

# **AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN**

**Direktor: Prof. Dr. J. Schölmerich  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg**

## **Die Eignung immunhistochemischer Parameter zur Erkennung von Erkrankungssubphänotypen bei Morbus Crohn**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von Andrea Liebl

**2010**



# **AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN**

**Direktor: Prof. Dr. J. Schölmerich  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg**

## **Die Eignung immunhistochemischer Parameter zur Erkennung von Erkrankungssubphänotypen bei Morbus Crohn**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von Andrea Liebl

**2010**

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber  
1. Berichterstatter: PD Dr. Frank Klebl  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter  
Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2010

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1. Epidemiologie des Morbus Crohn	8
1.2. Ätiologie	9
1.2.1. Genetische Faktoren	9
1.2.2. Umweltfaktoren	10
1.2.3. Rolle von Mikroorganismen	11
1.3. Pathophysiologie	12
1.3.1. Störung der Integrität der Mukosabarriere	12
1.3.2. Fehlregulation der intestinalen Immunantwort	13
1.4. Pathologie	14
1.4.1. Makroskopische Pathologie	14
1.4.2. Mikroskopische Pathologie	15
1.5. Untergruppen des M. Crohn	16
1.6. Komplikationen	17
1.6.1. Stenosen	17
1.6.2. Fisteln und Abszesse	18
1.7. Fragestellung	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1. Klinische Daten und histologisches Ausgangsmaterial	20
2.2. Aufschlüsselung der untersuchten Krankheitsverläufe	21
2.3. Bearbeitung und Beurteilung des histologischen Ausgangsmaterials	23
2.4. Statistische Auswertung	29
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1. Univariate Analyse	31
3.1.1. Auswertung mit Beschränkung auf eine Kolonbiopsie pro Patient	32
3.1.1.1. Assoziation mit dem Krankheitsverhalten	32

	7
3.1.1.2. Assoziation mit dem Auftreten von Komplikationen innerhalb des nächsten Jahres	35
3.1.2. Auswertung unter Verwendung aller verfügbaren Biopsien	40
3.1.2.1. Assoziation mit dem Krankheitsverhalten	40
3.1.2.2. Assoziation mit dem Auftreten von Komplikationen innerhalb des nächsten Jahres nach Biopsieentnahme	45
3.1.3. Zusammenfassung	52
<b>3.2. Logistische Regression</b>	<b>55</b>
3.2.1. Logistische Regression aller Variablen unter Verwendung einer kolonischen Biopsie pro Patient	55
3.2.1.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf	55
3.2.1.2. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres	57
3.2.2. Logistische Regression lediglich immunhistochemischer Parameter unter Verwendung einer kolonischen Biopsie pro Patient	60
3.2.2.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlaufs	60
3.2.2.2. Geeignete Modelle zur Prognose des Krankheitsverlaufs innerhalb eines Jahres	61
3.2.3. Logistische Regression aller Variablen bei sämtlichen Biopsien	64
3.2.3.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf	64
3.2.3.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlaufs innerhalb eines Jahres	66
3.2.4. Logistische Regression allein immunhistochemischer Variablen bei allen Biopsien	69
3.2.4.1. Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf	69
3.2.4.2. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres	70
3.2.5. Zusammenfassung	72
<b>4 Diskussion</b>	<b>75</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>93</b>
7.1 Danksagung	93
7.2 Lebenslauf	94

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie des Morbus Crohn

Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, deren Inzidenz in Deutschland bei 5,2 / 100 000 Einwohner und Prävalenz bei 1 / 500 bis 1 / 800 anzusiedeln ist. Derzeit dürfte die Zahl der in Deutschland an Morbus Crohn erkrankten Patienten nach Angaben der Deutschen Crohn- und Colitis-Vereinigung etwa 320 000 betragen (1). Der Morbus Crohn tritt weltweit auf, wobei sowohl in den Vereinigten Staaten von Amerika als auch in Europa ein Nord-Süd-Gefälle bezüglich der Inzidenz beschrieben wird (2, 3, 4).

Der M. Crohn findet sich aktuell in der städtischen Bevölkerung häufiger als in der ländlichen und stärker in der weißen als in der schwarzen und asiatischen (5). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit von Juden gegenüber Nicht-Juden ist um den Faktor 3 bis 6 erhöht. (6).

Prinzipiell kann die Erkrankung in jedem Lebensalter auftreten, das Hauptmanifestationsalter liegt im Mittel jedoch bei 30 Jahren (1).

Aufgrund der epidemiologischen Daten liegt eine starke Umweltkomponente zur Begünstigung der Entstehung von M. Crohn nahe, aber auch genetische Faktoren spielen eine bedeutende Rolle.

## 1.2. Ätiologie

Die genaue Ätiologie des Morbus Crohn ist bis heute ungeklärt. Trotz guter Fortschritte in der Aufschlüsselung der Pathogenese konnten auslösende Faktoren nicht mit letzter Sicherheit definiert werden. Verschiedene Erklärungsansätze stellen genetische Veranlagung, Umwelteinflüsse und sozioökonomische Faktoren, sowie eine bakterielle bzw. virale Genese in den Mittelpunkt.

### 1.2.1. Genetische Faktoren

Zahlreiche epidemiologische und tierexperimentelle Studien haben eine genetische Komponente gut belegt. Es konnte bei bis zu 20% der Patienten mit Morbus Crohn eine familiäre Häufung beobachtet werden, wobei oftmals identische Befallsmuster des Gastrointestinaltraktes und ähnliche klinische Symptome beobachtet wurden. Die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen ist gegenüber heterozygoten signifikant erhöht (7-11).

Untermauert wird dies durch die Ergebnisse genetisch determinierter Tiermodelle. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass sich durch die selektive Ausschaltung bestimmter Gene (z.B. für Interleukin 10, Interleukin 2, TGF- $\beta$ ) bei Ratten chronisch-entzündliche Darmerkrankungen provozieren lassen (12-15).

Mittels klassischer epidemiologischer Kopplungsstudien wurden größere Populationen auf sogenannte "Kandidatengene" hin untersucht. Diese konnten auf den Chromosomen 3, 7, 12 und 16 festgestellt werden (11, 16). Somit kann eine polygene Entstehung des Morbus Crohn als gesichert gelten. So konnte zum Beispiel auf Chromosom 16 ein Genlocus mit engerer Beziehung zu Zytokinrezeptoren und anderen immunrelevanten Strukturen der Zelloberfläche identifiziert werden. (17).

Als weiteres Krankheitsgen konnte das NOD-2/CARD-15 („Nucleotide-Binding oligomerization domain" / „Caspase recruitment domain") - Gen festgestellt werden. Die Häufigkeit dieser Mutation bei Patienten mit M. Crohn kann in bestimmten Populationen mit bis zu 45% angegeben werden. In manchen geographischen Regionen spielt sie jedoch nur eine untergeordnete bis keine Rolle (18-22). Des Weiteren wurden Assoziationen mit bestimmten genetischen Haplotypen (Interleukin – 1 - Rezeptorantagonisten, Tumor – Nekrose – Faktor –  $\alpha$ ), Adhäsionsmolekülen sowie Komplementuntereinheiten festgestellt (23-30). In einer neueren Studie konnten verschiedene Gen- Loci in Assoziation mit der

Entstehung von Morbus Crohn bestätigt werden: Neben CARD 15 fanden sich Assoziationen mit Chromosom 5q31 und des Weiteren mit IL23R (Interleukin- 23- Rezeptor), ATG16L1 („ATG16 autophagy related 16- like 1“), einem Locus auf Chromosom 10q21 nahe rs10761659 und mit einem Cluster um rs17234657 (31).

Zusammenfassend scheint eine genetische Komponente in der Ätiologie des Morbus Crohn eine bedeutende Rolle zu spielen. Da sie diese jedoch nicht alleine erklären kann, muss von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen werden.

### **1.2.2. Umweltfaktoren**

Weitere ätiologische Überlegungen beziehen sich auf den Beitrag von Umweltfaktoren zur Entwicklung eines Morbus Crohn bei entsprechender genetischer Veranlagung.

Zur Diskussion stehen unterschiedlichste Faktoren wie orale Kontrazeptiva, raffinierter Zucker, Nahrungsmittelzusätze, perinatale Infektionen sowie Infektionen in der Kindheit, Appendektomie, hygienische Aspekte und Zigarettenrauch. Vor allem orale Kontrazeptiva und die zunehmend geringere Exposition des Gastrointestinaltraktes mit pathogenen Keimen während der Kindheit aufgrund höherer Hygienestandards in den Industrienationen werden als Auslöser diskutiert (33, 34). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass das Rauchen von Zigaretten einen negativen Einfluss auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf des M. Crohn hat, dagegen bei Patienten mit Colitis ulcerosa einen eher positiven Effekt bewirkt (35, 36).

Auf die Beteiligung von Umweltfaktoren zur Krankheitsentstehung weist auch ein stärkeres Auftreten in der städtischen Bevölkerung im Vergleich zur Landbevölkerung hin, sowie die Beobachtung, dass die Inzidenz bei Asiaten im Vergleich zu Weißen erniedrigt ist, diese sich jedoch bei Emigration in westliche Industrienationen angleicht (5).

Sozioökologische und Umwelt-Faktoren scheinen somit eine wichtige Rolle in der Entstehung von M. Crohn zu spielen. Insbesondere verbesserte hygienische Bedingungen und veränderte Lebensgewohnheiten scheinen einen Einfluss auf Inzidenz und Prävalenz zu nehmen.

### 1.2.3. Rolle von Mikroorganismen

Da chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen die Entzündung als gemeinsames Merkmal eigen ist, legt dies die Vermutung nahe, dass eine virale oder bakterielle Infektion als Auslöser der Erkrankung fungieren könnte. Dass mikrobakterielle Faktoren Einfluss nehmen könnten, weisen auch Ergebnisse von Untersuchungen an Tiermodellen nach, die zeigen, dass das Auftreten einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung verhindert werden kann, wenn suszeptile Tiere wie IL-2-Knock-out- oder HLA-B27/ $\beta$ 2-Mikroglobulin-transgene Ratten in keimfreien Bedingungen aufgezogen werden (12, 32).

Ein häufig diskutiertes Konzept stellt die Hypothese auf, dass Masernviren maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten. Einige Studien können zeigen, dass Infektionen mit Paramyxoviren in der Kindheit bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (37). Es wurde versucht, die Erkrankung dadurch zu erklären, dass eine peri- oder neonatale Infektion mit Masernviren von einer mikrothrombotischen Erkrankung in den Kapillaren der Mucosa begleitet ist. Eine granulomatöse Vaskulitis findet sich auch bei Patienten mit Morbus Crohn. Diese würde dann eine kritische Rolle im Verlauf der Erkrankung spielen (38). Andere Studien lassen jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit Paramyxoviren und M.Crohn erkennen. Auch Masern-Impfungen scheinen keinen Einfluß auf die Entstehung zu nehmen (39-41).

Ebenso wie virale werden auch bakterielle Auslöser vermutet. Zur Diskussion stehen unter anderem Borrelien, Escherichia coli, Streptokokken, Listerien, Clostridien, Chlamydien und Mycobakterien. Wenn auch einige Studien einen Zusammenhang mit Infektionen mit Mycobakterien, Escherichia coli, Listerien und Streptokokken nahe legen, so konnte dies jedoch bisher nicht sicher nachgewiesen werden (42, 43).

## 1.3. Pathophysiologie

### 1.3.1. Störung der Integrität der Mukosabarriere

Der genaue Ablauf der Entstehung des M. Crohn ist noch nicht vollständig geklärt. Als wichtiges Merkmal wird eine Störung der Integrität der intestinalen Schleimhautbarriere angenommen. Das Darmlumen weist ein breites Spektrum von toxischen und proinflammatorischen Substanzen auf, ebenso von immunogen wirkenden Stoffen. Dazu werden Bestandteile der natürlichen residenten Darmflora und Bakterienprodukte wie Peptidoglykane und Lipopolysaccharide genauso gerechnet wie Nahrungsmittelbestandteile und Medikamente. Normalerweise fungiert die Epithelschicht der Mukosa als wirksame Barriere gegen all diese Substanzen und verhindert ein Eindringen in tiefere Schichten der Darmwand. Dies ist die Voraussetzung zur entzündungsfreien Ausgrenzung von Antigenen im Intestinum. Wird diese Schranke des Epithels durchbrochen, führt dies zu einer Permeabilitätszunahme, was wiederum der Auslöser für eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung sein könnte. Allerdings erscheint umgekehrt auch möglich, dass eine persistierende chronische Entzündung des Gastrointestinaltraktes sekundär zu einer erhöhten Permeabilität führen kann. In mehreren Studien konnte eine Permeabilitätszunahme bei mangelnder Integrität der Schleimhautbarriere bei Patienten mit Morbus Crohn und ihren Angehörigen verifiziert werden (44-46). Nach anderen Studien war es jedoch nicht möglich, diese Resultate nachzuweisen, so dass diese daher nur für bestimmte Untergruppen als gesichert gelten (47). Abnorme Tight junctions können eine vermehrte Durchlässigkeit des Epithels bewirken und somit als Auslöser für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen fungieren. Hinweise dafür fanden sich in Mausmodellen (48).

