. Da die Kinder mit Osteoporose eine niedrigere durchschnittliche Krankheitsdauer haben als die Kinder mit normaler Knochendichte ist die Hospitalisation in dieser Gruppe noch stärker zu gewichten.

Betrachtet man die Krankheitsaktivität stellt man fest, dass der PCDAI-, bzw. der CDAI-Score in der Gruppe der von Osteoporose betroffenen Kinder höher ist. 21% der Patienten wurde auf Grund ihres Punktwertes eine mittelschwere bis schwere Krankheitsaktivität zugesprochen im Gegensatz zu 4% der Patienten mit normaler Knochendichte (Abb. 8). Minderwuchs war bei Patienten mit Osteoporose etwas häufiger, insgesamt aber in beiden Gruppen sehr selten (Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich der MC-Patienten mit Osteoporose und normaler Knochendichte. Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten der gastroenterologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm. ED: Erstdiagnose; MTX: Methotrexat; (P)CDAI: (Pediatric) Crohn's disease activity index.

<b>n=71</b>	<b>Osteoporose n= 19</b>	<b>Normale Knochendichte n= 52</b>
Befallsmuster:		
L1	5%	16%
L1 + L4	0%	12%
L2	16%	10%
L2 + L4	16%	4%
L3	32%	45%
L3 + L4	32%	14%
L4	0%	0%
Extraintestinale Manifestationen	26%	31%
Untergewicht bei ED	62%	22%
Untergewicht im Verlauf	36%	11%
Minderwuchs	13%	7%
Steroidabhängig	79%	71%
Azathioprin / MTX	63%	66%
Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper	32%	26%
OP	17%	47%
Komplikationen	26%	46%
Durchschnittliche Krankheitsdauer in Jahren	4,47	5,07
Hospitalisation >2 Wochen	60%	52%
Absolute Hospitalisation (Median)	20	15
PCDAI/CDAI (Median)	18/121,2	15/129,9
PCDAI/CDAI (Mittelwert)	21/135	15/131,8
PCDAI $\geq$ 30/CDAI $\geq$ 220	21%	4%

Steroide sind in der Gruppe der Patienten mit verminderter Knochendichte zu 8% häufiger gegeben worden. Anti-TNF-alpha-Antikörper wurden in dieser Patientengruppe ebenfalls zu 8% häufiger gegeben. Eine immunsuppressive Dauertherapie mit Azathioprin oder Methotrexat wurde in beiden Patientengruppen in etwa gleich häufig benötigt. Operationen, Komplikationen und extraintestinale Manifestationen traten in der Gruppe mit normaler Knochendichte häufiger auf (Tab. 7).

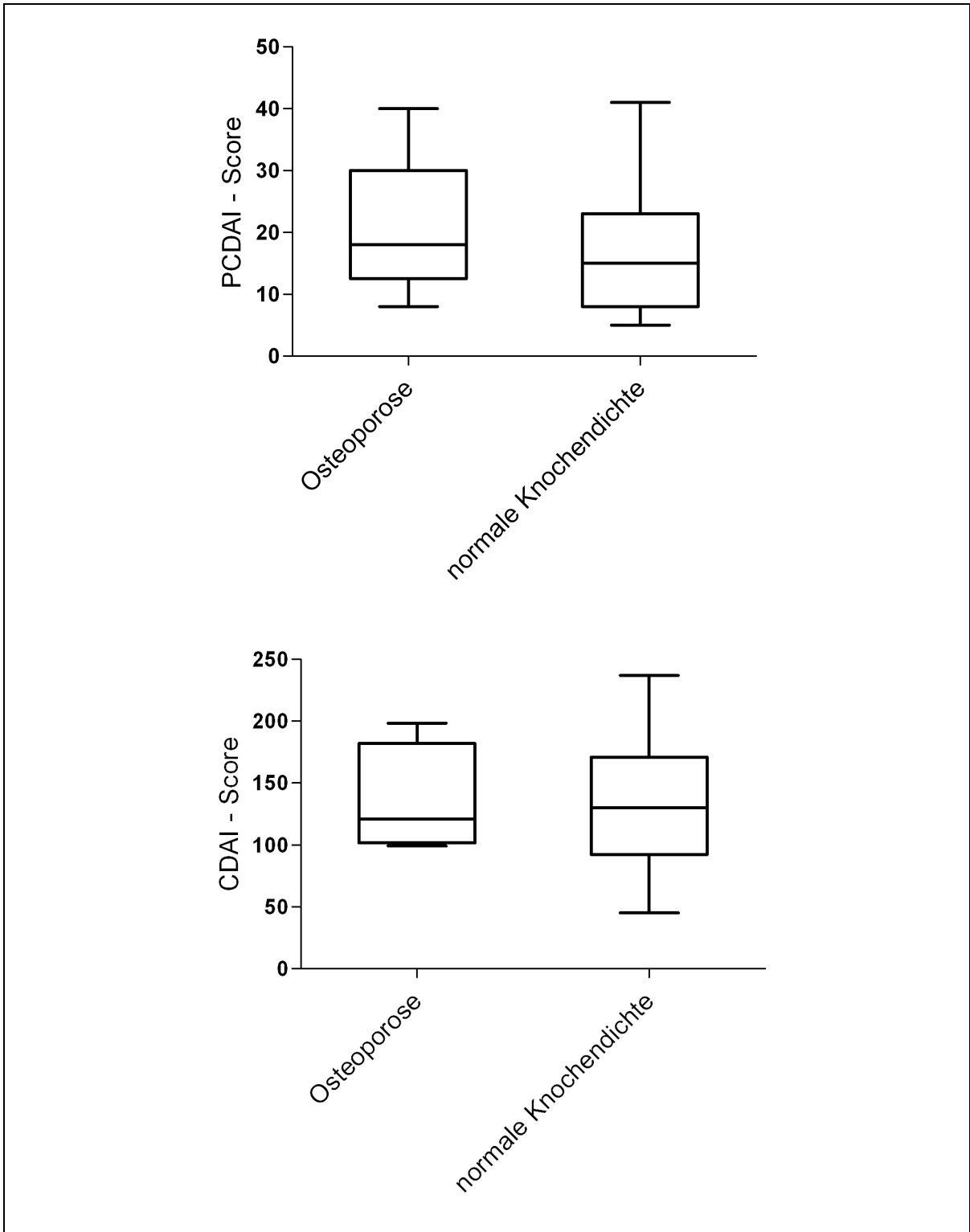


Abb. 8: Vergleich der PCDAI-Scores und der CDAI-Scores der MC-Patienten mit Osteoporose und normaler Knochendichte. (P)CDAI: (Pediatric) Crohn's disease activity index.

### **3.1.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten**

Im Vergleich der MC-Patienten mit den CU-Patienten zeigen sich einige Unterschiede. Kinder die an MC erkranken sind im Durchschnitt etwa 5 Jahre älter bei ED als Kinder die an CU erkranken.

Bei den MC-Patienten gab es mehr Mädchen, in der Gruppe des CU-Patienten waren mehr Jungen. Extraintestinale Manifestationen traten in beiden Patientengruppen etwa gleich häufig auf. 38% der Kinder mit MC hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Untergewicht. Im Krankheitsverlauf war dies noch bei 19% der Kinder der Fall. Bei Kindern mit CU waren bei Erstdiagnose 13% und im Verlauf 14% von diesem Problem betroffen. Osteoporose war bei MC-Patienten mit 26% deutlich häufiger als bei CU-Patienten mit 6%. Steroide wurden bei 67% der MC-Patienten eingesetzt, Azathioprin, bzw. Methotrexat bei 58% und Anti-TNF-alpha-Antikörper bei 21% der Kinder mit MC. Bei CU-Patienten wurden Steroide nur bei 33%, Azathioprin und Methotrexat bei 39% und Anti-TNF-alpha-Antikörper bei 11% eingesetzt.

Bei Kindern mit CU traten keine Komplikationen auf. Es war nur bei einem Patienten eine Operation notwendig. Mehr als die Hälfte der Kinder mit MC mussten auf Grund dieser Erkrankung mehr als zwei Wochen stationär im Krankenhaus verbringen. Bei CU-Patienten betraf das nur ein Viertel der Kinder. 9% der Kinder mit MC wurden an Hand des PCDAI-, bzw. CDAI-Scores in die Gruppe der schweren Krankheitsaktivität eingestuft. Bei Kindern mit CU wurde hierfür der PUCAI-Score, bzw. der CAI-Score angewandt. Keiner der CU-Patienten hatte einen Punktwert der für eine schwere Krankheitsaktivität sprechen würde (Tab. 8).

Tab. 8: Vergleich der Patienten mit MC und CU. Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten der gastroenterologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin und der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm. MC: Morbus Crohn; CU: Colitis ulcerosa; ED: Erstdiagnose; MTX: Methotrexat; (P)CDAI: (Pediatric) Crohn's disease activity index; (PU)CAI: (Pediatric ulcerative) colitis activity index.