Durch gezielte Schädigung der intestinalen Barriere in Experimenten kann eine spontane Darmentzündung provoziert werden. Weiterhin konnte bei sogenannten ITF (intestinaler Trefoilfaktor) -Knockout-Mäusen durch Ausschaltung des Gens für ITF als wesentliches Produkt der Becherzellen eine erhöhte Anfälligkeit hervorgerufen werden. Dies gilt als weiterer Beleg für die Bedeutung der Mukosabarriere zur Regulierung des intestinalen Gleichgewichts (49).

Möglicherweise spielt auch ein Mangel von Defensinen eine Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass vor allem Träger von NOD2- Mutationen eine verminderte Expression von  $\alpha$ -Defensinen aufwiesen, was als Erklärung für die vermehrte, bakterieninduzierte Entzündung der Mukosa und der Beteiligung des Ileum dienen könnte (50).

### 1.3.2. Fehlregulation der intestinalen Immunantwort

Als weitere Möglichkeit wird diskutiert, dass das Auftreten eines Morbus Crohn auf einer pathologischen intestinalen Immunantwort gegenüber Antigenen beruht. Auslöser wären Bestandteile der natürlichen Darmflora sowie ihrer Toxine und Spaltprodukte, die eine überschießende Immunantwort provozieren könnten. Hierbei steht sowohl eine systemische als auch eine intestinale Fehlregulation der Immunreaktion zu Disposition, welche eine sich selbst unterhaltende Entzündungsreaktion zur Folge hat (51). Bei diesem Vorgang stehen sich unterschiedliche proinflammatorische (unter anderem Interleukine -1, -2, -6, -8 und -12, TNF- $\alpha$ , Thromboxan A<sub>2</sub>, Leukotrien B<sub>4</sub>, IFN $\gamma$ , Substanz P) und antiinflammatorische (Interleukin -1 - Rezeptorantagonist, Interleukine -4, -10, -13, TNF - Bindungsproteine, Prostaglandin E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub>) Mediatoren gegenüber. Die einzelnen Faktoren stehen unter normalen Bedingungen in einem stabilen Gleichgewicht. Ist dieses jedoch gestört, kommt es zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion, welche weiter fortschreiten kann. Wie erwähnt kann dies in manchen Modellen unter keimfreien Bedingungen verhindert werden, was die Bedeutung der bakteriellen Besiedelung des Darmtraktes bei der Entwicklung einer mukosalen Entzündung weiter hervorhebt. Ebenso wird diese Hypothese durch die Resultate verschiedener tierexperimenteller Studien unterstützt. Durch die Ausschaltung der Gene für Interleukin-2, Interleukin-10 oder TGF- $\beta$  konnte eine chronische intestinale Entzündung der Mucosa induziert werden. Während Mäuse mit IL-2-Mangel eher ein Entzündungsbild ähnlich der Colitis ulcerosa entwickelten, konnte bei Mäusen mit IL-10-Mangel eine intestinale Entzündung wie bei Morbus Crohn beobachtet werden (13, 14, 52-54).

## 1.4. Pathologie

Der Morbus Crohn wird als eine chronische, transmurale, granulomatöse Entzündung mit diskontinuierlichem Befall des Gastrointestinaltraktes beschrieben, die in Schüben auftritt. Prinzipiell ist eine Erkrankungslokalisierung in jedem Bereich des Gastrointestinaltraktes möglich, am häufigsten findet sich jedoch ein Befall des terminalen Ileums in Kombination mit dem rechtsseitigen Kolon (50%) oder isoliert des terminalen Ileums (30%). Dabei breitet sich die Erkrankung häufiger segmental als kontinuierlich aus (55).

### 1.4.1. Makroskopische Pathologie

Makroskopisch imponieren mehrere Erscheinungsbilder, die fließende Übergänge aufweisen: Aphthöse Ulzerationen, Fistelbildungen, Strikturen und das Kopfsteinpflasterrelief der Schleimhaut.

Die makroskopische Erstmanifestation des Morbus Crohn stellen häufig aphthöse Ulzerationen dar. Sie werden als oberflächliche, hämorrhagische, „rattenbissartige“ Defekte der Mukosa beschrieben, mit häufigster Lokalisation über Solitärfollikeln und Peyer`schen Plaques (56).

Bei Strikturen findet sich eine verdickte Darmwand. Ebenso stellen sich Subserosa, Serosa und das mesenteriale Fettgewebe dar. Die Länge der befallenen Darmabschnitte ist variabel. Sie werden vorwiegend im Ileum und Kolon beobachtet, wobei z. T. auch ein multiples Auftreten beobachtet werden kann (56).

Das typische Bild des Kopfsteinpflasterreliefs ergibt sich aus netzartigen Ulzerationen der Schleimhaut, die intakte Areale, welche sekundär pflastersteinartig anschwellen, umschließen. Häufig finden sich sogenannte „Konglomerattumore“ und miteinander verbackene Darmschlingen. Diese entstehen zumeist aus fissuralen Ulzerationen, Entzündungsinfiltraten, welche die gesamte Wanddicke befallen, und gedeckten Perforationen, welche häufig durch verzweigte Fisteln miteinander verbunden sind (57).

Als weitere Manifestation einer ulzerierenden Entzündung können beim Morbus Crohn gelegentlich Schleimhautveränderungen in Form von Granulationspolypen auftreten, welche zu Blutungen führen können (58).

### 1.4.2. Mikroskopische Pathologie

Histologisch lassen sich beim Auftreten eines Morbus Crohn Veränderungen an allen Schichten der Darmwand beobachten. Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa finden sich entzündliche Veränderungen durch die gesamte Tiefe der Darmwand, wenn diese auch erheblich variieren kann von nur oberflächlich (z. B. „Mukosale Kolitis Crohn“) bis transmural. Ebenso können alle Strukturen der Darmwand betroffen sein, wobei auch hier eine große individuelle Variationsbreite anzutreffen ist (56, 59, 60).

In den frühen Phasen findet sich vermehrt eine geringe Entzündung in der Mukosa mit umschriebenen ulcerösen Läsionen, gefolgt von Ödem mit Lymphangiektasien vor allem in der Submukosa und eine Hyperplasie des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes. Im Weiteren kommt es zur Ausbildung einer transmuralen Entzündung mit Befall der tiefen Submukosa, Mukosa und Serosa mit lymphofolikulären Aggregationen.

Weiterhin finden sich vor allem in den tieferen Wandschichten (Serosa > Submukosa > Mukosa > Muscularis propria) epitheloidzellig-granulomatöse Reaktionen in der Nähe von Lymphgefäßen. Dies ist allerdings bei weniger als 50% der Operationspräparaten der Fall. In Form und Struktur ist eine erhebliche Variationsbreite von Mikrogranulomen, die nur aus Epitheloidzellen und Histiozyten bestehen, bis hin zu Epitheloidzellgranulomen mit Riesenzellen anzutreffen (56). Granulome treten eher bei jungen Patienten auf. Insgesamt ist ihre Bedeutung zur Diagnosesicherung aufgrund ihres selteneren Auftretens und des Vorhandenseins bei anderen entzündlichen Darmerkrankungen eingeschränkt.

Anhand des histologischen Erscheinungsbildes kann in den meisten Fällen gut zwischen einem Morbus Crohn und einer Colitis ulcerosa differenziert werden. Für das Vorhandensein eines Morbus Crohn sprechen differentialdiagnostisch folgende Parameter (61, 62):

- segmentale Störung der Kryptenarchitektur
- segmentale Reduktion der Becherzellen
- Becherzellerhalt in entzündlich aktiven Arealen
- Fokale chronische Entzündung ohne Mukosaatrophie
- Epitheloidzellgranulome
- Riesenzellen vom Langhans-Typ

## 1.5. Untergruppen des M. Crohn

Da das klinische Erscheinungsbild des Morbus Crohn sehr variabel ist und stark von Lokalisation und Ausmaß der Entzündung abhängig ist, wurde schon des Längeren an einer schlüssigen Einteilung der Patienten in Untergruppen gearbeitet (63, 64). Die so genannte Vienna-Klassifikation ermöglicht vor allem die Berücksichtigung von Entzündungslokalisation und Krankheitsverhalten bzw. die Entwicklung von Komplikationen. Sie wurde 1998 von der Working Party for the World Congresses of Gastroenterology vorgestellt (65). In dem ihr zugrunde liegenden System können Patienten nach 3 Hauptkategorien Untergruppen zugeordnet werden.

Die erste Kategorie unterscheidet nach dem Alter der Patienten bei der Diagnosestellung und wird mit „A“ (Age at diagnosis) bezeichnet. Hierbei werden Patienten „A1“ zugeteilt, sofern ihr Alter zu diesem Zeitpunkt unter 40 Jahren betragen hat, bei höherem Alter dementsprechend der Kategorie „A2“.

Die „L“ (Location) – Kategorie beschreibt die Erkrankungslokalisierung und kann in 4 Gruppen differenzieren: L1 stellt einen reinen Befall des terminalen Ileums dar, wenn auch gegebenenfalls mit Entzündung im Bereich des Coecums, L2 steht für eine alleinige Entzündungslokalisation im Dickdarm, bei L3 sind sowohl das terminale Ileum als auch der Dickdarm betroffen und L4 symbolisiert einen Befall des Gastrointestinaltraktes proximal des terminalen Ileums.

In der dritten Hauptkategorie, welche mit „B“ (behaviour) überschrieben wird, wird nach dem Krankheitsverhalten differenziert. B1 beschreibt eine nicht-striktierende, nicht-penetrierende Erkrankung. Im Falle von Komplikationen teilt das Auftreten von Stenosen die Betroffenen der Gruppe B2, das von Fisteln und Abszessen die Patienten der Kategorie B3 zu.

Insgesamt muss jedoch beachtet werden, dass die einzelnen Kategorien nicht unabhängig von einander sind. Eine Assoziation zwischen den Kategorien A und L, beziehungsweise B und L wurde bereits bei der initialen Beschreibung festgestellt (65). Des Weiteren scheinen die Lokalisation der Erkrankung ebenso wie das Erkrankungsalter erheblichen Einfluss auf die Entstehung von Komplikationen zu nehmen (66-68).

## **1.6. Komplikationen**

### **1.6.1. Stenosen**

Die Pathologie des Morbus Crohn wird durch eine transmurale Entzündung der Darmwand vor allem mit bevorzugtem Befall der Mukosa und Submukosa charakterisiert. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einer Proliferation der Myofibroblasten und Ablagerung von Kollagen, was konsekutiv zu einer Fibrosierung des Gewebes, Verdickung der Darmwand und damit zur Einengung des Darmlumens führt. Damit sind Stenosen eine der wichtigsten Komplikationen im Verlauf eines Morbus Crohn. Das Ausmaß der verursachten klinischen Symptomatik ist hierbei abhängig von Anzahl, Länge, Durchmesser und Lokalisation der befallenen Darmabschnitte (69).

Es stehen unterschiedliche Therapieoptionen zur Behandlung von Stenosen zur Verfügung. Im Falle einer entzündlichen Begleitkomponente kommt eine anti-inflammatorische Therapie in Frage. Jedoch ist noch keine medikamentöse Therapie bekannt, die zur Prävention eines stenosierenden Verlaufs eines Morbus Crohn sicher verwendet werden könnte (69), so dass sich die Therapie meist auf interventionell-endoskopische oder chirurgische Methoden beschränkt. Allerdings stellt der alleinige Nachweis einer Stenose noch keine Indikation für einen operativen Eingriff dar. Diese ergibt sich vielmehr beim Auftreten klinischer Beschwerden und nach Ausschluss einer akut entzündlichen Genese. Nach Versagen konservativer Therapiemaßnahmen oder einer endoskopischen Dilatation stehen eine Strikturoplastik, eine Bypassoperation oder die Resektion als operative Maßnahmen zur Verfügung (70-72). Bei einem nicht unerheblichen Anteil an Betroffenen bildet sich im weiteren Krankheitsverlauf jedoch ein Rezidiv der Stenose (73, 74).

Die Stenose stellt eine wichtige Komplikation im Bereich des proximalen Gastrointestinaltraktes bei Morbus Crohn dar (71). In einer Studie an 52 Crohn-Patienten mit gastroduodenalem Befall wurde bei 30 Patienten eine Operation wegen einer Obstruktion nötig. Von diesen entwickelten jeweils 30% eine Komplikation im Sinne einer Anastomoseninsuffizienz oder einer Magenausgangsstenose (73). Dies kann als weiterer Beleg für die Schwierigkeit der operativen Behandlung der Stenosesymptomatik bewertet werden.

### **1.6.2. Fisteln und Abszesse**

Ebenso wie Stenosen werden auch Fisteln und Abszesse zu den bedeutendsten Komplikationen beim Morbus Crohn gerechnet. Fisteln können mit einer hohen Inzidenz von bis zu 50% auftreten (3, 75, 76). Die pathogenetische Entstehungsursache, die zum Auftreten einer Fistel führt, ist nicht eindeutig geklärt. Allerdings konnte eine typische Zellzusammensetzung beobachtet werden (77).

Die klinischen Folgen von Fisteln sind variabel. Sie können sich als rein kosmetisches Problem manifestieren, andererseits aber auch zur Entstehung eines Malabsorptionssyndroms beitragen (78). Vor allem enterovesikale oder blind endende retroperitoneale Fisteln führen häufig zu systemischen Entzündungen oder zur Entwicklung eines Abszesses (79, 80).

Die Therapie einer Fistel gestaltet sich schwierig und ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Bei chirurgischen Exzisionen besteht ein hohes Risiko für Rezidive (81). Eine Operationindikation ist vor allem bei interenterischen oder enterokutanen Fisteln mit konsekutiver Malabsorption oder bei enterovesikalen und blind endenden retroperitonealen Fisteln gegeben (70). Bei chronisch aktiven Fisteln im Perianalbereich erscheint hingegen die Fadendrainage als sinnvollste Therapieoption, führt aber in den seltensten Fällen zur kompletten Abheilung (82, 83).

Bei der medikamentösen Therapie besteht keine Wirksamkeit von Glukokortikoiden. Unter Anwendung von Antibiotika, Azathioprin, Cyclosporin, Tacrolimus oder Infliximab wird jedoch nur in 20-50% der Fälle ein dauerhafter Verschluss der Fistel erreicht, so dass die Operation weiterhin häufig eingesetzt wird (3, 75, 76, 78, 82-84). Zu beobachten ist jedoch, dass bei einer Behandlung mit Immunsuppressiva weitaus seltener mit dem Auftreten eines Fistelrezidivs zu rechnen ist (85).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die begünstigenden Faktoren zur Entstehung einer Fistel noch weithin unbekannt sind, der Möglichkeit einer genaueren Vorhersage der Auftretenswahrscheinlichkeit zur Erstellung präventiver Therapieregime aber eine große Bedeutung zukäme und somit äußerst wünschenswert wäre.

## 1.7. Fragestellung

Ein bedeutendes Problem bei der Therapie eines Morbus Crohn ist durch den äußerst variablen Krankheitsverlauf gegeben. Voraussagen über die Art der Komplikationen, die auf den Patienten zukommen, den Zeitpunkt deren Auftreten und Möglichkeiten zur wirksamen Prävention lassen sich nur schwer treffen. Damit steht die Frage, welche Entwicklung der individuelle Krankheitsverlauf der einzelnen Patienten nehmen könnte, offen. Dessen genauere Kenntnis könnte jedoch bei der Erstellung eines Therapieregimes sehr von Vorteil sein, da je nach zu erwartender Komplikation verschiedene Behandlungsstrategien zur Anwendung kommen könnten. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt die Therapie noch relativ uniform ohne näher auf die eventuelle Entstehung von Komplikationen zugeschnitten zu sein. Fisteln und Stenosen als bedeutende Komplikationen erfordern im Weiteren zumeist jedoch eine unterschiedliche Behandlung: Bei Fistelbildung folgt zum Beispiel eher eine Vermeidung einer Behandlung mit Glukokortikoiden, dafür wird eher auf Immunsuppressiva und Antibiotika zurückgegriffen. Bei Stenosen sind häufig elektive operative Eingriffe indiziert.

Wäre die Möglichkeit gegeben, frühzeitiger Angaben zum Verlauf der Erkrankung machen zu können, könnten unter Berücksichtigung der speziellen Pathophysiologie des jeweiligen Erkrankungstyps spezifische Therapiekonzepte entwickelt werden, die das Auftreten einer zu erwartenden Komplikation im besten Fall verhindern, ansonsten das Beschwerdebild deutlich verringern. Vor allem spätere operative Eingriffe könnten so vermieden werden.

Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit: Untersucht wird, ob anhand endoskopisch gewonnener Verlaufsbiospien und durch die gezielte Beurteilung der Ausprägung einzelner immunhistochemischer und klinischer Parameter eine Voraussage über die Art und den genaueren Zeitpunkt des Auftretens von Komplikationen bei Morbus Crohn zu treffen ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Klinische Daten und histologisches Ausgangsmaterial**

Aus den Krankenakten des Klinikums der Universität Regensburg wurden die klinischen Daten von insgesamt 52 Morbus- Crohn- Verläufen erhoben. Der Untersuchungszeitraum erstreckt sich auf die Jahre von 1992 bis 2004.

Einschlusskriterien waren die klinisch und pathologisch gesicherte Diagnose Morbus Crohn sowie das Vorhandensein von Dünn- und Dickdarmbiopsien über einen Zeitraum von jeweils mindestens zwei Jahren.

Aus den Krankenakten wurden folgende Befunde erhoben:

- die Einteilung in die Vienna-Klassifikation
- der Entzündungsparameter CRP (C-reaktives Protein) zum Entnahmezeitpunkt der Biopsien
- die Krankheitsaktivität
- die Medikation in der Zeit vor der Biopsieentnahme mit Glukokortikoiden systemisch oder lokal, Mesalazin systemisch oder lokal, Azathioprin, Methotrexat und Antibiotika
- der Krankheitsverlauf mit Komplikationen

Bei allen Patienten wurden Koloskopien mit endoskopischer Stufenbiopsieentnahme aus makroskopisch auffälliger Mukosa entnommen. Die Lokalisation der Entnahmestellen wurde unterschieden nach terminalem Ileum, Ileocoecalklappe, Caecum, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigma und Rektum. Insgesamt wurden somit 96 Biopsien aus 52 Krankheitsverläufen von Morbus Crohn beurteilt. Da jedoch die Daten von 5 Patienten (27 Biopsien) keine ausreichende Aussagekraft bezüglich des Krankheitsverlaufes enthielten, fanden sie keinen Einzug in die statistische Auswertung, so dass im Folgenden von einer Gesamtzahl von 47 Patienten (69 Biopsien) ausgegangen wird.

## 2.2. Aufschlüsselung der untersuchten Krankheitsverläufe

Insgesamt wurden 47 Verläufe von Patienten mit Morbus Crohn beobachtet. Das Verhältnis männlich zu weiblich betrug 24 zu 23. Das Durchschnittsalter bei Biopsieentnahme war 34,6 Jahre (minimal 16 Jahre, maximal 60 Jahre). Bewertet wurden insgesamt 69 Biopsien.

Um die Validität immunhistochemischer Marker als prädiktive Parameter für den zu erwartenden Krankheitsverlauf zu untersuchen, wurden die Patienten nach ihrem Krankheitsverlauf beurteilt. Unterschieden wurde dabei nach 2 Gruppen:

Die erste Einteilung fand anhand der Unterteilung in der Gruppe „B“ der Vienna-Klassifikation nach dem generellen Krankheitsverlauf bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes in „komplikationslos“, „fistelnd“ und „stenosierend“ statt. Insgesamt 4 Patienten (4 Biopsien) konnten dabei der Gruppe B1 (komplikatonsloser Krankheitsverlauf), 19 Patienten (32 Biopsien) der Gruppe B2 (stenosierender Verlauf) und 24 Patienten (33 Biopsien) der Gruppe B3 (Verlauf mit Ausbildung von Fisteln oder Abszessen) zugeordnet werden.

In der zweiten Gruppe wurde der Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme mit dem Auftreten oder Fernbleiben von Komplikationen beobachtet. Unterschieden wurde nach „rein entzündlich nach einem Jahr“ (13 Patienten, 44 Biopsien), „stenosierend nach einem Jahr“ (8 Patienten, 12 Biopsien), „fistelnd nach einem Jahr“ (7 Patienten, 15 Biopsien) und „Schub innerhalb eines Jahres“ (30 Patienten, 20 Biopsien). Bei insgesamt 13 Patienten (24 Biopsien) entwickelten sich mehrere Komplikationen innerhalb eines Jahres. Als rein entzündlich galten definitionsgemäß Krankheitsverläufe mit Auftreten einer Entzündung ohne Entwicklung von Komplikationen (Stenose, Fistel, Schub). Die Fallzahl erniedrigte sich in dieser Gruppe um 2 auf insgesamt 45 Patienten (67 Biopsien), da sich bei 2 Patienten keine genauen Angaben zum Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme aus den im Archiv der Uniklinik Regensburg gespeicherten Krankenakten entnehmen ließen.

Zunächst wurden uni- und multivariate Analysen auf Beschränkung lediglich einer zufällig ausgewählten kolonischen Biopsie pro Patient durchgeführt. Dem gegenübergestellt wurden in einem zweiten separaten Arbeitsschritt die Analysen unter Verwendung sämtlicher gewonnener Biopsien aus allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes.

In der univariaten Analyse erniedrigten sich die Fallzahlen zum Teil bei den überprüften immunhistochemischen Parametern bei nicht ausreichend verwertbaren Biopsien. Die Gründe für die teilweise Erniedrigung der Fallzahlen bei den untersuchten klinischen Parametern ergeben sich daraus, dass manche Parameter zum Entnahmezeitpunkt nicht

erhoben wurden (CRP, Temperatur..), bzw. keine exakten Angaben über die erfolgte Medikation aus der jeweiligen Krankenakte zu entnehmen waren. Die jeweiligen zu Grunde liegenden Fallzahlen (N) sind in jedem Arbeitsschritt aus der zugehörigen Tabelle ersichtlich.

## 2.3. Bearbeitung und Beurteilung des histologischen Ausgangsmaterials

Die gewonnenen Biopsien wurden auf das Vorhandensein verschiedener **immunhistochemischer Parameter** untersucht. Dabei handelt es sich um die folgenden Variablen:

- **CD3:** CD3 ist ein T-Zellantigen von 20-25 kD, das aus mindestens 5 Polypeptidketten besteht und Teil eines größeren Komplexes ist, der den T-Zellrezeptor (TCR) formt. Dabei erfüllt es die Funktion der Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des TCR nach Kontakt mit MHC-Peptid-Komplexen. Es wird von allen reifen T-Lymphozyten exprimiert. Im peripheren Blut beträgt der Anteil der CD-3-positiven T-Lymphozyten etwa 75% an der lymphozytären Gesamtpopulation. Das Antigen wird ebenso von 65-85% der Thymozyten und von den Purkinje-Zellen im Kleinhirn exprimiert (87-90).
- **CD20:** CD 20 stellt ein B-Zell-Antigen mit einem Molekulargewicht von 35 kD dar und befindet sich auf ca. 10% der peripheren Lymphozyten. Alle B-Zellen, die an ihrer Oberfläche leichte Ketten aufweisen, sind Antigenträger. Es dient der Funktion der B-Zellaktivierung und -reifung (87-89).
- **Actin:** Das Mikrofilament Actin, Größe 7nm, stellt in mobilen Zellen bis zu 15% des gesamten zellulären Proteins dar, gegenüber 2% in ortsständigen Zellen. Es spielt als wichtiger Bestandteil des Zellrahmens eine große Rolle in Orientierung und Bewegung von neutrophilen Granulozyten. Das Zytoskelett aus Actin ist der Angriffspunkt für Signaltransduktion während der Phagozytose und essentiell für die Zellmembranamformung, die die Voraussetzung für Adhäsion, Migration und Phagozytose spielt. Dabei erfüllt es zwei Aufgaben: Zum einen liefert es einen mechanischen Rahmen, der Formänderungen der Zelle ermöglicht. Zum anderen reguliert es Transduktionen, welche für die Entwicklung des Effektor-Phänotyps von Bedeutung sind (91-93).
- **Chymase und Trypsase:** Chymase und Trypsase sind Serinproteasen, die nach Aktivierung aus den sekretorischen Granula von Mastzellen im Rahmen von Hypersensitivitätsreaktionen freigesetzt werden. Trypsase ist in allen menschlichen Mastzellen vorhanden, findet sich jedoch in keinem anderen Zelltyp. Chymase kann in einigen Mastzellen gefunden werden. Die Funktion beider Enzyme *in vivo* ist noch nicht vollständig geklärt, bei *in vitro* – Versuchen ließ sich vermuten, dass Trypsase

- Fibrinogen spaltet und Kollagenase aktiviert, Chymase dagegen Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt und die muköse Sekretion stimuliert (85).
- **CD68:** Es wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und basophilen Zellen und großen Lymphozyten exprimiert und weist ein Gewicht von 110 kD auf. Bislang ist noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen (89).
  - **CD4:** CD4 stellt ein Transmembranglykoprotein von 59 kD dar, das an 45% der peripheren Lymphozyten (T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen) und 80-90% der Thymozyten vorkommt. Es ist das Antigen der T-Helferzellen und dient als akzessorisches Molekül in der Erkennung fremder Antigene im Zusammenhang mit MCH-Klasse-II-restringierter Antigenerkennung. Außerdem dient es dem „Human immunodeficiency virus (HIV)“ als Rezeptor (87-90).
  - **CD8:** CD8 als Antigen der Suppressorzellen wird an etwa 30% der normalen peripheren Lymphozyten und 60-80% der Thymozyten sowie einem Teil der Natürlichen Killerzellen exprimiert. Es hat ein Molekulargewicht von 32-43 kD und dient als Korezeptor des T-Zell-Rezeptors im Zusammenhang mit MCH-Klasse-I-restringierter Antigenerkennung. Außerdem ist es wichtig für die positive Selektion im Thymus (87-90).
  - **CD25:** Dabei handelt es sich um ein Oberflächenantigen, welches mit der  $\alpha$  – Kette des Rezeptors für Interleukin 2 (IL 2) assoziiert ist und ein Molekulargewicht von 55 - 60 kD aufweist. Es wird von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert und dient der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, Thymozyten, Natürlichen Killerzellen, B-Zellen und Makrophagen und der Interaktion mit der  $\beta$  – Untereinheit des IL-2-Rezeptors (87-90).