<b>Diagnose</b>	<b>MC</b>	<b>CU</b>
<b>n=106</b>	<b>n= 88</b>	<b>n= 18</b>
Alter bei ED (Summe/Mittelwert)	14,3	9,4
Alter aktuell (Summe/Mittelwert)	25,8	18,8
Geschlecht weiblich	51%	33%
Geschlecht männlich	49%	67%
Befallsmuster:		
L1	16%	
L1 + L4	7%	
L2	10%	
L2 + L4	6%	
L3	45%	
L3 + L4	16%	
L4	1%	
E1		11%
E2		11%
E3		78%
backwash ileitis		17%
Extraintestinale Manifestationen	30%	28%
Untergewicht bei ED	38%	13%
Untergewicht im Verlauf	19%	14%
Osteoporose (z<-2)	26%	6%
Steroidabhängig	73%	33%
Azathioprin / MTX	58%	39%
Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper	21%	11%
OP	40%	6%
Komplikationen	44%	0%
Durchschnittliche Krankheitsdauer in Jahren	4,85	9,67
>2 Wochen Hospitalisation	55%	25%
Absolute Hospitalisation (Median)	17	7
Aktivitätsscore (PCDAI/CDAI/PUCAI/CAI)		
Median	15,5/117	18,8/2,6
Mittelwert	17,8/125,9	17,8/2,6
PCDAI $\geq$ 30/CDAI $\geq$ 220/PUCAI $\geq$ 35/CAI $\geq$ 4	9%	0%



## 3.2 Erwachsene Patienten

### 3.2.1 MC-Patienten

Tab. 9: Vergleich der erwachsenen MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten der gastroenterologischen Abteilung der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm. NOD2: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2; SNPs: Single nucleotid polymorphisms; wt: Wildtyp; ED: Erstdiagnose; MTX: Methotrexat; CDAI: Crohn's disease activity index.

<b>NOD2 Gendiagnostik n=104</b>	<b>NOD2 SNPs n= 42</b>	<b>NOD2 wt n= 62</b>
Alter bei ED (Mittelwert)	32,3	31,7
Geschlecht weiblich	55%	57%
Geschlecht männlich	45%	43%
Befallsmuster:		
L1	42%	23%
L1 + L4	0%	2%
L2	5%	16%
L2 + L4	0%	0%
L3	50%	56%
L3 + L4	0%	4%
L4	3%	0%
Extraintestinale Manifestationen	24%	27%
Osteoporose ( $t < -2,5$ )	16%	16%
Osteopenie ( $-2,5 < t < -1$ )	40%	46%
Steroidabhängig	92%	81%
Azathioprin / MTX	43%	61%
Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper	0%	13%
OP	56%	55%
Komplikationen	41%	52%
Durchschnittliche Krankheitsdauer in Jahren	14,85	14,44
CDAI (Median)	135,7	139
CDAI (Mittelwert)	138,2	136
CDAI <149	62%	60%
CDAI 150-220	26%	31%
CDAI >220	12%	10%

Es wurden insgesamt 104 erwachsene Patienten mit MC untersucht, davon hatten 42 eine Veränderung im NOD2-Gen und 62 einen genetischen Wildtyp. Zwischen den beiden Patientengruppen lässt sich kein wesentlicher Unterschied im Alter bei Erstdiagnose feststellen (Tab. 9 und Abb. 9).

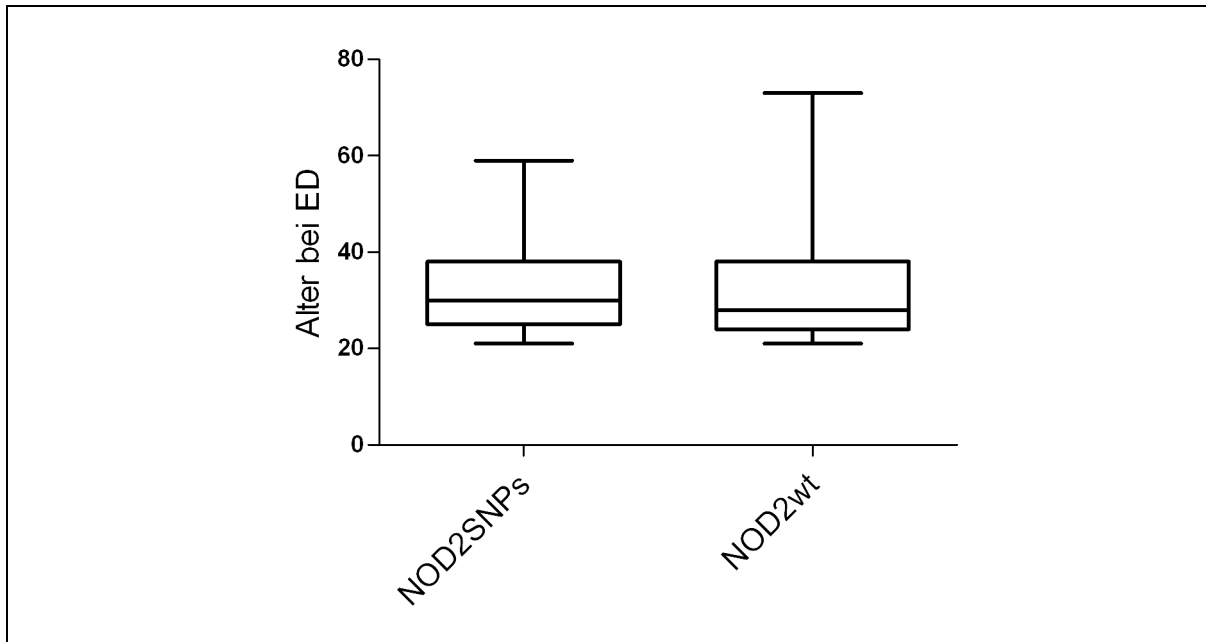


Abb. 9: Vergleich des Alters bei Erstdiagnose der erwachsenen MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. NOD2: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2; SNPs: Single nucleotid polymorphisms; wt: Wildtyp; ED: Erstdiagnose.

Die Geschlechtsverteilung ist in beiden Patientengruppen ungefähr gleich. Frauen sind jeweils etwas häufiger vertreten.

Die nähere Betrachtung des Befallsmusters zeigt, dass bei Erkrankten mit einer NOD2-Veränderung mit 42% das terminale Ileum alleine häufiger befallen ist als bei Patienten mit NOD2-Wildtyp mit 23%. Ein ileokolischer Befall war bei Patienten mit genetischem Wildtyp etwas häufiger, aber der Unterschied war gering. Das Kolon war mit 16% bei Patienten mit Wildtyp häufiger betroffen als bei Patienten mit NOD2-Genveränderung mit 5% (Tab. 9).

Die Knochendichte weist in den beiden Patientengruppen kaum Unterschiede auf. Das Auftreten von Osteoporose liegt in beiden Gruppen bei 11%, das Vorkommen von Osteopenie bei 46%, bzw. 40% (Abb. 10).

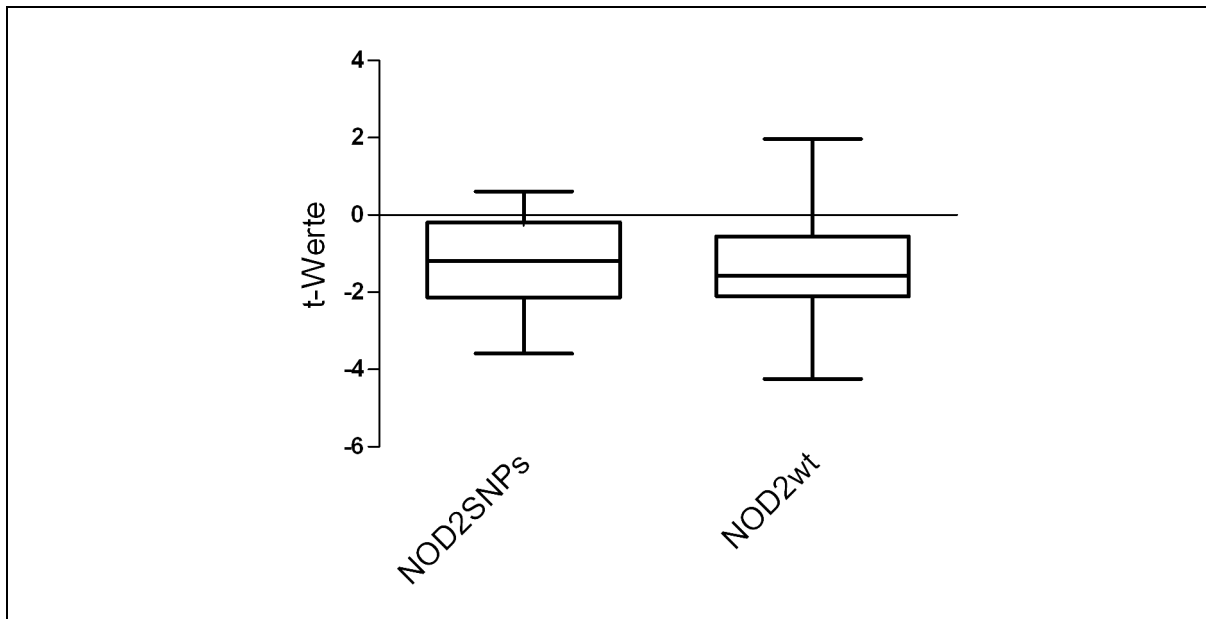


Abb. 10: Vergleich der Knochendichtewerte der erwachsenen MC-Patienten mit NOD2-Genveränderung und NOD2-Wildtyp. NOD2: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2; SNPs: Single nucleotid polymorphisms; wt: Wildtyp

In der Gruppe der Patienten mit NOD2-Veränderung werden in 92% der Fälle Steroide eingesetzt. Bei den Patienten mit genetischem Wildtyp in 81% der Fälle. Azathioprin und MTX werden jedoch 18% häufiger, Anti-TNF-alpha-Antikörper 13% häufiger bei Patienten ohne Genveränderung eingesetzt als bei Patienten mit Genveränderung.