Für die immunhistochemische Auswertung wurden die Gewebsschnitte von einer Dicke von 2-3  $\mu$ m zuerst 30 Minuten im Brutschrank bei 72° inkubiert und mittels einer Alkoholreihe bis je 70% entparaffiniert. Der Alkohol wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser ausgespült. Weiterhin wurden die Schnitte zur Festlegung von CD 20, Actin, Tryptase, Chymase, CD 8 und CD 4 für 30, bzw. 32 (CD 8) oder 24 Minuten (CD4) mit einem Citratpuffer von pH = 6,0 in der Mikrowelle inkubiert. Zur Untersuchung von CD 3 und CD 68 wurden die Gewebsschnitte mittels der „Target Solution“ (Dako) mit pH = 9,9 für 40 Minuten bei 95° gekocht. Die Immunhistochemie wurde im Anschluss nach Anweisung des Herstellers in einem NEXES- Immunostainer (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA) durchgeführt. Als primärer Antikörper wurden monoklonale Mausantikörper in einer

Verdünnung von 1:25 für CD3 (Dako, M 7254), 1:100 für CD 20 (Dako, M 0755), 1:3000 für Actin (RDI, ACTINabm-A4), 1:150 für Tryptase (Novocastra, NCL-MCTryp-428), 1:2000 für Chymase (Novocastra, NCL-MCC), 1:500 für CD 68 (Dako Clone KP1, Code Nr. M0814), 1:5 für CD 4 (Ventana) und unverdünnt für CD 8 (Ventana) verwendet. Nach Inkubation für ca. 1h bei 37°C wurde in einer Verdünnung von 1:500 der biotonylierte Sekundärantikörper (Biotinylat, Multi link E0453) zugesetzt und ebenfalls für 1h bei 37°C inkubiert. Die Färbung erfolgte anschließend mit 0,03% DAB (Ventana Medical System) und 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Die Auswertung der immunhistochemischen Variablen erfolgte semiquantitativ, wobei der Anteil der immunhistochemisch positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellularität bestimmt wurde. Das Vorhandensein der einzelnen Zellgruppen im Schnittbild wurde je nach Auftretenshäufigkeit in „nicht vorhanden“, „geringes Auftreten“ und „vermehrtes Auftreten“ unterteilt. Ebenso wurde der Nachweis von Chymase, Tryptase und Actin in „nicht nachweisbar“, „leicht“ und „stark“ codiert. Da nicht für alle Patienten alle immunhistochemischen Färbungen durchgeführt werden konnten, werden im Ergebnisteil die entsprechenden Fallzahlen genannt.

Die oben genannten aus den Krankenakten erhobenen **klinischen Parameter** wurden wie folgt codiert:

- Das Geschlecht der Patienten wurde nach männlich (0) und weiblich (1) unterschieden.
- Die Körpertemperatur und der CRP zum Entnahmezeitpunkt wurden in die Kategorien „erhöht“ und „nicht erhöht“ unterteilt, anhand der Beschreibung in den Arztbriefen wurde der M. Crohn als „aktiv“ oder „nicht aktiv“ eingestuft.
- Weiterhin wurde die Medikation der Patienten im Zeitraum von einer Woche vor der Biopsieentnahme recherchiert im Hinblick auf die Verabreichung von Glukokortikoiden, Mesalazin, Azathioprin, Antibiotika, Methotrexat, 6-Mercaptopurin, Probiotika, Infliximab oder Cyclosporin A. Innerhalb der Glukokortikoide wurde zwischen einer systemischen und einer topischen Behandlung sowie der Einnahme von Budenosid und anderen Glukokortikoiden, in der Regel Prednisolon, unterschieden. Ebenso wurde sowohl die systemische als auch die topische Medikation mit Mesalazin untersucht.

Zur Erstellung von Modellen zur Vorhersage der zu erwartenden Krankheitsverläufe anhand logistischer Regressionen wurden auch **histologische Parameter** aus einer vorangegangenen Dissertation (Udo Wildner: „Histologische Faktoren als prädiktive Parameter für den klinischen Verlauf bei Morbus Crohn“, 2004) mit einbezogen. Bei dieser kamen die zum identischen Zeitpunkt gewonnenen Biopsien aus denselben Krankheitsverläufen wie bei der vorliegenden Arbeit zur Auswertung.

Die folgenden Angaben wurden übernommen:

Die histologischen Parameter umfassen im Einzelnen:

- Epithel
  - Infiltration durch vermehrte neutrophile Granulozyten
  - Infiltration durch vermehrte eosinophile Granulozyten
  - Infiltration durch vermehrte Lymphozyten
  - Becherzellreduktion im Allgemeinen, am Randbereich eines Ulkus, im Kryptenbereich
  - Atypien
  - Panethzellmetaplasie
  - Pseudomembranbildung
  - Pseudopolypenbildung
- Erosion/Ulzeration
  - Regeneratepithelbildung bei angrenzender Entzündung
  - Erosion
  - Ulzeration und/oder Granulationsgewebsbildung
- Lamina propria
  - Infiltration durch vermehrte neutrophile Granulozyten und Infiltrationstiefe
  - Infiltration durch vermehrte eosinophile Granulozyten und Infiltrationstiefe
  - Infiltration durch vermehrte Lymphozyten und Infiltrationstiefe
- Kryptenarchitekturstörung
  - Kryptenabszesse
  - Epithelverdünnung
  - Kryptendestruktion
  - Mukosaatrophie
- weitere Veränderungen
  - Fibrose

- fibromuskuläre Proliferation
- Ödembildung
- Einblutung
- Epitheloidzellgranulome
- Epitheloidzellgranulome mit Riesenzellen

### **Bearbeitung:**

Die Biopsien wurden zunächst in Formaldehyd fixiert, in Paraffinwachs eingebettet und in 4µm dicke Schichten geschnitten. Anschließend wurden sie einer HE-Färbung unterzogen.

### *HE-Färbung:*

1. 2mal 10 min Xylol
2. Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%,70%)
3. 1 min in Aqua destillata
4. 10 min in Hämatoxylin
5. 15 min Spülen in Leitungswasser (warm)
6. wenige Sekunden in Eosin
7. Spülen in Leitungswasser
8. aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%)
9. 2mal 10 min Xylol
10. Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

### **Beurteilung:**

Die Beurteilung ließ sich dabei wie folgt übernehmen:

Die Abwesenheit eines Parameters wurde mit „nicht vorhanden“, bei fehlender Möglichkeit der Beurteilung mit „nicht beurteilbar“ codiert. Des Weiteren wurde bei einigen Parametern in fokale und diffuse Veränderungen unterschieden, wobei eine Änderung des Ausprägungsgrades innerhalb einer Biopsie mit „fokal“ bezeichnet wurde.

Im Epithel wurde das Vorhandensein einer Vermehrung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie von Lymphozyten bewertet. Die Vermehrung von Lymphozyten wurde definiert als das Auftreten von mehr als 15 Lymphozyten innerhalb von 100 Oberflächenzellen, bei den Granulozyten galt die Definition schon ab einer Zellzahl von 3 Entzündungszellen.

Waren weniger als 5% der Krypten von der Vermehrung der Granulozyten betroffen, wurde mit „leicht“ codiert, im Bereich von 5 bis 50% mit „mittel“ und über 50% mit „stark“.

Bei Beurteilung der Becherzellreduktion im Allgemeinen, am Randbereich eines Ulkus und im Bereich von Krypten, die von neutrophilen Granulozyten umgeben waren, wurde zwischen fokaler und diffuser Reduktion unterschieden und die Stärke der Ausprägung als „leicht“, „mittel“ oder „stark“ bewertet. Die Beurteilung „stark“ erfolgte, wenn in mindestens 2 Krypten das Sekret der Becherzellen nahezu komplett entleert war. Nach demselben Prinzip wurden auch die Panethzellmetaplasien eingeteilt.

Das Epithel und die oberflächliche Mukosa wurden schließlich noch im Hinblick auf Epithelotypen und Pseudopolypenbildung auf Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein beurteilt.

Anschließend wurden die Gewebsschnitte hinsichtlich Pseudomembranbildung, Regenerat epithelbildung bei angrenzender Entzündung, fokaler und großflächiger Erosionen und Ulzerationen mit Granulationsgewebsbildung betrachtet und entsprechend codiert.

In der Lamina propria kam die Infiltration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten zur Beurteilung. Hier wurde ebenfalls zwischen fokaler und diffuser Infiltration und dem Stärkegrad in den Ausbildungsstufen „leicht“, „mittel“ und „stark“ unterschieden. Minimale Infiltrationen von Lymphozyten wurden als „nicht vorhanden“ gewertet. Dabei wurde die jeweilige Infiltrationstiefe dahingehend unterschieden, ob sie mehr oder weniger als zwei Drittel der Mukosahöhe betrug.

Die Bezeichnung Kryptenarchitekturstörung umfasst die Parameter Mukosaatrophie mit ausgeprägter Kryptenarchitekturstörung, die als „leicht“ bis „stark“ beurteilt wurde, eindeutige Kryptendestruktion, Ausbildung von Kryptenabszessen und Epithelverdünnung, die auf Vorhanden- bzw. Nicht-Vorhandensein untersucht wurden. Als Mukosaatrophie wurde eine generell vergrößerte Distanz von mehr als einem Kryptendurchmesser zwischen den einzelnen Krypten und/oder eine allgemeine Vergrößerung des Abstands von Krypten und Muscularis mucosae definiert.

Abschließend wurden die Parameter Fibrose, fibromuskuläre Proliferation, Ödembildung, Einblutungen, Ausbildung von Epitheloidzellgranulomen mit oder ohne Riesenzellbildung untersucht, wobei je nach Veränderungsgrad eine Einstufung als „leicht“, „mittel“ oder „stark“ vorgenommen wurde.

## 2.4. Statistische Auswertung

Zur Durchführung der biometrischen Berechnungen dieser Arbeit wurde das Statistikprogramm SPSS verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte sowohl nach univariaten Analysemethoden als auch unter Verwendung logistischer Regressionen.

### Univariate Analyse

Die univariate Analyse erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests. Er dient der Analyse von Häufigkeitsunterschieden bezüglich der Ausprägung eines Merkmals.

Für die interessierenden Variablen, die lediglich in Form einer nominalen Skalierung vorlagen, wurden zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges mit dem Krankheitsverlauf ein  $\chi^2$  – Unabhängigkeitstest durchgeführt. Mittels dieses Auswertungsverfahrens konnte überprüft werden, ob in (mindestens) einer Zelle einer entsprechenden Kreuztabelle die bei Unabhängigkeit der jeweiligen Variablen erwarteten Zellhäufigkeiten von den tatsächlich beobachteten abweichen. Demzufolge würden entsprechende Unterschiede auf einen (ungerichteten) Zusammenhang zwischen der betrachteten Variable und dem Krankheitsverlauf hinweisen.

Hierbei lautet die Nullhypothese  $H_0$ : „Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem einzelnen Parameter und der Entstehung einer Fistel, Stenose oder eines Schubs bei Morbus Crohn.“ Die Alternativhypothese  $H_1$  hingegen besagt: „Es liegt ein Zusammenhang zwischen dem Parameter und der Entwicklung einer Fistel, Stenose oder eines Schubs bei Morbus Crohn vor.“

Die Gruppen werden durch Faktoren, bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit (asymptotische Signifikanz)  $p$ , dass  $H_1$  zutrifft, unter 0,05 (< 5%) beträgt, unterschieden. Daraus folgt, dass die Wahrscheinlichkeit der falschen Annahme „ $H_1$  trifft zu“ kleiner als 5% ist.

### **Logistische Regression**

Bei der Durchführung der logistischen Regression wurden alle Gruppen hinsichtlich aller Parameter miteinander verglichen, um so in der Lage zu sein, durch die Kombination bestimmter voneinander unabhängiger Kriterien eine prädiktive Aussage über den zu erwartenden Krankheitsverlauf treffen zu können.

Als Modell zur Datenauswertung wurde der Chi-Quadrat-Test herangezogen. Die Validität des Modells wurde anhand des Pseudo-R-Quadrat-Tests nach Nagelkerkes beurteilt, sowie mittels der Gesamttrefferquoten in den Klassifikationstabellen und des Omnibus-Testes. Dabei wurde bei einem Wert des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests von  $R^2 > 0,2$  das Modell als akzeptabel, bei  $R^2 \geq 0,5$  als sehr gut befunden.

Zur Berechnung der Regressionskoeffizienten kam die Maximum-Likelihood-Abschätzung zur Verwendung. Anhand der Vorzeichen der Koeffizienten konnte so für die jeweiligen Einflussvariablen die Einflussrichtung bestimmt werden, d.h., ob mit steigender oder sinkender Ausprägung der entsprechenden Variablen die Auftretenswahrscheinlichkeit eher zu- oder abnimmt. Daraus ergibt sich, dass sich die Eintrittswahrscheinlichkeit bei einem positiven Regressionskoeffizienten erhöht, bei einem negativen jedoch abnimmt. Der Zusammenhang der einzelnen Regressionskoeffizienten zum zu bestimmenden Krankheitsverlauf wurde anhand der Signifikanz (p-Wert) anschließend noch einmal überprüft. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner oder gleich 5% als Maßstab gesetzt (86).

Als Effektmaß kamen die Expressions- oder Effektkoeffizienten (odds ratio) zur Anwendung. Sie sind definiert als Verhältnis der Chancen zwischen exponierten und nicht exponierten Personen und geben Aufschluss über die Stärke des Zusammenhangs der einzelnen Variablen zum untersuchten Krankheitsverlauf. Abschließend wurde anhand der Klassifikationstabellen der jeweilige positive bzw. negative Vorhersagewert für das entsprechende Modell errechnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Univariate Analyse

Für die nominal skaliert vorliegenden Daten wurden  $\chi^2$  – Unabhängigkeits- Tests durchgeführt, um für diese mögliche Zusammenhänge mit dem Krankheitsverlauf bei Morbus Crohn zu klären. In den folgenden Tabellen sind für jede der kategorialen Variablen die sich bei Durchführung der Zusammenhangsanalyse ergebende  $\chi^2$  – Prüfgröße nach Pearson, der zugehörige p-Wert (asymptotische Signifikanz) sowie der zugrunde liegende Stichprobenumfang dargestellt. Um die Art des Zusammenhanges näher beurteilen zu können, wurden die dem Signifikanztest zugrunde liegenden Kreuztabellen herangezogen.

Wie bereits im Punkt 2.2 erläutert, erniedrigen sich die zu Grunde liegenden Fallzahlen teilweise. Die Gründe dafür sind bei den klinischen Parametern in nicht erfolgter Bestimmung einiger Parameter (z.B. CRP oder Temperatur) zum Entnahmezeitpunkt und zur Beurteilung nicht ausreichenden, aus den archivierten Krankenakten zu entnehmenden Angaben bezüglich der Medikation zu suchen. Einige der zur Beurteilung der immunhistochemischen Parameter verwendeten Gewebsschnitte ließen keine ausreichende Beurteilung zu, so dass sich auch hier die Fallzahlen teilweise erniedrigen. Der Krankheitsverlauf zweier Patienten konnte aufgrund der Aktenlage nicht ausreichend auf den Zeitraum von einem Jahr nach Entnahme beurteilt werden, so dass sich die Gesamtzahl in dieser Gruppe insgesamt auf 45 Patienten erniedrigt. Die jeweiligen zu Grunde liegenden Fallzahlen (N) lassen sich aus den dazugehörigen Tabellen entnehmen.

### 3.1.1. Auswertung mit Beschränkung auf eine Kolonbiopsie pro Patient

#### 3.1.1.1. Assoziation mit dem Krankheitsverhalten

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen den vorliegenden histologischen Markern, Patientencharakteristika und Medikamenteneinnahme mit dem klinischen Verlauf des Morbus Crohn geprüft. Die Fallzahlen erniedrigten sich insbesondere bei den überprüften immunohistochemischen Parametern zum Teil bei nicht ausreichend verwertbaren Biopsien. Die Gründe für die Erniedrigung der Fallzahlen bei den untersuchten klinischen Parametern sind jeweils unter dem entsprechenden Unterpunkt aufgeführt. Bei der auf eine kolonische Biopsie begrenzten Auswertung ergaben sich für das prinzipielle Krankheitsverhalten folgende signifikante Zusammenhänge:

#### Fistulierender Krankheitsverlauf:

Nominale Variablen mit Zusammenhang mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
Geschlecht	47	6,012	.014
Antibiose	45	4,717	.03

**Tabelle 1: Fistulierender Krankheitsverlauf (Vienna- Klassifikation)- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientenspezifische, therapiebedingte)**

Unter Heranziehung der zugehörigen Kreuztabelle ergaben sich folgende Zusammenhänge: In 14 von 21 Fällen (66,7%) eines *fistulierenden* Krankheitsverlaufs waren die Patienten **weiblich**, hingegen zeigte sich bei Betrachtung der Verläufe *ohne Fistelbildung*, dass in 18 von 26 Fällen (69,2%) die Patienten männlichen Geschlechts waren.

**Antibiotika** wurden von 8 von 20 Patienten (40%) mit Entstehung einer *Fistel* vor dem Entnahmezeitpunkt der Biopsien eingenommen, bei 22 von 25 Fällen (88%) ohne vorhergehende Antibiose wurde ein Krankheitsverlauf ohne Fistelbildung festgestellt. Bei 2 Patienten fanden sich keine ausreichenden Angaben bezüglich einer Medikation mit Antibiotika. Kein Zusammenhang ergab sich zu den untersuchten immunhistochemischen Parametern, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	45	2,273	.321
CD 20	45	3,626	.163
LF in CD 20	47	2,891	.409
Actin	47	5,692	.058
Chymase	46	.801	.670
Tryptase	47	.409	.815
CD 68	43	2,173	.337
CD 4	43	.131	.937
CD 8	43	.942	.624
CD 25	43	.289	.865

**Tabelle 2: Fistulierender Krankheitsverlauf- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen**

### **Stenosierender Krankheitsverlauf**

Aus sämtlichen untersuchten Variablen konnte allein bei einer kolonischen Biopsie pro Patient kein Zusammenhang mit einem generell stenosierenden Krankheitsverlauf hergestellt werden.

Eine Übersicht über die Ergebnisse für die immunhistochemischen Variablen liefert die folgende Tabelle:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	45	2,847	.241
CD 20	45	2,187	.335
LF in CD 20	47	4,669	.198
Actin	47	4,326	.115
Chymase	46	2,982	.225
Tryptase	47	.403	.818
CD 68	43	2,014	.365
CD 4	43	.586	.746
CD 8	43	.885	.643
CD 25	43	1,774	.412

**Tabelle 3: Stenosierender Krankheitsverlauf- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen**

#### **Rein entzündlicher Krankheitsverlauf:**

Ein signifikanter Zusammenhang ergab sich für folgende Variablen:

<b>Nominale Variablen mit Zusammenhang zu einem rein entzündlichen Verlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p-Wert</b>
Lokalisationskategorie der Vienna-Klassifikation	47	8,022	.046

**Tabelle 4: Rein entzündlicher Krankheitsverlauf- Assoziation mit sämtlichen nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte)**

Bei *rein entzündlichen* Krankheitsverläufen stellte sich ein Zusammenhang in der Einteilung in der Gruppe **L der Vienna-Klassifikation** dar. Rein entzündliche Krankheitsverläufe fanden sich bei 2 von 2 (100%) der Patienten der Untergruppe L1 (Befall des terminalen Ileums), dagegen zeigten sich bei 5 von 7 Fällen (71,4%) der Gruppe L2 (Befall des Kolons), 27 von 34 Fällen (79,4%) der Gruppe L3 (Befall des Ileokolons) und 4 von 4 Fällen (100%)

der Gruppe L4 (Befall des oberen Gastrointestinaltraktes) ein Krankheitsverlauf mit Komplikationen.

Zu den immunhistochemischen Variablen bestand kein signifikanter Zusammenhang, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich wird:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	45	2,316	.314
CD 20	45	2,326	.313
LF in CD 20	47	4,666	.198
Actin	47	2,503	.286
Chymase	46	1,050	.592
Tryptase	47	.780	.677
CD 68	43	1,713	.425
CD 4	43	.079	.961
CD 8	43	.649	.723
CD 25	43	4,899	.086

**Tabelle 5: Rein entzündlicher Krankheitsverlauf- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen**

### **3.1.1.2. Assoziation mit dem Auftreten von Komplikationen innerhalb des nächsten Jahres**

#### **Fistulierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:**

Die folgende Tabelle zeigt die Werte für die nominalen Variablen in signifikanter Assoziation mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zum Auftreten einer Fistel innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
CD 68	41	7,735	.021

**Tabelle 6: Fistulierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit sämtlichen nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte)**

Bei Nachweis von vielen **CD68+ - Makrophagen** im histologischen Präparat scheint das Auftreten einer *Fistel innerhalb eines Jahres* nach Biopsieentnahme unwahrscheinlich zu sein. Ein Krankheitsverlauf ohne Fistelbildung in diesem Zeitraum zeigte sich bei 28 von 31 Patienten (90,3%), die eine Vermehrung von CD68+- Zellen aufwiesen. Für die anderen untersuchten Variablen ergab sich bei Verwendung jeweils einer kolonischen Biopsie pro Patient kein Zusammenhang. Einen Überblick über die immunhistochemischen Variablen liefert die folgende Tabelle:

Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einer Fistel innerhalb eines Jahres	N	$\chi^2$ nach Pearson	p- Wert
CD 3	43	.689	.709
CD 20	43	.636	.728
LF in CD 20	45	5,474	.140
Actin	45	4,668	.097
Chymase	44	.897	.639
Tryptase	45	.544	.762
CD 68	41	7,735	.021
CD 4	41	.924	.630
CD 8	41	1,238	.539
CD 25	41	1,839	.399

**Tabelle 7: Fistulierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit histopathologischen, nominalen Variablen**

### Stenosierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:

Für alle untersuchten Variablen bei lediglich einer kolonischen Biopsie pro Patient ergab sich kein Zusammenhang zu einem stenosierenden Krankheitsverlauf, insbesondere für immunhistochemische Parameter:

Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einer Stenose innerhalb eines Jahres	N	$\chi^2$ nach Pearson	p- Wert
CD 3	43	.477	.788
CD 20	43	1,684	.431
LF in CD 20	45	.462	.927
Actin	45	.904	.636
Chymase	44	2,996	.224
Tryptase	45	.643	.725
CD 68	41	4,667	.097
CD 4	41	2,253	.324
CD 8	41	2,324	.313
CD 25	41	.337	.845

Tabelle 8: Stenosierender Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen

### Rein entzündlicher Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zu einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf bis ein Jahr nach Biopsieentnahme	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
Antibiose	43	4,142	.042
CD68	41	8,005	.018

Tabelle 9: rein entzündlicher Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit sämtlichen nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte)

Bei nur 5 von 11 Patienten (45,5%) mit **Antibiose** vor Biopsieentnahme verlief die Krankheit im Zeitraum von einem Jahr im Anschluss *komplikationslos*, dagegen wurden **ohne** Medikation mit **Antibiotika** bei 25 von 32 Patienten (78,1%) *komplikationslose* Verläufe beobachtet. Wiederum konnte bei jetzt insgesamt erniedrigter Fallzahl (45 zu 47) gegenüber dem generellen Krankheitsverhalten die möglicherweise erfolgte Medikation zweier Patienten mit Antibiotika nicht ausreichend evaluiert werden.

Bei Auswertung der zugrunde liegenden Kreuztabelle zeigte sich, dass bei 24 von 31 Patienten (77,4%) mit Nachweis vieler **CD68+ - Makrophagen** ein *rein entzündlicher Krankheitsverlauf* bis ein Jahr nach Biopsieentnahme beobachtet werden konnte, hingegen sich nur bei 7 von 14 Patienten (50%) mit Krankheitsverlauf mit Komplikationen diese Konstellation darstellte.

Für die übrigen immunhistochemischen Variablen ergaben sich folgende Ergebnisse und somit kein nachweisbarer Zusammenhang:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem rein entzündlichen Verlauf innerhalb eines Jahres</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	43	.543	.762
CD 20	43	1,855	.396
LF in CD 20	45	5,467	.141
Actin	45	2,037	.361
Chymase	44	1,096	.578
Tryptase	45	.290	.865
CD 68	41	8,005	.018
CD 4	41	2,673	.263
CD 8	41	4,435	.109
CD 25	41	2,224	.329

**Tabelle 10: rein entzündlicher Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen**

### Entstehung eines Krankheitsschubes innerhalb eines Jahres:

Mit sämtlichen untersuchten Variablen konnte kein Zusammenhang zu einem Krankheitsschub innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme hergestellt werden. In der unten dargestellten Tabelle finden sich die Ergebnisse für die immunhistochemischen Variablen:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem Krankheitsschub innerhalb eines Jahres</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	43	5,050	.080
CD 20	43	1,047	.592
LF in CD 20	45	2,600	.457
Actin	45	.075	.963
Chymase	44	.487	.784
Tryptase	45	.073	.964
CD 68	41	1,241	.538
CD 4	41	1,284	.526
CD 8	41	2,687	.261
CD 25	41	1,541	.463

**Tabelle 11: Schub innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen, nominalen Variablen**

Für folgende Variablen konnte kein Zusammenhang zu den untersuchten Krankheitsverläufen innerhalb des nächsten Jahres nach Biopsieentnahme festgestellt werden: CRP erhöht, Aktivität, Medikation mit Glukokortikoiden, Mesalazin, Azathioprin Methotrexat, sowie die histologischen Parameter CD3, CD20, Actin, Chymase, Tryptase, CD4, CD8 und CD25.

### 3.1.2. Auswertung unter Verwendung aller verfügbaren Biopsien

Zur weiteren Überprüfung von Zusammenhängen zwischen den einzelnen Variablen wurden im zweiten Teil der univariaten Analyse sämtliche Biopsien herangezogen. Die jeweiligen Fallzahlen erniedrigten sich auch hier teilweise, ebenfalls aus den oben beschriebenen Gründen. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

#### 3.1.2.1. Assoziation mit dem Krankheitsverhalten

##### Fistulierender Krankheitsverlauf:

Eine Übersicht über sämtliche nominale Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) in Assoziation mit einem prinzipiell fistulierendem Krankheitsverlauf liefert die folgende Tabelle:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zu einem fistulierenden Krankheitsverlauf	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
Geschlecht	69	4,090	.043
CRP erhöht	60	8,571	.003
Glukokortikoide	67	11,594	.003
Antibiose	67	6,741	.009
CD 20	63	7,245	.027

**Tabelle 12: Fistulierender Verlauf- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

Wie bereits bei Beschränkung der Auswertung auf eine kolonischen Biopsie pro Patient ergab sich auch hier ein Zusammenhang zwischen dem **Geschlecht** der Patienten und der Entwicklung einer *Fistel*. Bei 19 von 33 Biopsien von weiblichen Patienten (57,6%) trat ein fistulierenden Krankheitsverlauf auf, wohingegen bei 24 von 36 Biopsien von männlichen Patienten (66,7%) keine Entstehung einer Fistel beobachtet werden konnte.