Eine OP auf Grund der Erkrankung war bei beiden Patientengruppen etwa gleich häufig notwendig. Bei 41% der Patienten mit Genveränderung und bei 52% der Patienten ohne Genveränderung traten Komplikationen im Krankheitsverlauf auf. Extraintestinale Manifestationen kamen in beiden Patientengruppen etwa gleich häufig vor (Tab. 9). Der CDAI zeigt keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tab. 9).

Das Erwachsenenkollektiv kann auch nach der Knochendichte aufgeteilt werden. Hierbei gibt es drei Gruppen, Patienten mit normaler Knochendichte, Patienten mit Osteopenie und Patienten mit Osteoporose (Tab. 10).

In der Gruppe der Patienten mit Osteoporose waren Männer und Frauen gleich häufig vertreten. Osteopenie hatten mehr Männer als Frauen. In der Gruppe der Patienten mit normaler Knochendichte waren Frauen häufiger. Einen unkomplizierten Verlauf gab es etwas häufiger bei den Patienten mit normaler Knochendichte. Einen chronisch aktiven Verlauf gab es am Häufigsten bei

Patienten mit Osteoporose und am Wenigsten bei Patienten mit normaler Knochendichte. Insgesamt lagen aber alle Werte die die Verlaufsformen betreffen sehr eng beieinander (Tab. 10).

90% der Patienten mit Osteoporose haben Steroide erhalten, ebenso 88% der Patienten mit Osteopenie. Alle Patienten mit normaler Knochendichte benötigten Steroide. Azathioprin und MTX wurden bei Patienten mit Osteopenie, und Osteoporose bei 72%, bzw. 70% gebraucht. Lediglich 46% der Patienten mit normaler Knochendichte bekamen diese Medikamente. Anti-TNF-alpha-Antikörper wurde bei Patienten mit normaler Knochendichte etwas häufiger eingesetzt als in den beiden anderen Patientengruppen (Tab. 10).

Erkrankte mit Osteoporose wurden häufiger operiert als Patienten mit Osteopenie und normaler Knochendichte. Komplikationen traten am Meisten bei den Erkrankten mit Osteopenie auf. Extraintestinale Manifestationen waren in der Gruppe mit normaler Knochendichte bei 46% zu beobachten, bei den Patienten mit Osteopenie bei 31% und bei Patienten mit Osteoporose nur bei 10% (Tab. 10). Der CDAI zur Beurteilung der Krankheitsaktivität war bei Patienten mit Osteoporose am Höchsten (Tab. 10).

Tab. 10: Vergleich der erwachsenen MC-Patienten mit normaler Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose. Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten der gastroenterologischen Abteilung der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm. MTX: Methotrexat; CDAI: Crohn's disease activity index.

	<b>Normale Knochendichte</b>	<b>Osteopenie</b>	<b>Osteoporose</b>
<b>n=60</b>	<b>n= 24</b>	<b>n= 26</b>	<b>n= 10</b>
Geschlecht weiblich	67%	46%	50%
Geschlecht männlich	33%	54%	50%
Befallsmuster:			
L1	32%	44%	67%
L1 + L4	5%	0%	0%
L2	18%	4%	0%
L2 + L4	0%	0%	0%
L3	41%	52%	33%
L3 + L4	5%	0%	0%
L4	0%	0%	0%
Unkomplizierter Verlauf	14%	12%	11%
Chronisch aktiv	86%	88%	89%
Extraintestinale Manifestationen	46%	31%	10%
Steroidabhängig	100%	88%	90%
Azathioprin/MTX	46%	72%	70%
Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper	38%	20%	30%
OP	50%	57%	67%
Komplikationen	38%	50%	30%
Durchschnittliche Krankheitsdauer in Jahren	12,29	18,65	19,20
CDAI (Median)	130,6	135,0	154
CDAI (Mittelwert)	139,2	135,5	143
CDAI <149	71%	69%	40%
CDAI 150-220	17%	23%	60%
CDAI >220	13%	8%	0%

### **3.2.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten**

Im Vergleich der MC-Patienten mit den CU-Patienten zeigt sich, dass die Erwachsenen mit CU im Durchschnitt zum Zeitpunkt der Erstdiagnose älter waren als die MC-Patienten.

Extraintestinale Manifestationen traten bei CU-Patienten zu 7% häufiger auf als bei MC-Patienten. Osteoporose wurde bei 29% der CU-Patienten festgestellt, im Vergleich zu 16% bei MC-Patienten. Osteopenie trat in den beiden Patientengruppen in etwa gleich häufig auf. Diese Beobachtung kann nicht auf ein höheres Lebensalter oder die Geschlechtsverteilung zurückgeführt werden, da unter den CU-Patienten weniger Frauen als Männer waren und sich die Osteoporose und Osteopenie in allen Altersschichten zeigte.

Steroide wurden bei 86% der MC-Patienten und 81% der CU-Patienten eingesetzt. Azathioprin und MTX wurden bei MC-Patienten 10% häufiger eingesetzt als bei CU-Patienten. Auch Anti-TNF-alpha-Antikörper wurde mit 8% bei MC-Patienten etwas häufiger angewendet als mit 6% bei CU-Patienten. Komplikationen traten bei 47% der MC-Patienten auf. Bei den CU-Patienten wurden keine Komplikationen beobachtet. MC-Patienten mussten sich in 55% der Fälle auf Grund ihrer Erkrankung einer Operation unterziehen. Dies war nur bei 13% der CU-Patienten der Fall. Eine mittelschwere bis schwere Aktivität der Erkrankung wurde an Hand des CDAI-Scores bzw. des CAI-Scores bei 11% der MC-Patienten und 18% der CU-Patienten festgestellt (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich der erwachsenen Patienten mit MC und CU. Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten der gastroenterologischen Abteilung der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums Ulm. MC: Morbus Crohn; CU: Colitis ulcerosa; ED: Erstdiagnose; MTX: Methotrexat; CDAI: Crohn's disease activity index; CAI: colitis activity index,

<b>Diagnose</b>	<b>MC</b>	<b>CU</b>
<b>n=122</b>	<b>n= 104</b>	<b>n= 18</b>
Alter bei ED (Mittelwert)	32	37
Geschlecht weiblich	56%	44%
Geschlecht männlich	44%	56%
Befallsmuster:		
L1	31%	
L1 + L4	1%	
L2	12%	
L2 + L4	0%	
L3	54%	
L3 + L4	2%	
L4	1%	
E1		13%
E2		69%
E3		19%
backwash ileitis		0%
Extraintestinale Manifestationen	26%	33%
Osteoporose (z<-2)	16%	29%
Osteopenie	44%	43%
Steroidabhängig	86%	81%
Azathioprin / MTX	54%	44%
Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper	8%	6%
OP	55%	13%
Komplikationen	47%	0%
Durchschnittliche Krankheitsdauer in Jahren	14,61	12,56
Aktivitätsscore (CDAI/CAI)		
Median	138,7	3
Mittelwert	136,9	2,5
CDAI>220/CAI $\geq$ 4	11%	18%

## **4. Diskussion**

Wir haben hier die erste vergleichende, unizentrische Studie von Kindern und Erwachsenen mit CED hinsichtlich NOD2 Polymorphismen und Osteoporose in den Spezialambulanzen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen für Kinder—und Jugendliche als auch Erwachsene an einem tertiären Zentrum der Maximalversorgung durchgeführt. Möglicherweise ergibt sich durch dieses Studiendesign ein Effekt zu besonders schweren Krankheitsverläufen. Die Daten anderer veröffentlichter Multizenterstudien zu CED werden jedoch ebenfalls aus tertiären Zentren bezogen. Das Studiendesign unterscheidet sich jedoch gegenüber diesen Multizenterstudien vor allem in einer einheitlichen und guten Datenqualität und den Überblick über einen mehrjährigen Krankheitsverlauf von durchschnittlich fast 5 Jahren. Dennoch ist die Kohortengröße etwas geringer als in einigen anderen Studien, da nicht alle Patienten die Studienkriterien erfüllten .

### **4.1. Pädiatrische Patienten**

#### **4.1.1 MC-Patienten**

In dem untersuchten Kollektiv zeigte sich, dass die Patienten mit NOD2-Veränderung im Schnitt älter waren bei Erstdiagnose. Diese Beobachtung findet keine Bestätigung in den bisher durchgeführten Studien bei denen kein wesentlicher Unterschied im Alter bei Erstdiagnose festgestellt wurde [56, 61] oder die Patienten bei Erstdiagnose jünger waren [3, 35]. Es wurde ein deutlich häufigerer Befall des terminalen Ileums bei Patienten mit Genveränderung im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp festgestellt. Diese Beobachtung wurde auch in den bisherigen Studien schon häufig beschrieben [3, 24, 35, 44, 56, 61, 69]. Im Bereich des unteren GI-Traktes lässt sich auch ein etwas häufigerer Befall bei Patienten mit NOD2-Veränderung feststellen. Lesage et al beschreiben jedoch, dass der untere GIT bei Patienten mit Genveränderung seltener befallen ist [35], das Befallsmuster wurde in dieser Studie allerdings nicht nach der Montreal-Klassifikation eingeteilt. Es findet sich keine Korrelation zwischen NOD2-Veränderung und einer Häufung von extraintestinalen Manifestationen wie auch von Sun et al, Tomer et al und Lesage et al [35, 56, 61] beschrieben.

Tomer et al [61] beschreiben in ihrem Kollektiv, dass 56% der Patienten mit Genveränderung Untergewicht (BMI<10.P) haben, im Gegensatz zu 30% der



Patienten mit Wildtyp. Dieses Ergebnis lässt sich in unserem Patientenkollektiv ähnlich deutlich bestätigen. Wir stellten bei 50% der Patienten mit Genveränderung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Untergewicht fest im Gegensatz zu 31% bei den Patienten mit genetischem Wildtyp. Auch im Verlauf der Erkrankung hatten noch 31% der Patienten mit NOD2-Polymorphismus und 12% der Patienten mit NOD2 Wildtyp Untergewicht. Roesler et al sowie Wine et al [51, 69] konnten in ihren Studien ebenfalls die Beobachtung machen dass Patienten mit Genveränderung häufiger von Untergewicht betroffen sind, jedoch nicht so ausgeprägt wie in der hier durchgeführten Studie. Bei Roesler et al fanden sich bei Erstdiagnose mehr Patienten mit einem BMI unter der 3. Perzentile in der Patientengruppe mit NOD2-Veränderung. Dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant. Bei Wine et al fand sich ebenfalls nur ein nicht signifikanter Unterschied. 16,1% der Patienten mit NOD-Veränderung hatten Untergewicht im Vergleich zu 10,2% der Patienten mit NOD2-Wildtyp. Dieser Zusammenhang zwischen NOD2-Genveränderung und Untergewicht könnte zum einen aus dem stärkeren Befall des Ileums und des oberen GITs allgemein resultieren oder aber durch die hohe Entzündungsaktivität im Körper bedingt sein. Tomer et al beschreiben ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Wachstumsretardierung bei Patienten mit NOD2-Variation. Dieser Befund lässt sich in unserem Kollektiv nicht bestätigen.

Eine zentrale Frage dieser Studie ist, ob Kinder mit NOD2-Genveränderung eine schwerere Krankheitsaktivität haben. Als Indikatoren dafür wurde der PCDAI-, bzw. CDAI-Score, die Medikation, die Häufigkeit von OPs und die Hospitalisation untersucht. 13% der Patienten mit NOD2-Veränderung haben einen PCDAI-Score über 30 oder einen CDAI-Score über 220 und somit eine mittelschwere bis schwere Krankheitsaktivität. Auch der durchschnittliche Aktivitätsscore liegt bei Patienten mit Genveränderung deutlich höher als bei Patienten ohne Genveränderung. Es gibt wesentlich mehr Patienten mit NOD2-Veränderung die mehr als 2 Wochen stationär im Krankenhaus waren als in der Patientengruppe mit Wildtyp. Die durchschnittliche Krankheitsdauer in beiden Patientengruppen war nahezu gleich. Komplikationen wie Fisteln und Strikturen kamen in der Gruppe der Patienten mit NOD2-Veränderung häufiger vor. Auch Operationen auf Grund der CED waren in der Gruppe der Patienten mit NOD2-Veränderung häufiger nötig. Diese Feststellung machten auch Sun et al, Annese et al [3, 56]

und Lacher et al [32] wohingegen Tomer et al und Lesage et al [35, 61] keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der OPs fanden. Die erhöhte Krankheitsaktivität bei Patienten mit Genveränderung findet auch Ausdruck darin, dass die Steroidresistenz und immunsuppressive Dauertherapie mit Azathioprin, Methotrexat oder Anti-TNF-alpha-Antikörpern deutlich häufiger nötig war. Diese Beobachtung deckt sich mit der Studie von Tomer et al [61], die ebenfalls von einem vermehrten Einsatz dieser Medikamente in der Patientengruppe mit NOD2-Veränderung berichten. Somit lässt sich feststellen, dass eine Veränderung im NOD2-Gen in unserem Patientenkollektiv mit einer schwereren Krankheitsaktivität einhergeht. Roesler et al und Annese et al [3, 51] kamen zu der gleichen Schlussfolgerung. Wine et al und Lesage et al [35, 69] jedoch, konnten keinen Zusammenhang zwischen einer NOD2-Veränderung und der Schwere der Erkrankung feststellen. Lesage et al zogen zur Beurteilung der Krankheitsschwere jedoch lediglich die Medikation heran. Wine et al beurteilten die Krankheitsschwere ebenfalls anhand der Medikation, bezogen aber zusätzlich noch die Hospitalisation von mehr als 2 Wochen mit ein. Es gibt bisher aber nur eine Studie bei Kindern, die wie in der hier durchgeführten Studie zur Beurteilung der Krankheitsaktivität von Patienten mit und ohne NOD2-Genveränderung den PCDAI miteinbezogen hat [51]. Häufig wurden Aussagen zur Krankheitsaktivität nur auf Grund der Analyse der Medikation, der Notwendigkeit zur operativen Therapie, der Hospitalisation oder dem Auftreten von Komplikationen getroffen [3, 35, 61, 69].

37% aller Patienten mit NOD2-Veränderung haben eine Osteoporose. In der Gruppe mit NOD-Wildtyp sind es nur 19%. Diese Beobachtung wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Es stellt sich die Frage was die Ursache für das häufige Auftreten dieser gravierenden Begleiterscheinung bei kindlichem MC ist und wie man sie verhindern könnte. Die erste Theorie ist, dass durch den häufigeren Befall des Dünndarms die Aufnahme von Calcium im Darm gestört ist. Die zweite Theorie ist, dass die Osteoporose als Nebenwirkung der Steroide zu sehen ist. Gegen diese beiden Theorien als alleiniges Erklärungsmodell spricht aber, dass sich in dem hier vorliegenden Kollektiv auch Patienten mit Osteoporose finden bei denen der Dünndarm nicht befallen ist und die keine Steroide bekommen hatten. Außerdem hatten alle Patienten mit Osteoporose normale Serumcalciumwerte. Es muss also noch einen anderen Grund für die

Verminderung der Knochendichte geben, nämlich die Entzündungsreaktion selbst. Der mögliche zu Grunde liegende Mechanismus wurde in der Einleitung bereits erläutert. Durch die Mediatoren  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{RANK}$ ,  $\text{RANKL}$  und Osteoprotegrin wird Knochenmasse abgebaut. Da eine Veränderung im NOD2-Gen die NF- $\kappa$ B Signalkaskade verstärkt, könnte dies zu einer vermehrten Krankheitsaktivität bei diesen Patienten führen und damit eine Osteoporose begünstigen. Daraus lässt sich ableiten, dass eine intensive antientzündliche Therapie, zum Beispiel mit anti-TNF-alpha Antikörpern, sinnvoll ist um Osteoporose zu verhindern. In der Gruppe der Patienten mit NOD2-Veränderung hatten sieben Patienten Anti-TNF-alpha-Antikörper erhalten, nur zwei davon hatten eine Osteoporose. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine frühzeitige intensivere antientzündliche Therapie die Osteoporoseentstehung verhindert. Diese Hypothese sollte an einem größeren pädiatrischen Kollektiv prospektiv geprüft werden.

Betrachtet man das Kollektiv nun unabhängig von der NOD2-Genveränderung im Hinblick auf die Knochendichte lässt sich feststellen, dass gut ein Viertel der Patienten mit Morbus Crohn eine Osteoporose haben. Die DEXA-Methode zur Bestimmung der Knochendichte birgt vor allem bei Kindern mit Wachstumsstörungen ein Problem. Sie ist nur eine zweidimensionale Messmethode. Somit kann ein niedriger Knochendichtewert tatsächlich ein Zeichen für eine Osteopenie oder Osteoporose sein, oder aber nur auf Grund einer geringeren Knochengröße zustande kommen. Folglich wird bei Patienten mit Wachstumsstörungen eine niedrige Knochendichte gemessen, obwohl gar keine Osteoporose vorliegt. Deshalb wird die Prävalenz von Osteoporose bei chronisch kranken Kindern mit Wachstumsstörungen oft überschätzt. Da in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv fast keine Kinder mit Minderwuchs vorhanden sind, besteht kein Anhalt für Bedenken, dass in der hier durchgeführten Studie das Problem der Osteoporose zu hoch eingeschätzt wurde.

Es stellt sich die Frage, ob sich auch in den nach Knochendichte aufgeteilten Patientengruppen Anhaltspunkte dafür finden lassen, dass eine starke Krankheitsaktivität die hauptsächliche Ursache für die Verminderung der Knochendichte ist. Das terminale Ileum ist bei Patienten mit normaler Knochendichte häufiger befallen als bei Patienten mit Osteoporose. Bei drei

Patienten mit Osteoporose war ausschließlich der untere GIT befallen. Somit ist der Befall des Dünndarms und damit die verminderte Nährstoffaufnahme nicht der entscheidende Faktor für Osteoporose bei kindlichem MC.

In der Gruppe mit pathologischer Knochendichte waren 62% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose untergewichtig, 40% mehr als in der Gruppe mit normaler Knochendichte. Auch im Verlauf der Erkrankung hatten die Kinder mit Osteoporose noch deutlich häufiger Untergewicht als die Kinder mit normaler Knochendichte. Patienten mit Osteoporose und Untergewicht waren aber nicht wesentlich häufiger im oberen GIT befallen als Patienten ohne Osteoporose und Untergewicht. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass Untergewicht bei Patienten mit Osteoporose häufiger auftritt, aber kein Zusammenhang zum Befallsmuster besteht. Auch Civitelli et al, Lopes et al und Paganelli et al [19, 38, 46, 47] beschreiben in ihren Studien einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen BMI und verminderter Knochendichte.