Des Weiteren stellte sich ein Zusammenhang zu einem **erhöhten CRP** dar. Bei 24 von 40 Biopsien (60%) von Patienten mit erhöhtem CRP lag ein *fistulierender Verlauf* vor gegenüber 4 von 20 Biopsien (20%) von Patienten, bei denen ein normaler CRP festgestellt wurde. Bei 8 Patienten (9 Biopsien) erfolgte keine Bestimmung des CRP zum Entnahmzeitpunkt.

Von 34 Biopsien, bei denen die Patienten vor der Biopsieentnahme mit **Prednisolon** behandelt wurden, waren 22 (64,7%) mit einem fistulierenden Verlauf assoziiert. 23 von 31 Biopsien (74,2%) von Patienten ohne Medikation sowie 2 von 2 Biopsien (100%) von Patienten, die mit **Budenosid** im Vorfeld therapiert wurden, wiesen dagegen keine Assoziation mit einer Fistel auf.

Bei Auswertung der zugehörigen Kreuztabelle ergab sich, dass bei 10 Biopsien von 13 (76,9%) von Patienten, die vor der Biopsieentnahme eine Medikation mit **Antibiotika** erhalten hatten, ein *fistulierender* Verlauf vorlag. Bei 2 Patienten (2 Biopsien) lagen keine ausreichenden Angaben zur Medikation zum entsprechenden Zeitpunkt vor, so dass sich auch hier die Fallzahl erniedrigt.

Der fehlende Nachweis von **CD20+ - Lymphozyten** korreliert mit einem Krankheitsverlauf ohne Entwicklung einer *Fistel*. Bei 16 von 20 Biopsien (80%) konnte diese Konstellation nachgewiesen werden. Dagegen zeigten 2 von 3 Biopsien (66,7%) von Patienten mit Darstellung vieler CD20+ - Lymphozyten im histologischen Präparat eine Assoziation mit einem fistulierenden Verlauf.

Eine Übersicht über die Ergebnisse für alle untersuchten immunhistochemischen Variablen liefert die folgende Tabelle:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	64	2,715	.257
CD 20	63	7,245	.027
LF in CD 20	69	6,086	.108
Actin	64	5,562	.062
Chymase	58	.373	.830
Tryptase	66	2,619	.270
CD 68	58	2,084	.353
CD 4	58	.169	.919
CD 8	58	1,671	.434
CD 25	58	1,269	.530

**Tabelle 13: Fistulierender Verlauf- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung aller Biopsien**

### Stenosierender Krankheitsverlauf:

Folgende Variablen weisen einen signifikanten Zusammenhang mit einem stenosierenden Verlauf auf:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zu einem stenosierenden Krankheitsverlauf	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
Lokalisationskategorie der Vienna-Klassifikation	69	8,289	.04
Mesalazin	67	4,443	.035

**Tabelle 14: Stenosierender Verlauf- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

In enger Korrelation zu einem *stenosierenden Krankheitsverlauf* steht die Einteilung in der **Lokalisationskategorie der Vienna-Klassifikation**. 2 von 2 Biopsien (100%) von Patienten der Untergruppe L1 (Befall des terminalen Ileums) und 5 von 7 Biopsien (71,4%) von Patienten der Untergruppe L2 (Befall des Kolons) wiesen eine Assoziation mit einem Verlauf ohne Entstehung einer Stenose auf. Dagegen wurde bei 37 von 53 Biopsien (69,8%) von Patienten, die der Untergruppe L3 (Befall des Ileokolons) entnommen wurden, sowie 5 von 7 Biopsien (71,4%) von Patienten der Untergruppe L4 (Befall des oberen Gastrointestinaltraktes) eine Verbindung mit dem Auftreten einer Stenose beobachtet.

Weiterhin zeigten 30 von 51 Biopsien (58,8%) von Patienten, die vor Biopsieentnahme mit **Mesalazin** behandelt worden waren, eine Assoziation mit einem *stenosierenden* Verlauf, gegenüber 14 von 16 Biopsien (87,5%) von Patienten ohne vorherige Medikation. Wiederum bei 2 Patienten (2 Biopsien) konnten keine ausreichenden Angaben zur erfolgten Medikation aus den Akten evaluiert werden.

Kein Zusammenhang ergab sich für die untersuchten immunhistochemischen Variablen, wie aus der unten aufgelisteten Tabelle ersichtlich:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	64	3,057	.217
CD 20	63	1,306	.520
LF in CD 20	69	6,506	.089
Actin	64	.377	.828
Chymase	58	4,182	.124
Tryptase	66	.216	.898
CD 68	58	1,011	.603
CD 4	58	3,483	.175
CD 8	58	1,739	.419
CD 25	58	.819	.664

**Tabelle 15: Stenosierender Krankheitsverlauf- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung aller Biopsien**

#### **Rein entzündlicher Krankheitsverlauf:**

Folgende signifikante Assoziationen ergaben sich mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf:

<b>Nominale Variablen mit Zusammenhang zu einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p-Wert</b>
Geschlecht	69	4,905	.027
Lokalisationskategorie der Vienna-Klassifikation	69	10,002	.019
Azathioprin	68	3,889	.049

**Tabelle 16: Rein entzündlicher Krankheitsverlauf- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

Aus der zugehörigen Kreuztabelle konnte über den Zusammenhang zwischen einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf und dem **Geschlecht** der Patienten ermittelt werden, dass bei Patienten mit weiblichem Geschlecht 3 von 33 Biopsien (9,1%) mit einem

komplikationslosen Krankheitsverlauf vergesellschaftet waren, demgegenüber allerdings bei den männlichen Patienten 11 von 36 Biopsien (30,6%).

Bei Betrachtung der Einteilung in die **Lokalisationskategorie der Vienna-Klassifikation** ergab sich, dass in 2 von 2 Biopsien (100%) der Untergruppe L1 (terminales Ileum) eine *rein entzündliches* Krankheitsbild vorlag, bei 5 von 7 Biopsien (71,4%) der Untergruppe L2 (Kolon), 43 von 53 Biopsien (81,1%) von L3 (Ileokolon) und 7 von 7 Biopsien (100%) von L4 (oberer Gastrointestinaltrakt) jedoch bei den entsprechenden Patienten die Ausbildung von Komplikationen vorherrschte.

Von den Biopsien der Patienten, die vor Entnahme der Biopsien mit **Azathioprin** behandelt wurden, waren 5 von 13 (38,5%) mit einem *rein entzündlichen* Krankheitsverlauf assoziiert, bei fehlender Vormedikation hingegen 8 von 55 (14,5%). Die Fallzahl erniedrigt sich hier auf N = 68, da bei einem Patienten (1 Biopsie) keine Angaben zur möglichen Einnahme von Azathioprin aus der Krankenakte zu entnehmen waren.

Aus den immunhistochemischen Variablen konnte kein Zusammenhang zu einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf hergestellt werden:

<b>Immunhistochemische Variablen in Zusammenhang mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	64	1,969	.374
CD 20	63	3,311	.191
LF in CD 20	69	6,825	.078
Actin	64	2,235	.327
Chymase	58	3,460	.177
Tryptase	66	.431	.806
CD 68	58	2,547	.280
CD 4	58	.493	.782
CD 8	58	.688	.709
CD 25	58	3,199	.202

**Tabelle 17: Rein entzündlicher Krankheitsverlauf- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung aller Biopsien**

### 3.1.2.2. Assoziation mit dem Auftreten von Komplikationen innerhalb des nächsten Jahres nach Biopsieentnahme

Die Fallzahlen erniedrigen sich in dieser Gruppe, wie bereits oben beschrieben, auf maximal  $N = 67$ , da bei 2 Patienten (2 Biopsien) keine ausreichenden Angaben bezüglich des Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme aus den zur Verfügung stehenden Krankenakten ersichtlich waren.

#### Fistulierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:

Folgende Variablen sind signifikant assoziiert mit einem fistulierendem Krankheitsverlauf innerhalb des nachfolgenden Jahres:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zum Auftreten einer Fistel innerhalb eines Jahres	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
CRP erhöht	58	4,006	.045
Glukokortikoide	65	12,658	.002
Antibiose	65	10,037	.002

**Tabelle 18: Fistulierender Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

Bezüglich des Zusammenhangs eines **erhöhten CRP** mit dem Auftreten einer *Fistel* innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme ließen sich mittels der Kreuztabelle folgende Informationen gewinnen: bei 13 von 38 Biopsien (34,2%) von Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Entnahme ein erhöhter CRP vorlag, bestand eine Assoziation zur Entstehung einer *Fistel* innerhalb eines Jahres. Dagegen zeigten 18 von 20 Biopsien (90%) von Patienten mit normalem CRP eine Verbindung zu einem Verlauf ohne *Fistel* im fraglichen Zeitraum. Bei insgesamt 8 Patienten (9 Biopsien) wurde keine Bestimmung des CRP zum Entnahmezeitpunkt durchgeführt.

Weiterhin zeigte sich, dass eine von 30 Biopsien (3,3%) von Patienten, die vor der Entnahme keine Behandlung mit **Glukokortikoiden** erhalten hatten, mit dem Auftreten einer *Fistel innerhalb eines Jahres* in Zusammenhang gebracht werden konnte, derselbe Krankheitsverlauf jedoch bei 13 von 33 Biopsien (39,4%) von Patienten mit vorheriger

Medikation mit Prednisolon und bei keinem von 2 Biopsien (0%) von Patienten mit Medikation mit Budenosid beobachtet wurde.

Nach der Behandlung mit **Antibiotika** vor Biopsieentnahme zeigten 7 von 13 Biopsien (53,8%) der Patienten anschließend eine Assoziation mit einem *fistulierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres*, hingegen nur 7 von 52 Biopsien (13,5%) von Patienten ohne vorherige Medikation. Auch hier erniedrigten sich die Fallzahlen aufgrund nicht ausreichender Dokumentation hinsichtlich der erfolgten Medikation.

Zum Auftreten einer Fistel innerhalb eines Jahres ergab sich aus den Ergebnissen kein Zusammenhang zu den untersuchten immunhistochemischen Variablen.

<b>Immunhistochemische Variablen mit Zusammenhang zum Auftreten einer Fistel innerhalb eines Jahres</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	62	2,134	.344
CD 20	61	1,594	.451
LF in CD 20	67	3,209	.361
Actin	62	1,726	.422
Chymase	56	.805	.669
Tryptase	64	5,096	.078
CD 68	56	1,065	.587
CD 4	56	.081	.960
CD 8	56	3,796	.150
CD 25	56	.621	.733

**Tabelle 19: Fistulierender Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung sämtlicher Biopsien**

### **Stenosierender Verlauf innerhalb eines Jahres:**

Die unten aufgeführte Tabelle liefert einen Überblick über die nominalen Variablen, welche einen signifikanten Zusammenhang mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme aufweisen:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zum Auftreten einer Stenose innerhalb eines Jahres	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
CRP erhöht	58	5,607	.018
Chymase	56	6,684	.035

**Tabelle 20: Stenosierender Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

Bei 20 von 20 Biopsien (100%) von Patienten, die zum Entnahmezeitpunkt ein **CRP** im Normbereich aufwiesen, konnte im *darauf folgenden Jahr* keine Entwicklung einer *Stenose* des betreffenden Patienten beobachtet werden. Dagegen entstand bei den Patienten bei 9 von 38 Biopsien (23,7%) mit erhöhtem CRP im selben Zeitraum eine Stenose. Bei 8 Patienten (9 Biopsien) erfolgte keine Bestimmung des CRP.

Ebenso korreliert das Auftreten einer *Stenose innerhalb eines Jahres* nach Biopsieentnahme mit dem Nachweis von **Chymase- positiven Zellen** im histologischen Präparat. In 27 von 31 Biopsien (87,1%) mit fehlendem und in 17 von 20 Biopsien (85%) mit geringem Nachweis wurde bei dem zugehörigen Patienten kein Auftreten einer Stenose im Zeitraum von einem Jahr beobachtet. Bei 3 von 5 Biopsien (60%) mit gehäuften Auftreten kam es im selben Zeitraum zu einem stenosierenden Krankheitsverlauf bei dem entsprechenden Patienten.

Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über alle Werte für die immunhistochemischen Variablen:

<b>Immunhistochemische Variablen mit Zusammenhang zum Auftreten einer Stenose innerhalb eines Jahres</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	62	1,267	.531
CD 20	61	2,908	.234
LF in CD 20	67	.632	.889
Actin	62	1,082	.582
Chymase	56	6,684	.035
Tryptase	64	1,564	.458
CD 68	56	3,559	.169
CD 4	56	1,909	.385
CD 8	56	.609	.738
CD 25	56	.539	.764

**Tabelle 21: Stenosierender Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung aller Biopsien**

### **Rein entzündlicher Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:**

Folgende Variablen wiesen einen signifikanten Zusammenhang mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme auf:

<b>Nominale Variablen mit Zusammenhang zu einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf bis 1 Jahr nach Biopsieentnahme</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p-Wert</b>
CRP erhöht	58	8,099	.004
Glukokortikoide	65	6,750	.034
Antibiose	65	5,566	.018

**Tabelle 22: Rein entzündlicher Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

Anhand der zugrunde liegenden Kreuztabelle ergab sich, dass bei 18 von 20 Biopsien (90%) von Patienten mit normalem **CRP** zum Entnahmezeitpunkt die Patienten *im Zeitraum eines Jahres* danach einen *rein entzündlichen* Krankheitsverlauf aufwiesen, dagegen galt dies bei 20

von 38 Biopsien (52,6%) von Patienten mit erhöhten CRP. Wie bereits in den vorausgehenden Punkten erniedrigt sich die Fallzahl bei nicht erfolgter Bestimmung des CRP bei 8 Patienten (9 Biopsien).