Man muss nun auch hier die Frage stellen ob der Grund für die Osteoporose eine erhöhte Krankheitsaktivität ist. Paganelli et al haben diese Theorie in ihrer Studie bestätigt [47]. Als Indikatoren für die Krankheitsaktivität wurden wieder der PCDAI-Score, die Medikation, die Häufigkeit von OPs und die Hospitalisation herangezogen. Der PCDAI-, bzw. CDAI-Score war bei Osteoporose-Patienten im Durchschnitt deutlich höher im Vergleich zu Patienten mit normaler Knochendichte. 21% der Patienten mit Osteoporose hatten einen PCDAI von mehr als 30 oder einen CDAI über 220 und somit eine mittelschwere bis schwere Krankheitsaktivität. Paganelli et al [47] beschreiben in ihrer Studie ebenfalls, dass die Patienten, die auf Grund des PCDAI als schwer erkrankt eingestuft wurden, eine geringere Knochendichte hatten. Auch bei der Hospitalisation zeigt sich, dass mehr Patienten mit verminderter Knochendichte über zwei Wochen auf Grund der CED im Krankenhaus waren, obwohl die durchschnittliche Krankheitsdauer in dieser Patientengruppe niedriger war als bei Patienten mit normaler Knochendichte. Diese beiden Indikatoren sprechen für die Theorie, dass die Osteoporose durch eine erhöhte Krankheitsaktivität bedingt sein kann. Aber nur 17% der Patienten mit Osteoporose brauchte eine OP im Vergleich zu fast 47% der Patienten mit normaler Knochendichte. Auch Komplikationen wie Fisteln und Strikturen waren bei Patienten mit Osteoporose deutlich seltener. Bei der Medikation fällt auf, dass die Patienten mit Osteoporose etwas häufiger Steroide

bekommen hatten. Zum einen könnte es dadurch als Nebenwirkung zu einer verminderten Knochendichte gekommen sein, ein vermehrter Bedarf an Steroiden ist aber auch ein Hinweis auf eine erhöhte Krankheitsaktivität, die wiederum Ursache der Osteoporose sein könnte. Zu dieser Feststellung kamen auch Lopes et al [38]. Walther et al jedoch beschreiben in dem von ihnen untersuchten Patientenkollektiv, dass die Patienten ohne Steroidtherapie genauso oft Osteoporose hatten wie Patienten mit Steroidtherapie [67]. Paganelli et al [46] fanden ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Gabe von Kortikosteroiden und Osteoporose. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten in der Auswahl der Patienten begründet sein. Walther et al hatten 56 Patienten mit MC und 30 Patienten mit CU in ihre Studie eingeschlossen. Sie beschreiben, dass 23% der Patienten Knochenprotektive Mittel wie Kalzium oder Vitamin D erhielten. Alle dieser Patienten waren in der Gruppe mit Steroidtherapie. Diese Mittel könnten einen Beitrag zum Ausgleich der Knochendichte beigetragen haben. Des Weiteren wurden Patienten mit einer Wirbelfraktur oder einer Spondylarthropathie in der Vorgeschichte ausgeschlossen. Außerdem wurden 31% der Patienten erst seit 5 Wochen oder weniger mit Steroiden therapiert, so dass eine Osteoporose als Nebenwirkung noch nicht entstanden sein könnte. In der Studie von Paganelli et al waren nur 18 MC- und 16 CU-Patienten eingeschlossen. Bei Lopes et al waren es nur 14 MC- und 26 CU-Patienten, dennoch wurde in dieser Studie eine statistisch signifikante Korrelation von kumulativer Steroiddosis und einer niedrigen Knochendichte gezeigt. Sowohl Walther et al als auch Paganelli et al konnten bei ihren Ergebnissen keine statistische Signifikanz erreichen. Vihinen et al fanden heraus, dass der Knochenaufbau bei Kindern mit CED schon vor der Verabreichung von Steroiden erniedrigt ist [66]. Dies entspricht auch den Ergebnissen aus unseren Daten, da auch hier schon bei Erstdiagnose das Vorliegen einer Osteoporose festgestellt werden konnte. Anti-TNF-alpha Antikörper wurden bei Patienten mit Osteoporose ebenfalls etwas häufiger verabreicht als bei Patienten mit normaler Knochendichte. Bernstein et al sowie Abreu et al [2, 12] haben an einem Patientenkollektiv von Erwachsenen ebenfalls bestätigt, dass die Gabe von Anti-TNF-alpha-Antikörpern einen positiven Effekt auf die Knochendichte hatte. Azathioprin und Methotrexat wurden in beiden Patientengruppen in etwa gleich häufige gegeben,

Zusammenfassend kann man feststellen, dass bei pädiatrischen Patienten mit MC einige Ergebnisse dafür sprechen, dass die Mutation im NOD2-Gen mit einer erhöhten Krankheitsaktivität einhergeht und eine erhöhte Krankheitsaktivität der Hauptgrund für die Verminderung der Knochendichte in dieser Gruppe ist. Insbesondere bei untergewichtigen Kindern sollte an das Vorliegen einer Osteoporose gedacht werden. Zur weiteren Klärung der Rolle von inflammatorischen Zytokinen bei NOD2-Genveränderungen und in der Pathogenese der Osteoporose sind weitere Untersuchungen notwendig.

#### **4.1.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten**

Bisher durchgeführte Studien haben gezeigt, dass NOD2-Veränderungen nicht mit CU assoziiert sind und in dieser Patientengruppe nur selten auftreten [3, 35]. Annese et al fanden bei CU-Patienten mit Genveränderung keine spezifischen klinischen Ausprägungsmerkmale [3]. Da in dem hier untersuchten Kollektiv nur zwei CU-Patienten eine Veränderung im NOD2-Gen hatten, wurde auf einen Vergleich der Patienten mit Genveränderung zu denen mit Wildtyp verzichtet. Stattdessen dienen die CU-Patienten in dieser Studie als Vergleichsgruppe um die Besonderheiten der an MC erkrankten Kinder herauszustellen.

Die CU-Patienten waren im Schnitt jünger bei Erstdiagnose der Erkrankung. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisherigen Erkenntnissen in der Literatur [30, 42]. Um zu beurteilen welche Patienten eine schwerere Krankheitsaktivität haben wurden auch hier wieder der PCDAI-, bzw. CDAI-Score und der PUCAI-, bzw. CAI-Score, die Medikation, die Häufigkeit von OPs und die Hospitalisation von mehr als zwei Wochen als Indikatoren herangezogen. Ab einem PCDAI-Score von  $\geq 30$ , einem CDAI-Score von  $\geq 220$ , einem PUCAI-Score von  $\geq 35$  und einem CAI-Score von  $\geq 4$  spricht man von einer mittelschweren bis schweren Krankheitsaktivität. Im CU-Kollektiv fand sich kein Patient der in diese Gruppe eingestuft wurde. Wohingegen 9% der MC-Patienten auf Grund des Aktivitätsscores eine mittelschwere bis schwere Aktivität zugesprochen wurde. Es lässt sich auch feststellen, dass mit 55% gegenüber 25% deutlich mehr MC-Patienten auf Grund ihrer Erkrankung mehr als 2 Wochen stationär im Krankenhaus verbringen mussten. Nur 6% der an CU erkrankten Kinder musste operiert werden im Gegensatz zu 40% der MC-Patienten. Betrachtet man die Medikation fällt auf, dass die Kinder mit MC sowohl mehr Steroide, als auch mehr

Azathioprin, MTX und Anti-TNF-alpha-Antikörper benötigten. Somit muss man zu der Feststellung kommen, dass in dem hier untersuchten Kollektiv die Kinder mit MC eine deutlich schwerere Krankheitsaktivität als die Kinder mit CU haben.

Extraintestinale Manifestationen traten in beiden Patientengruppen in etwa gleich häufig auf, mit einer leichten Tendenz zu einer Häufung bei Patienten mit MC. Bernstein et al jedoch fanden in ihrer Studie ein vermehrtes Vorkommen von extraintestinalen Manifestationen bei Patienten mit CU [10]. Des Weiteren fällt auf, dass die Kinder mit CU deutlich seltener von Untergewicht betroffen sind, sowohl bei Erstdiagnose als auch im Verlauf. Bei den Patienten mit MC hatten 26 % Osteoporose aber lediglich 6% der Kinder mit CU hatten dieses Problem. Paganelli et al [47] haben beschrieben, dass bei CU-Patienten erhöhte IL-6-Level, die ein Hinweis auf eine Entzündung sind, und ein hoher Powell-Tuck-Index, einem Aktivitätsscore für CU, mit einer Verminderung der Knochendichte einhergehen. Man kann somit vermuten, dass auch bei CU die Osteoporose hauptsächlich durch die Entzündung hervorgerufen wird. Insgesamt muss man dennoch sagen, dass das Problem der Osteoporose bei Patienten mit CU in dem hier untersuchten Kollektiv eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Feststellung wurde auch schon von Walther et al beschrieben, die in ihrem Patientenkollektiv Osteoporose häufiger bei MC-Patienten fanden [67]. Paganelli et al [46] beschreiben jedoch keinen Unterschied in der Knochendichte zwischen Patienten mit MC und Patienten mit CU.

## **4.2 Erwachsene Patienten**

### **4.2.1 MC-Patienten**

Bei der Betrachtung der Patienten mit CED-Beginn im Erwachsenenalter zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich zu den pädiatrischen Patienten.

MC-Patienten mit Veränderung im NOD2-Gen haben zwar ebenfalls das typische Befallsmuster bei dem der obere GIT mit dem terminalen Ileum häufiger betroffen ist. Der Unterschied ist aber nicht so deutlich wie bei Kindern. Der untere GIT ist insgesamt bei den Erwachsenen seltener befallen. Das Alter bei Erstdiagnose war bei den Patienten mit Wildtyp und bei den Patienten mit Genveränderung in etwa gleich. Lesage et al und Annese et al [3, 35] beschreiben jedoch ein durchschnittlich jüngeres Alter bei ED. Kinder mit MC hatten im Durchschnitt ein in etwa gleich häufiges Auftreten von extraintestinalen Manifestationen, unabhängig

vom NOD2-Gen. Das gleiche Bild zeigt sich bei den Erwachsenen. Auch hier zeigt sich kaum ein Unterschied im Vorkommen von extraintestinalen Manifestationen. Insgesamt hatten die Erwachsenen mit MC weniger extraintestinale Manifestationen als die Kinder. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Guariso et al. [23]. Die Ergebnisse zur Knochendichte weichen bei den Erwachsenen stark von denen bei Kindern ab. Sowohl Osteopenie als auch Osteoporose kommen bei Patienten mit Veränderung im NOD2-Gen etwa gleich häufig vor wie bei Patienten mit genetischem Wildtyp, Osteopenie war sogar bei Patienten mit Wildtyp etwas häufiger. Betrachtet man die Medikation die die erwachsenen Patienten erhalten haben zeigt sich, dass diejenigen mit NOD2-Veränderung zwar ebenso wie bei den Kindern mehr Steroide erhalten haben, Azathioprin, Methotrexat und Anti-TNF-alpha-Antikörper jedoch wurden bei Patienten mit genetischem Wildtyp häufiger eingesetzt im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Kindern. Operationen auf Grund der CED mussten bei Erwachsenen mit NOD2-Genveränderung ebenso häufig durchgeführt werden wie bei Erwachsenen mit NOD2-Wildtyp. Bei den Kindern waren Operationen in der Gruppe der Patienten mit NOD2-Polymorphismus deutlich häufiger notwendig. Bei den Komplikationen fällt auf, dass die Erwachsenen mit genetischem Wildtyp eindeutig häufiger betroffen waren. Im Vergleich dazu kamen Komplikationen bei den Kindern in der Gruppe der Patienten mit NOD2-Veränderung häufiger vor. Der Aktivitätsindex CDAI zeigt kaum Unterschiede zwischen Erwachsenen mit NOD2-Veränderung und NOD2-Wildtyp. Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Veränderung im NOD2-Gen bei Erwachsenen ebenfalls mit dem typischen Befallsmuster vergesellschaftet ist. Auf die Krankheitsschwere und die Knochendichte hat diese Veränderung jedoch keine Auswirkungen.

Betrachtet man das Patientenkollektiv der Erwachsenen unabhängig von NOD2-Veränderungen nur nach Knochendichte aufgeteilt, zeigt sich zunächst erwartungsgemäß, dass Patienten mit normaler Knochendichte eher unkomplizierte Verläufe haben und Patienten mit Osteopenie oder Osteoporose zu chronisch aktiven Verläufen neigen. Steroide wurden bei allen Patienten mit normaler Knochendichte eingesetzt. Aber auch die Patienten mit Osteopenie und mit Osteoporose haben zu 88%, bzw. 89% Steroide bekommen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Steroide nicht allein für die Osteoporose bei CED



verantwortlich sind. Bei der Medikation mit Azathioprin und Methotrexat zeigt sich, dass sie bei Patienten mit Osteopenie oder Osteoporose häufiger verabreicht wurden, was gegen einen protektiven Effekt spricht. Anti-TNF-alpha-Antikörper hingegen wurde bei Patienten mit normaler Knochendichte am Häufigsten verwendet und bei Patienten mit Osteopenie am Wenigsten. Vergleicht man diese Beobachtungen mit den Ergebnissen bei den pädiatrischen Patienten stellt man fest, dass hier Steroide und Anti-TNF-alpha-Antikörper bei Kindern mit Osteoporose häufiger eingesetzt wurden und Azathioprin und Methotrexat in beiden Patientengruppen in etwa gleich häufig verwendet wurden. Dies zeigt, dass sich die medikamentöse Therapie bei Erwachsenen und Kindern unterscheiden. Dies mag auch darin begründet sein, dass im Kindesalter schwere Krankheitsverläufe, bzw. Krankheitsaktivität signifikant häufiger vorkommen. Die Erwachsenen mit normaler Knochendichte haben häufiger extraintestinale Manifestationen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen bei Kindern. Im Hinblick auf Operationen zeigt sich bei den Erwachsenen dass bei Patienten mit Osteoporose operative Eingriffe am Häufigsten und bei Patienten mit normaler Knochendichte am Seltensten notwendig waren. Bei den Kindern wurden mehr Patienten mit normaler Knochendichte operiert. Der durchschnittliche CDAI-Score war bei Erwachsenen mit Osteoporose am Höchsten und zeigt somit wie bei den Kindern eine deutliche Assoziation von verringerter Knochendichte mit höheren Werten im Aktivitätsscore.

#### **4.2.2 Vergleich der MC-Patienten mit CU-Patienten**

Da auch bei den Erwachsenen nur ein Patient mit CU eine Veränderung im NOD2-Gen hatte, werden im Folgenden alle CU-Patienten mit allen MC-Patienten verglichen. An CU Erkrankte waren im Durchschnitt älter bei Erstdiagnose und hatten mehr extraintestinale Manifestationen als MC-Patienten. Es waren jedoch weniger Operationen nötig und es traten keine Komplikationen auf. Im Gegensatz dazu waren Kinder mit CU im Schnitt jünger bei ED. Sie benötigten ebenfalls weniger OPs und hatten keine Komplikationen. Extraintestinale Manifestationen traten bei Kinder mit MC und CU in etwa gleich häufig auf.

Osteopenie trat bei Erwachsenen in etwa gleich häufig bei MC und CU auf. Osteoporose war bei den Erwachsenen im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Kindern bei den Patienten mit CU häufiger. Auf Grund der wenigen CU-Patienten

bei denen die Knochendichte erhoben wurde, muss diese Beobachtung aber kritisch gesehen werden.

Betrachtet man die Medikation bei den Erwachsenen fällt auf, dass es insgesamt wenig Unterschiede in der Therapie von MC und CU gibt. Bei den Kindern war die Beobachtung eindeutig dass bei MC alle Medikamente häufiger zum Einsatz kamen. Bei den Erwachsenen mit CU hatten mehr Patienten eine mittelschwere bis schwere Aktivität der Erkrankung als bei den Erwachsenen mit MC. Bei den Kindern waren die Patienten mit MC schwerer erkrankt.

### **4.3 Schlussfolgerungen**

Anti-TNF-alpha-Antikörper werden derzeit bei Kindern mit schweren Verläufen einer CED eingesetzt, die auf andere Therapien nicht ansprechen. Es wurde in mehreren Studien festgestellt, dass Anti-TNF-alpha-Antikörper sehr effektiv eine schnelle klinische Verbesserung der Symptomatik bis hin zur Remission bewirken können, sowohl bei MC als auch bei CU. Auch die verschiedenen Indizes zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bestätigen diese Beobachtung [6, 14, 17, 26, 28, 31, 34, 37, 41, 53, 59]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass unter der Therapie mit Anti-TNF-alpha-Antikörpern die Gabe von Kortikosteroiden deutlich reduziert, bzw. ganz beendet werden konnte [14, 28, 41, 59].

Wenn man nun davon ausgeht, dass eine starke Entzündungsaktivität ein Hauptgrund für eine Verminderung der Knochendichte bei Kindern und Jugendlichen ist, wäre es sinnvoll diese Entzündungsaktivität schon früh durch Gabe von Anti-TNF-alpha-Antikörpern zu verringern und somit der Osteoporose vorzubeugen. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die immunologischen Mechanismen zu Beginn der Erkrankung von denen im Verlauf unterscheiden [45]. Dies wäre ein weiterer Grund schon früh mit der Anti-TNF-alpha-Antikörpertherapie einzusteigen.

Aber Anti-TNF-alpha-Antikörper sind auch Medikamente mit teilweise sehr schweren Nebenwirkungen und Komplikationen. Eine schwere Nebenwirkung können Infusionsreaktionen sein, die jedoch durch eine Prämedikation vermieden werden können. Es können aber auch schwere Infektionen mit opportunistischen Keimen oder eine Reaktivierung einer Tuberkulose auftreten. Außerdem sind Fälle beschrieben, bei denen es durch Gabe von Anti-TNF-alpha-Antikörpern in Kombination mit anderen Immunsuppressiva zu einem hepatosplenischen T-Zell

Lymphom gekommen ist. Das HSTL ist ein sehr aggressives Non-Hodgkin-Lymphom das selten auftritt und vor allem bei männlichen Jugendlichen vorkommt die zusätzlich Azathioprin erhielten. Meist versterben die Patienten innerhalb von 2 Jahren [68].

In Anbetracht dieser Nebenwirkungen sollte die Therapie mit Anti-TNF-alpha-Antikörpern gut überlegt sein. Unsere Daten bestätigen, dass Kinder mit CED, die eine Veränderung im NOD2-Gen haben, ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf und die damit verbundenen Probleme wie Osteoporose, Operationen und lange Krankenhausaufenthalte haben. Deshalb ist eine NOD2-Gendiagnostik zu Beginn der Erkrankung sinnvoll, um diese Patienten herauszufiltern und ihnen von Anfang an eine effektive antientzündliche Therapie z.B. mit Anti-TNF-alpha-Antikörpern zukommen zu lassen. Diese Hypothese, dass der Verlauf der Krankheit bei Trägern von NOD2-Genveränderungen durch einen frühen Beginn mit einer Azathioprin-Dauertherapie oder mit Anti-TNF-alpha-Antikörpern als First-line-Therapie abgewendet oder zumindest gemildert werden kann, sollte in einer prospektiven multizentrischen Studie untersucht werden. Die Kombination von Anti-TNF-alpha-Antikörpern mit anderen Immunsuppressiva jedoch sollte angesichts der Langzeitfolge eines T-Zell Lymphoms eher zurückhaltend verwendet werden.