Bei 24 von 30 Biopsien (80%) von Patienten ohne Behandlung mit **Glukokortikoiden** vor dem Entnahmezeitpunkt, wiesen die Patienten *im darauf folgenden Jahr* eine *rein entzündliche* Krankheitsaktivität auf. Dagegen stellte sich bei 17 von 33 Biopsien (51,5%) von Patienten, die mit Prednisolon therapiert wurden, derselbe Verlauf bei den Patienten dar. Bei 2 von 2 Biopsien (100%) von Patienten mit einer zuvor erfolgten Behandlung mit Budenosid entwickelte sich der Krankheitsverlauf der Patienten ebenfalls komplikationsfrei.

In der Gruppe der Patienten, die vor dem Entnahmezeitpunkt eine **Antibiose** erhalten hatten, wurde bei 5 von 13 Biopsien (38,5%) eine Assoziation mit einem *rein entzündlichen* Krankheitsgeschehen im *darauf folgenden Jahr* beobachtet. Bei 38 von 52 Biopsien (73,1%) von Patienten ohne vorherige Medikation kam es zu einem komplikationslosen Verlauf im selben Zeitraum. Wie bereits beschrieben, konnten bei 2 Patienten (2 Biopsien) keine ausreichenden Angaben zur Medikation gefunden werden.

Keine signifikante Assoziation konnte mit immunhistochemischen Variablen hergestellt werden:

<b>Immunhistochemische Zusammenhang zu entzündlichen Verlauf innerhalb eines Jahres</b>	<b>Variablen zu einem innerlich</b>	<b>mit rein eines</b>	<b>N</b>	<b><math>\chi^2</math> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3			62	.211	.900
CD 20			61	3,852	.146
LF in CD 20			67	4,958	.175
Actin			62	1,121	.571
Chymase			56	1,497	.473
Tryptase			64	3,538	.170
CD 68			56	2,492	.288
CD 4			56	.525	.769
CD 8			56	2,489	.288
CD 25			56	.258	.879

**Tabelle 23: Rein entzündlicher Verlauf innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung aller Biopsien**

### Entwicklung eines Krankheitsschubs innerhalb eines Jahres:

Die nominalen Variablen in signifikantem Zusammenhang zur Entwicklung eines Krankheitsschubs innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme sind unten aufgelistet:

Nominale Variablen mit Zusammenhang zum Auftreten eines Krankheitsschubs innerhalb eines Jahres	N	$\chi^2$ nach Pearson	p-Wert
CRP erhöht	58	6,310	.012
CD 3	62	6,283	.043

**Tabelle 24: Schub innerhalb eines Jahres- Assoziation mit nominalen Variablen (immunhistochemische, patientencharakteristische, therapiebedingte) unter Verwendung aller Biopsien**

Eine enge Korrelation konnte zwischen dem **CRP** zum Entnahmezeitpunkt und der Entwicklung eines *Krankheitsschubs* innerhalb des *darauf folgenden Jahres* festgestellt werden. Bei 22 von 38 Biopsien (57,8%) von Patienten mit erhöhtem CRP fand sich ein Zusammenhang mit einer fehlenden Schubentwicklung innerhalb dieses Zeitraums, gegenüber 18 von 20 Biopsien (90%) von Patienten mit normalem CRP zum Entnahmezeitpunkt. Die Fallzahl erniedrigt sich hier ebenfalls um 9 Biopsien (8 Patienten).

Des Weiteren stellte sich ein Zusammenhang zum Auftreten von **CD3+ - Lymphozyten** im histologischen Bild dar. Bei 2 von 2 Biopsien (100%) mit fehlendem Nachweis derselben entwickelten die entsprechenden Patienten einen *Krankheitsschub innerhalb eines Jahres*, bei vereinzelterem oder gehäuften Auftreten dagegen blieben die Patienten von 21 von 26 Biopsien (80,8%), bzw. 23 von 34 Biopsien (67,6%) schubfrei.

Die übrigen immunhistochemischen Variablen ließen keine Assoziation mit dem Auftreten eines Krankheitsschubs erkennen:

<b>Immunhistochemische Variablen mit Zusammenhang zu einem Schub innerhalb eines Jahres</b>	<b>N</b>	<b>X<sup>2</sup> nach Pearson</b>	<b>p- Wert</b>
CD 3	62	6,283	.043
CD 20	61	1,564	.458
LF in CD 20	67	.887	.829
Actin	62	.728	.695
Chymase	56	.448	.799
Tryptase	64	2,299	.317
CD 68	56	.513	.774
CD 4	56	.617	.735
CD 8	56	1,408	.495
CD 25	56	1,171	.557

**Tabelle 25: Schub innerhalb eines Jahres- Assoziation mit immunhistochemischen nominalen Variablen unter Verwendung aller Biopsien**

### 3.1.3. Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen zu Parametern in Zusammenhang zum Krankheitsverlauf bei Morbus Crohn treffen, bzw. sind in Tabelle 26 wiedergegeben:

Es kristallisiert sich ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und einem prinzipiell fistulierenden oder rein entzündlichen Krankheitsverlaufes heraus. So waren Frauen bei fistulierendem Krankheitsverlauf überzufällig häufig betroffen, hingegen Männer bei einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf. Dies fand sich sowohl bei der Verwendung aller Biopsien als auch bei nur einer Biopsie pro Patient in der statistischen Auswertung.

Ein weiterer Zusammenhang lässt sich mit der Entwicklung eines komplizierten Verlaufs innerhalb der Lokalisationskategorie der Vienna-Klassifikation erkennen. Bei allerdings niedriger Fallzahl zeigt ein rein ilealer Befall einen seltener komplizierten Verlauf als die anderen Lokalisationsarten. Durch die Verwendung aller Biopsien zeigen sich weitere Assoziationen.

Das CRP zeigte lediglich Assoziationen bei Verwendung aller Biopsien, die bei Beschränkung auf eine Biopsie pro Patient verloren gingen. Ähnliches gilt auch für die Medikation mit Glukokortikoiden oder Mesalazin.

Aus den verwendeten immunhistochemischen Parametern kristallisierte sich Folgendes heraus:

Die fehlende Vermehrung von CD3+ - Lymphozyten war mit einem Krankheitsschub innerhalb eines Jahres assoziiert, der Nachweis von spärlichem oder gehäufter Auftreten mit einem Ausbleiben desselben, wenn alle Biopsien verwendet wurden.

Die vermehrte Darstellung von CD20+ - Lymphozyten steht dagegen in Verbindung mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf, allerdings ebenfalls nur dann, wenn alle Biopsien in die Auswertung eingingen und keine Beschränkung auf eine Biopsie pro Patient erfolgte.

Hingegen waren- ebenfalls nur bei Verwendung aller Biopsien- eine Vermehrung von Chymase- positiven Zellen mit der Entwicklung einer Stenose innerhalb eines Jahres assoziiert, nicht jedoch mit der Zugehörigkeit des Patienten zu einem stenosierenden Verlauf. Eine Makrophagenvermehrung fand sich lediglich bei der Beschränkung auf eine Biopsie pro Patient und dann mit einem rein entzündlichen Verlauf, wohingegen ein fistulierender Verlauf dies überzufällig selten aufweist.

Die patientencharakteristischen und therapiebedingten Variablen, bei denen kein Zusammenhang zu den untersuchten Krankheitsverläufen festgestellt werden konnte, sind wie folgt:

- Einteilung in die Untergruppe A (Alter bei Diagnosestellung) der Vienna-Klassifikation
- Krankheitsaktivität bei Biopsieentnahme
- Lokale Medikation mit Glukokortikoiden oder Mesalazin
- Medikation mit Methotrexat

Mit folgenden immunhistochemischen Parametern konnte keine signifikante Assoziation mit dem prinzipiellen Krankheitsverhalten und dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme festgestellt werden:

- Nachweis von CD4+ -, CD8+ - oder CD25+ - Lymphozyten
- Nachweis von Actin oder Tryptase

Eine Übersicht über die nominalen Variablen, welche in der univariaten Analyse eine signifikante Assoziation sowohl mit dem generellen Krankheitsverhalten als auch dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme aufgewiesen haben, liefert die auf der folgenden Seite aufgeführte Tabelle. Dabei kennzeichnet das Symbol „+“ bei der Medikation eine stattgefundene Verabreichung, bei den immunhistochemischen Variablen einen vermehrten Nachweis. Ein fehlender Nachweis in der Immunhistochemie bzw. eine negative Korrelation wird durch „-“ verdeutlicht.

	<b>Alle Biopsien (Ausprägung)</b>	<b>1 Kolonbiopsie / Patient (Ausprägung)</b>
<b>Fistulierender Verlauf</b>	Geschlecht (w) CRP (erhöht) Glukokortikoide (+) Antibiose (+) CD 20 (+)	Geschlecht (w) Antibiose (+)
<b>Stenosierender Verlauf</b>	Lokalisationskategorie der Vienna- Klassifikation (L3, L4) Mesalazin (+)	-
<b>Entzündlicher Verlauf</b>	Geschlecht (m) Lokalisationskategorie der Vienna- Klassifikation (L1) Azathioprin (+)	Lokalisationskategorie der Vienna- Klassifikation (L1)
<b>Fistel innerhalb eines Jahres</b>	CRP (erhöht) Glukokortikoide (+) Antibiose (+)	CD 68 (-)
<b>Stenose innerhalb eines Jahres</b>	Chymase (+) CRP (erhöht)	-
<b>Rein entzündlicher Verlauf innerhalb eines Jahres</b>	CRP (normal) Glukokortikoide (+) Antibiose (-)	CD 68 (+) Antibiose (-)
<b>Schub innerhalb eines Jahres</b>	CD 3 (-) CRP (erhöht)	-

**Tabelle 26: Zusammenfassung aller nominaler Variablen in signifikanter Assoziation mit dem prinzipiellen Krankheitsverlauf und dem Verlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme**

## **3.2. Logistische Regression**

Bei der Berechnung der logistischen Regression wurde eine Einteilung in 4 verschiedene Gruppen vorgenommen. Zur Verwendung kamen die oben beschriebenen Parameter sowie wie erwähnt die bereits in einer vorhergehenden Arbeit erhobenen histologischen Befunde. Aus jeweils mehreren untersuchten Modellen wurde anhand der Gesamttrefferquote sowie des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests und des Omnibus-Tests als Validitätskriterien das für die Vorhersage des jeweiligen Krankheitsverlaufs geeignetste Modell ausgewählt und im Folgenden dargestellt. Wie in der univariaten Analyse wurden zuerst die Modelle unter Verwendung allein einer zufällig ausgewählten kolonischen Biopsie pro Patient, im Anschluss unter Verwendung aller Biopsien errechnet. Unterschieden wurde weiterhin nach Einbeziehung aller untersuchten Variablen als auch gesondert lediglich der immunhistochemischen Variablen.

### **3.2.1. Logistische Regression aller Variablen unter Verwendung einer kolonischen Biopsie pro Patient**

In der ersten Gruppe kamen alle erhobenen Parameter mit  $p \leq 0,1$  im Einzelvergleich außer der Vienna-Klassifikation und des Alters zur Anwendung. Jedoch wurden nur die Daten zu jeweils einer, zufällig ausgewählten kolonischen Biopsie pro Patient benutzt. Auch hier liefern Tabellen einen Überblick über das jeweils am Besten geeignete Modell:

#### **3.2.1.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf**

##### **Fistulierender Krankheitsverlauf:**

Folgendes Modell eignet sich am Besten zur Assoziation mit einem fistulierenden Krankheitsverhalten:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Geschlecht	2,340	,939	,013	10,376	1,647	65,358
Antibiose	2,315	1,125	,040	10,124	1,117	91,776
Actin	1,690	,899	,060	5,419	,930	31,568
Konstante	-3,930	1,509	,009	,020		

**Tabelle 27: Modell zur Assoziation mit einem fistulierenden Krankheitsverlaufs unter Verwendung aller nominalen Variablen**

Aus der Tabelle ersichtlich lässt sich zur Assoziation mit einem *fistulierenden* Verlauf die Kombination der Variablen **weibliches Geschlecht**, Einnahme von **Antibiotika** vor Biopsieentnahme sowie die Überexpression von **Actin** verwenden. Den größten Einfluss weisen das Geschlecht und die Verabreichung einer Antibiose auf.

Das Modell gilt mit einer Gesamttrefferquote von 74,4% und einem Wert des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests von 0,493 als akzeptabel. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,684, der negative 0,8.

#### **Stenosierender Verlauf:**

Zur Assoziation mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf konnte keine Parameterkombination erstellt werden, die die vorausgesetzten Validitätskriterien (Nagelkerkes-R<sup>2</sup>-Test) zufrieden stellend erfüllt.

#### **Rein entzündlicher Krankheitsverlauf:**

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Epithelstörung	-2,833	1,029	,006	,059	,008	,442

**Tabelle 28: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen**

Ein *rein entzündlicher Verlauf* zeigt sich gehäuft bei **fehlendem** Nachweis einer **Epithelstörung** im histologischen Präparat.