Betrachtet man den Vergleich der Erwachsenen Patienten mit den Kindern muss man davon ausgehen, dass Kinder mit CED eine besondere Patientengruppe mit speziellen Risiken darstellen, die bei Diagnostik und Therapie berücksichtigt werden müssen. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass es sinnvoll ist, bei Kindern mit CED zu Beginn der Diagnose eine Analyse des NOD2-Gens durchzuführen und die Knochendichte zu messen. Im weiteren Verlauf sollte die Krankheitsaktivität regelmäßig kontrolliert werden und frühzeitig antientzündlich behandelt werden um dem erhöhten Risiko einer Osteoporoseentwicklung entgegenzuwirken.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie ist es, den Zusammenhang zwischen Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne-2-Polymorphismen (NOD2) und Krankheitsaktivität sowie Knochendichte bei pädiatrischem und adultem Beginn einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) darzustellen und daraus Konsequenzen für Diagnostik und Therapie abzuleiten.

Es wurden die Daten von 88 pädiatrischen und 104 erwachsenen Patienten mit Morbus Crohn (MC) sowie 18 pädiatrischen und 18 erwachsenen Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) erhoben. Die single-nucleotid Polymorphismen (SNPs) G908R, R702W, sowie 1007finsC im NOD2-Gen wurden untersucht. Als Kriterien für die Beurteilung der Krankheitsaktivität wurden der PCDAI (pediatric crohn's disease activity index), der CDAI (crohn's disease activity index), der PUCAI (pediatric ulcerative colitis activity index), der CAI (colitis activity index), die Medikation, Operationen, Komplikationen wie Fisteln und Strikturen, sowie eine Hospitalisation von mehr als zwei Wochen erhoben.

Die Prävalenz von heterozygoten oder homozygoten NOD2-Polymorphismen betrug 44% in der pädiatrischen und erwachsenen Patientengruppe mit MC. Bei den erwachsenen MC-Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit NOD2-Veränderung und Patienten mit NOD2-Wildtyp im Hinblick auf Alter bei Erstdiagnose, Befall des terminalen Ileums, Auftreten von extraintestinalen Manifestationen, CDAI, Komplikationen und Notwendigkeit von Operationen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Kindern mit MC deutliche Unterschiede zwischen Patienten mit NOD2-Veränderung und NOD2-Wildtyp: die Kinder mit NOD2-Polymorphismen waren im Durchschnitt 1 ½ Jahre älter bei Erstdiagnose, ein Befall des terminalen Ileums und Untergewicht bei Erstdiagnose sowie im weiteren Verlauf der Erkrankung waren häufiger. Außerdem zeigte sich, dass die Kinder in dieser Patientengruppe häufiger von Osteoporose betroffen waren, mehr Komplikationen aufwiesen und eine höhere Krankheitsaktivität hatten, die mit einer vermehrten Hospitalisation einherging. Zusätzlich hatten die Kinder mit NOD2-Polymorphismus häufiger einen chronisch aktiven Verlauf und benötigten daher vermehrt eine Langzeittherapie mit Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat oder Anti-TNF-alpha-Antikörpern um die Prednisolon-

Dosen reduzieren zu können. Um die Ursachen der Entstehung von Osteoporose weiter aufzuklären, teilten wir die pädiatrischen MC-Patienten auf in eine Gruppe mit Osteoporose und eine Gruppe mit normaler Knochendichte und verglichen diese Gruppen nach den gleichen Kriterien wie die NOD2-Gruppe. Es zeigte sich, dass 57% der Kinder mit Osteoporose Untergewicht aber keine Wachstumsretardierung hatten. Das Auftreten von Osteoporose war unabhängig vom Befallsmuster, jedoch zeigte sich wie bei den Patienten mit NOD2-Polymorphismen ein Zusammenhang mit erhöhter Krankheitsaktivität.

Diese umfangreiche retrospektive klinische unizentrische Studie mit einem sehr guten Langzeitbeobachtungszeitraum der Patienten unterstreicht die klinische Bedeutung von NOD2 Gendiagnostik für CED-Patienten mit Krankheitsbeginn in der Kindheit. Zusätzlich werden Unterschiede im Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom Krankheitsbeginn aufgezeigt. Im Gegensatz zu den erwachsenen Patienten mit MC zeigte sich, dass NOD2-Polymorphismen bei einem Auftreten von MC im Kindesalter mit einer erhöhten Krankheitsaktivität und somit auch mit der Notwendigkeit einer intensiveren Therapie einhergehen. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Studien bereits aufgezeigt. Man kann also feststellen, dass ein Auftreten der Erkrankung im Kindesalter und das Vorliegen von NOD2-Polymorphismen Risikofaktoren für einen schwereren und chronischen Krankheitsverlauf sind, Außerdem wird erstmals ein Zusammenhang zwischen NOD2-Veränderungen bei Kindern mit MC und der Entstehung von Osteoporose hergestellt, welcher am ehesten in der verstärkten Krankheitsaktivität begründet liegt.

Anhand der Ergebnisse dieser Doktorarbeit lässt sich ableiten, dass eine NOD2 Diagnostik bei Erstdiagnose sinnvoll ist, da sie prognostische und ggf. auch therapeutische Auswirkungen hat. Die Daten legen eine frühe intensive antientzündliche Therapie, z.B. mit Anti-TNF-alpha-Blockern, bei Kindern mit NOD2-Polymorphismen nahe und sollten prospektiv untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Abraham C, Cho JH. Mechanisms of Disease: IBD. *N Engl J Med* 2009;361:2066-2078.
- 2 Abreu MT, Geller JL, Vasiliauskas EA, Kam LY, Vora P, Martyak LA, Yang H, Hu B, Lin YC, Keenan G, Price J, Landers CJ, Adams JS, Targan SR. Treatment with infliximab is associated with increased markers for bone formation in patients with Crohn's Disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:55-63.
- 3 Annese V, Lombardi G, Perri F, D'Inca R, Ardizzone S, Riegler G, Giaccari S, Vecchi M, Castiglione F, Gionchetti P, Cocchiara E, Vigneri S, Latiano A, Palmieri O, Andriulli A. Variants of CARD15 are Associated with an Aggressive Clinical Course of Crohn's Disease – an IG-IBD Study. *Am J Gastroenterol* 2005;100:84-92.
- 4 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-1920.
- 5 Baim S, Leonard MB, Bianchi ML, Hans DB, Kalkwarf HJ, Langman CB, Rauch F. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and Executive Summary of the 2007 ISCD Pediatric Position Development Conference. *Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health* 2008;11:6-21.
- 6 Baldassano R, Braegger CP, Escher JC. Infliximab (Remicade) therapy in the treatment of pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:833-838.
- 7 Baumgart D.C. Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Dt. Ärzteblatt* 2009;106:123-132.
- 8 Behrens R, Amrhein B, Buderus S, Keller K M, von der Osten-Sacken I, Rauschenbach R. Intestinale und extraintestinale Manifestationen. In: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Behrens R (Hrsg). 1. Auflage, UNI-MED Verlag AG, Bremen, London, Boston, S.22-23 (2001a).
- 9 Behrens R, Amrhein B, Buderus S, Keller K M, von der Osten-Sacken I, Rauschenbach R. Diagnostik. In: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Behrens R (Hrsg). 1. Auflage, UNI-MED Verlag AG, Bremen, London, Boston, S.51-52 (2001b).
- 10 Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The Prevalence of Extraintestinale Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A Population-based Study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1116-1122.
- 11 Bernstein CN, Leslie WD. Review article: Osteoporosis and Inflammatory Bowel Disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:941-952.
- 12 Bernstein M, Irwin S, Greenberg GR. Maintenance infliximab treatment ist associated with improved bone mineral density in Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2031-2035.
- 13 Bjarnason I, Macpherson A, Mackintosh C, Buxton-Thomas M, Forgacs I, Moniz C. Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:228-233.

- 14 Borelli O, Bascietto C, Viola F. Infliximab heals intestinal inflammatory lesions and restores growth in children with Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2004;36:342-347.
- 15 Boyen von G. Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Innere Medizin I: (2011, persönliche Mitteilung).
- 16 Boyen von G. Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Innere Medizin I: (2011, persönliche Mitteilung).
- 17 Cezard JP, Nouaili N, Talbotec C. A prospective study of efficacy and tolerance of a chimeric antibody to tumor necrosis factor (remicade) in severe pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:632-636.
- 18 Cho JH, Weaver CT. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2007;133:1327-1339.
- 19 Civitelli F, Paganelli M, Strappini PM, Albanese C, Borelli O, Danti M, Bascietto C, Cucchiara S. The Role of RANKL/OPG System in Bone Loss in Children with Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:45 (Abstract).
- 20 Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive and regulatory mechanisms of host dialogue with microbiota. *Immunol. Rev* 2005;206:260-276.
- 21 Escher JC, Amil Dias J, Bochenek K, Buderus S, Bueno de Mesquita M, Bujanover Y, Büller HA, Chong SKF, Cucchiara S, Fell JME, Henker J, Hildebrand H, Hugot JP, Jedynek U, Jenkins H, Kolacek S, Koletzko S, Lazowska I, Levine A, Lionetti P, Maly J, Montgomery SM, Murch SH, Murphy MS, Paerregaard A, Sandhu BK, Sawczenko A. The IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents: Recommendations for Diagnosis – The Porto Criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:1-7.
- 22 Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy. A double-blind placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-1209.
- 23 Guariso G, Gasparetto M, Visona dalla Pozza L, D'Inca R, Zancan L, Sturniolo G, Brotto F, Facchin P. Inflammatory Bowel Disease Developing in Paediatric and Adult Age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:698-707.
- 24 Hugot J P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucin-rich repeat variants with susceptibility to CD. *Nature* 2001;411:599-603.
- 25 Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:439-447.
- 26 Hyams JS, Markowitz J, Wyllie R. Use of infliximab in the treatment of Crohn's disease in children and adolescents. *J Pediatr* 2000;137:192-196.
- 27 Hyams JS, Markowitz J, Otley A, Rosh J, Mack D, Bousvaros A, Kugathasan S, Pfefferkorn M, Tolia V, Evans J, Treem W, Wyllie R, Rothbaum R, del Rosario J, Katz A, Mezzoff A,

- Oliva-Hemker M, Lerer T, Griffiths A. Evaluation of the Pediatric Crohn's Disease Activity Index: a prospect multicenter experience. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:416-421.
- 28 Hyams JS, Crandall W, Kugathasan S, Griffiths A, Olson A, Johanns J, Liu G, Travers S, Heuschkel R, Markowitz J, Cohen S, Winter H, Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano R, REACH Study Group. Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology* 2007;132:863-873.
- 29 Jahnsen J, Falch JA, Aadland E, Mowinckel P. Bone minderal density is reduced in patients with Crohn's disease but not in patients with ulcerative colitis: a population based study. *Gut* 1997;40:313-319.
- 30 Kamhi T, Orel R. Chronic IBD in children in central and western Slovenia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:46 (Abstract).
- 31 Kugathasan S, Werlin SL, Martinez A. Prolonged duration of response to infliximab in early but not late pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3189-3194.
- 32 Lacher M, Helmbrecht J, Schroepf S, Koletzko S, Ballauff A, Classen M, Uhlig H, Hubertus J, Hartl D, Lohse P, von Schweinitz D, Kappler R. NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's Disease. *J Ped Surg* 2010;45:1591-1597.
- 33 Lahr G. Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Molekularbiologisches Labor, Universität Ulm: (2010, persönliche Mitteilung).
- 34 Lamireau T, Cezard J-P, Dabalie A, Goulet O, Lachaux A, Turck D, Maurage C, Morali A, Sokal E, Belli D, Stoller J, Cadranel S, Ginies JL, Viola S, Huet F, Languépin J, Lenaerts C, Bury F, Sarles J. Efficacy and tolerance of infliximab in children and adolescents with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:745-750.
- 35 Lesage S, Zouali H, Cézard J-P and the EPWG-IBD group, Colombel J-F and the EPIMAD group, Belaiche J and the GETAID group, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamailard M, Jannot A-S, Thomas G, Hugot J-P. CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-857.
- 36 Lierop van P, Samson JN, Escher JC, Nieuwenhuis E. Role of the Innate Immune System in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009;48:142-151.
- 37 Lionetti P, Bronzini F, Salvestrini C. Response to Infliximab is related to disease duration in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:524-531.
- 38 Lopes L H C, Sdepanian V L, Szejnffeld V L, Batista de Morais M, Fagundes-Neto U. Risk Factors for Low Bone Mineral Density in Children and Adolescents with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 2008;53:2746-2753.
- 39 Buch: Lüllmann, Mohr, Hein. Pharmakologie und Toxikologie. 16. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York, S.383 (2006).
- 40 Maly FE, Rüegg C. NOD2-Mutationen (R702W, G908R und 1007fs). *UZL-News* 2003;8:4.



- 41 Mamula P, Markowitz JE, Brown KA. Infliximab as a novel therapy for pediatric ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:307-311.
- 42 Markowitz J, Hyams J, Lerer T, Mack D, Evans J, Rosh J, Griffiths A, Kugathasan S, Otley A, Pfefferkorn M, Keljo D, Leleiko N, Bousvaros A, Crandall W, Moyer S, Rothbaum R, Wyllie R, Oliva-Hemker M, DelRosario JF, Mezzoff A. Does age at onset affect IBD treatment? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:48 (Abstract).
- 43 Nguyen GC, Torres EA, Regueiro M, Bromfield G, Bitton A, Stempak J, Dassopoulos T, Schumm P, Gregory FJ, Griffiths AM, Hanauer SB, Hanson J, Harris ML, Kane SV, Orkwis HK, Lahaie R, Oliva-Hemker M, Pare P, Wild GE, Rioux JD, Yang H, Duerr RH, Cho JH, Steinhardt AH, Brant SR, Silverberg MS. Inflammatory Bowel Disease Characteristics among african Americans, Hispanics and non-hispanic Whites: Characterization of a large North American Cohort. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1012-1023.
- 44 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to CD. *Nature* 2001;411:603-606.
- 45 Oliva-Hemker M, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:112-128.
- 46 Paganelli M, Albanese C, Civitelli F, Cirulli M, Labalestra V, Pannone V, Passariello R, Cucchiara S. Osteoporosis and Inflammatory Bowel Disease in Children: Variables Affecting Bone Mineral Density. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:644 (Abstract).
- 47 Paganelli M, Albanese C, Borelli O, Civitelli F, Canitano N, Viola F, Passariello R, Cucchiara S. Inflammation ist the main Determinant of low Bone Mineral Density in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:416-423.
- 48 Pigot F, Roux c, Chaussade S. Low bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:1396-1403.
- 49 Pollak RD, Karmeli F, Eliakim R, Ackerman Z, Tabb K, Rachmilewitz D. Femoral neck osteopenia in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1483-1490.
- 50 Robinson RJ, Al Azzawi F, Iqbal SJ, Abrams K, Mayberry JF. The relation of hand skin-fold thickness to bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:945-949.
- 51 Roesler J, Thürigen A, Sun L, Koch R, Winkler U, Laass M, Gahr M, Rösen-Wolff A, Henker J. Influence of CARD15 Mutations on Disease Activity and Response to Therapy in 65 Pediatric Crohn Patients from Saxony, Germany. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:27-32.
- 52 Roux C, Abitbol V, Chaussade S. Bone loss in patients with inflammatory bowel disease: a prospective study. *Osteoporos Int* 1995;5:156-160.
- 53 Russel GH, Katz AJ. Infliximab is effective in acute but not chronic childhood ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:3-14.

- 54 Schulte C, Dignass AU, Mann K, Goebell H. Reduced bone mineral density and unbalanced bone metabolism in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:268-275.
- 55 Silvennoinen JA, Karttunen TJ, Niemela SE, Manelius JJ, Lehtola JK. A controlled study of bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;37:71-76.
- 56 Sun L, Roesler J, Rösen-Wolff A, Winkler U, Koch R, Thürigen A, Henker J. CARD15 Genotype and Phenotype Analysis in 55 Pediatric Patients with Crohn's Disease from Saxony, Germany. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2003;37:492-497.
- 57 Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, Summers R, Mekhjian H, Greenberger N, Kelly M. Double-blind, placebo-controlled trial of metronidazole in Crohn's Disease. *Gut* 1991;32:1071-1075.
- 58 Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev. Mol Cel Biol* 2003;4:721-732.
- 59 Tiemi J, Komati S, Sdepanian VL. Effectiveness of infliximab in Brazilian Children and Adolescents with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis according to clinical Manifestations, Activity Indices of Inflammatory Bowel Disease, and Corticosteroid Use. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:628-633.
- 60 Tilg H, Moschen AR, Kaser A, Pines A, Dotan I. Gut, Inflammation and Osteoporosis: Basic and Clinical Concepts. *Gut* 2008;57:684-694.
- 61 Tomer G, Ceballos C, Concepcion E, Benkov K. NOD2/CARD15 Variants are associated with lower weight at diagnosis in Children with Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2003;98;2479-2484.
- 62 Turner D, Otley AR, Mack D, et al. Development and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI): a prospective multicenter study. *Gastroenterology*. 2007;133:423 – 432.
- 63 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. Appraisal of the PUCAI *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1218-1223.
- 64 Turner JR. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation: From Basic Mechanisms to Clinical Application. *Am J Pathol* 2006;196:1901-1909.
- 65 Vestergaard P, Krogh K, Rejnmark L, Laurberg S, Mosekilde L. Fracture risk is increased in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Gut* 2000;46:176-181.
- 66 Vihinen M, Kolho K-L, Ashorn M, Verkasalo M, Raivio T. Bone turnover and metabolism in paediatric patients with inflammatory bowel disease treated with systemic glucocorticosteroids. *European Journal of Endocrinology* 2008;159:693-698.
- 67 Walther F, Fusch C, Radke M, Beckert S, Findeisen A. Osteoporosis in Pediatric Patients Suffering from Chronic Inflammatory Bowel Disease With and Without Steroid Treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:42-51.
- 68 Wei SZ, Liu TH, Wang DT, Cao JL, Luo YF, Liang ZY. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:3729-3734.

- 69 Wine E, Reif S, Leshinsky-Silver E, Weiss B, Shaoul R, Shamir R, Wasserman D, Lerner A, Boaz M, Levine A. Pediatric Crohn's Disease and Growth Retardation: The Role of Genotype, Phenotype and Disease Severity. *Pediatrics* 2004;114:1281-1286.
- 70 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature* 2007;448:427-434.

## **Danksagung:**

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin für die Überlassung des Themas und die Zusammenarbeit bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Dr. Carsten Posovszky für die Hilfe und die gute Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Darüber hinaus danke ich PD Dr. Georg von Boyen, Prof. Dr. Georgia Lahr, Dr. Claudia Graßhoff, Dr. Olaf Raecke und Dr. Christoph Schick, sowie dem Team der Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Ulm. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und Roman Reisinger, für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

**Lebenslauf:**

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.