Mit  $R^2 = 0,449$  und einer Gesamttrefferquote von 61,9% kann das Modell als akzeptabel angesehen werden. Der positive prädiktive Wert beträgt 0,375, der negative 0,944.

### 3.2.1.2. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres

#### Fistulierender Verlauf innerhalb eines Jahres:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Antibiose	3,272	1,346	,015	26,369	1,884	369,140
CD 68	-2,172	,680	,001	,114	,030	,432

**Tabelle 29: Modell zur Assoziation mit einem fistulierenden Verlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen**

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer *Fistel innerhalb eines Jahres* nach Biopsieentnahme korreliert mit der Gabe von **Antibiotika** in der Zeit vor der Koloskopie sowie dem **fehlenden** Nachweis von **CD68+** - Makrophagen.

Anhand der Gesamttrefferquote von 89,7% und  $R^2 = 0,796$  gilt das Modell definitionsgemäß als sehr gut. Der positive Vorhersagewert ist 0,75, der negative 0,914.

#### Stenosierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CD68	-2,048	,693	,003	,129	,033	,502
Epithelstörung	2,940	1,370	,032	18,911	1,290	277,210

**Tabelle 30: Modell zur Assoziation mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen**

Die Auftretenswahrscheinlichkeit einer *Stenose innerhalb eines Jahres* weist einen Zusammenhang mit der Kombination der Variablen **fehlende** Beobachtung von **CD68+** - Makrophagen und einer **Epithelstörung** im histologischen Präparat auf.

Der Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Test hat dabei einen Wert von 0,696 und die Gesamttrefferquote 84,2%, damit stellt sich das untersuchte Modell als sehr gut heraus. Der positive Vorhersagewert kann mit 0,667, der negative mit 0,882 angegeben werden.

### Rein entzündlicher Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B) unterer W. oberer Wert	
CD 68	3,741	1,496	,012	42,136	,000	.
Infiltration mit Lymphozyten	-1,717	,885	,052	,180	,000	.
Konstante	-2,594	2,498	,299	,075		

**Tabelle 31: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung aller nominalen Variablen**

Ein nach Ablauf *eines Jahres rein entzündlicher* Krankheitsverlauf dagegen wird durch vermehrte Darstellung von **CD68+** - Makrophagen bei gleichzeitig **fehlender vermehrter Infiltration der Lamina propria** durch Lymphozyten charakterisiert. Der größte Einfluss kommt dabei der Darstellung von CD68+ - Makrophagen zu.

Der Wert des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests beträgt für dieses Modell 0,830, die Gesamttrefferquote 90,0%. Damit kann es als sehr gut angesehen werden. Der positive prädiktive Wert beträgt 0,905, der negative prädiktive Wert 0,778.

### Schub innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenz-intervall für EXP (B)	
					unterer W.	oberer W.
Erosion/Ulzeration	1,923	,895	,032	6,839	1,183	39,547
Mukosaatrophie	-,709	,285	,013	,492	,281	,860

**Tabelle 32: Modell zur Assoziation mit einem Krankheitsschub innerhalb eines Jahres unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen**

Mit einem *Krankheitsschub innerhalb eines Jahres* ist der Nachweis von **Erosionen und/oder Ulzerationen** bei gleichzeitig **fehlender Mukosaatrophie** der Krypten im mikroskopischen Bild assoziiert. Die Feststellung der Erosion/Ulzeration stellt dabei die größere Einflussstärke dar.

Für dieses Modell wurden eine Gesamttrefferquote von 68,6% und ein Wert des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests von 0,298 ermittelt, so dass es als akzeptabel betrachtet wird. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,545, der negative 0,75.

In keinem Modell zur Anwendung kamen die folgenden Variablen:

- Krankheitsaktivität zum Entnahmezeitpunkt, Medikation mit Glukokortikoiden systemisch oder topisch, Mesalazin systemisch oder topisch, Azathioprin, Methotrexat,
- immunhistochemischer Nachweis von CD3+ -, CD20+ -, CD4+ - CD8+ - oder CD25+ - Zellen, Tryptase- oder Chymase- positiver Zellen.

### 3.2.2. Logistische Regression lediglich immunhistochemischer Parameter unter Verwendung einer kolonischen Biopsie pro Patient

In der zweiten Gruppe wurden nur die erhobenen immunhistochemischen Parameter zu jeweils einer zufällig ausgewählten kolonischen Biopsie pro Patient zur Eignung der Prädiktion des zu erwartenden Krankheitsverlaufs untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

#### 3.2.2.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlaufs

##### Fistulierender Krankheitsverlauf:

Unter der Voraussetzung eines Wertes größer als 0,2 des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests zur Bestätigung einer akzeptablen Validität des errechneten Modells ergibt sich keine mögliche Kombination der oben genannten Parameter zur Assoziation mit einem fistulierenden Verlauf bei Morbus Crohn.

##### Stenosierender Krankheitsverlauf:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CD 20	1,460	,798	,067	4,304	,901	20,568
LF in CD 20	-1,042	,440	,018	,353	,149	,835
Chymase	1,705	,763	,025	5,502	1,232	24,566
Konstante	-,614	,694	,376	,541		

**Tabelle 33: Modell zur Assoziation mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen**

Wie oben beschrieben lässt sich Assoziation mit einem *stenosierenden* Verlauf ein Modell aus den histologischen Parametern des vermehrten Auftretens von **CD20+** - Lymphozyten bei zugleich **fehlender Lymphfollikelbildung** sowie dem vermehrten Nachweis von **Chymase-positiven Zellen** erstellen. Letztere weist die größte Einflussstärke auf. Falls eine

Irrtumswahrscheinlichkeit von 6,7% nicht mehr akzeptiert wird, kommt der Variable CD20 definitionsgemäß kein Einfluss auf einen stenosierenden Krankheitsverlauf zu.

Mit  $R^2 = 0,364$  und der Gesamttrefferquote von 75,6% konnte das Modell als akzeptabel eingestuft werden. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,810, der negative 0,7.

### **Rein entzündlicher Krankheitsverlauf:**

Aus den verwendeten Variablen konnte kein Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf erstellt werden, das die Validitätskriterien erfüllt.

### **3.2.2.2. Geeignete Modelle zur Prognose des Krankheitsverlaufs innerhalb eines Jahres**

#### **Fistulierender Verlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:**

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CD 68	-1,927	,833	,021	,146	,028	,745
Konstante	1,593	1,349	,238	4,919		

**Tabelle 34: Modell zur Assoziation mit einem fistulierenden Verlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen**

Die Wahrscheinlichkeit einer *Fistelbildung im Zeitraum eines Jahres* nach Biopsieentnahme erhöhte sich bei **fehlendem** Nachweis einer Vermehrung von **CD68+** - Makrophagen im Schnittbild.

Die Gesamttrefferquote betrug 84,7%, der Wert des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests 0,240. Der positive prädiktive Wert kann mit 1,0, der negative mit 0,842 angegeben werden.

### Stenosierender Verlauf innerhalb eines Jahres:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CD 3	3,775	1,659	,023	43,578	1,686	1126,378
Chymase	3,938	1,803	,029	51,320	1,498	1757,881
CD 68	-2,298	1,237	,063	,100	,009	1,134
CD 8	-5,368	2,309	,020	,005	,000	,431
Konstante	-1,950	2,333	,403	,142		

**Tabelle 35: Modell zur Assoziation mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen**

Der vermehrte Nachweis von **CD3+** - Lymphozyten und **Chymase- positiven Zellen** bei gleichzeitig **fehlendem** Nachweis einer Vermehrung von **CD68+** - und **CD8+** - Zellen kann als prädiktiv für die Entwicklung einer *Stenose innerhalb eines Jahres* nach Biopsieentnahme gesehen werden. Der erheblichste Einfluss fällt hierbei der Erhöhung des Anteils Chymase-positiver Zellen zu.

Das Modell wurde bei  $R^2 = 0,587$  und einer Gesamttrefferquote von 89,7% als sehr gut befunden. Der positive prädiktive Wert liegt bei 0,8, der negative bei 0,912.

### Rein entzündlicher Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CD 3	-3,035	1,338	,023	,048	,003	,661
Chymase	-1,583	,930	,089	,205	,033	1,272
CD 68	3,147	1,272	,013	23,261	1,922	281,498
CD 8	3,829	1,564	,014	46,005	2,144	987,111
Konstante	-2,354	2,096	,261	,095		

**Tabelle 36: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen**

Ein *rein entzündlicher Krankheitsverlauf bis ein Jahr* nach Entnahme dagegen korreliert mit der **fehlenden** Vermehrung von **CD3+** - Lymphozyten und **Chymase- positiven Mastzellen** bei gleichzeitig zu beobachtendem vermehrten Auftreten von **CD68+** - und **CD8+** - Zellen, letztere mit der größten Einflussstärke auf den zu erwartenden Verlauf.

Mit  $R^2 = 0,564$  und der Gesamttrefferquote von 82,1% kann das Modell ebenfalls als sehr gut eingestuft werden. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,806, der negative 0,875.

### **Schub innerhalb eines Jahres**

Zur Assoziation mit dem Auftreten eines Krankheitsschubs innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme konnte kein valides Modell erstellt werden.

Die Variablen Actin und Tryptase sowie CD4+ - und CD25+ - Lymphozyten kamen in keinem Modell zur Anwendung.

### 3.2.3. Logistische Regression aller Variablen bei sämtlichen Biopsien

In der dritten Gruppe wurden alle Biopsien miteinbezogen. Überprüft wurde alle Parameter, die in der singulären Analyse eine Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,1$  aufgewiesen haben, ausschließlich der Vienna-Klassifikation und des Alters der Patienten. Die folgenden Tabellen geben die für die Assoziation mit dem Krankheitsverlauf für am besten befundene Modelle wieder:

#### 3.2.3.1. Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf

##### Fistulierender Krankheitsverlauf:

	Regressions	Standard	Signi-	Exp (B)	95% Konfidenzintervall	
	-koeffizient	- fehler	fikanz		für EXP (B)	
	B				unterer Wert	oberer Wert
Geschlecht	3,215	1,171	,006	24,892	2,506	247,256
Glukokortikoide	1,713	,830	,039	5,544	1,090	28,185
Mesalazin	-4,512	1,651	,006	,011	,000	,279
Antibiose	3,268	1,255	,009	26,263	2,243	307,474
CD20	2,377	1,061	,025	10,774	1,346	86,230
Konstante	-2,279	1,231	,064	,102		

**Tabelle 37: Modell zur Assoziation mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf unter Verwendung sämtlicher Variablen bei allen Biopsien**

Als Modell zur Assoziation mit einem *fistulierenden* Krankheitsverlauf eignet sich die Kombination der Parameter **weibliches Geschlecht**, Medikation mit **Glukokortikoiden** und **Antibiotika** sowie **fehlende** Medikation mit **Mesalazin** vor Biopsieentnahme, und der Nachweis von vermehrten **CD20+** - Lymphozyten in der Biopsie. Der größte Einfluss zeigte sich anhand der Effektkoeffizienten (odds ratio) für weibliches Geschlecht und die Medikation mit Antibiotika vor Biopsieentnahme.

Der Wert des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests betrug 0,608, die Gesamttrefferquote 85,7%. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,815, der negative 0,909.

### Stenosierender Krankheitsverlauf:

Zur Assoziation mit einem *stenosierenden* Verlauf ließ sich aus den in dieser Berechnung verwendeten Parametern kein valides Modell erstellen.

### Rein entzündlicher Krankheitsverlauf:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Geschlecht	-2,672	,914	,003	,069	,012	,414
CRP erhöht	-1,997	,669	,003	,136	,037	,504
LF in CD20	,913	,391	,020	2,491	1,158	5,360

**Tabelle 38: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf unter Verwendung sämtlicher Variablen bei allen Biopsien**

In das Modell für einen *rein entzündlichen* Krankheitsverlauf gingen **männliches Geschlecht**, **normaler CRP** zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme und das Auftreten von **CD20-** positiven Lymphfollikeln ein. Letztere wiesen den größten Einfluss auf.

Mit einer Gesamttrefferquote von 88,3% und  $R^2 = 0,632$  wurde das Modell als sehr gut eingestuft. Der positive prädiktive Wert liegt bei 0,8, der negative bei 0,9.

### 3.2.3.1 Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlaufs innerhalb eines Jahres

#### Fistulierender Verlauf innerhalb eines Jahres:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Glukokortikoide	1,573	,734	,032	4,819	1,143	20,326
Antibiose	2,072	,854	,015	7,943	1,488	42,389
Konstante	-2,884	,843	,001	,056		

**Tabelle 39: Modell zur Assoziation mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung sämtlicher Variablen bei allen Biopsien**

Die Entwicklung einer *Fistel innerhalb eines Jahres* wurde gehäuft bei Einnahme von **Glukokortikoiden** und **Antibiotika** vor Biopsientnahme beobachtet, wobei die Antibiose den größeren Einfluss aufwies.

Mit  $R^2 = 0,342$  und einer Gesamttrefferquote von 77,3% gilt das Modell als akzeptabel. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,556, der negative 0,829.

#### Stenosierender Verlauf innerhalb eines Jahres:

	Regression- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Chymase	3,433	1,341	,010	30,956	2,235	428,757
Erosion	3,200	1,654	,053	24,532	,959	627,574
Konstante	-5,569	1,758	,002	,004		

**Tabelle 40: Modell zur Assoziation mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung aller nominalen Variablen bei allen Biopsien**

In das Modell für das Auftreten einer *Stenose im Zeitraum von einem Jahr* nach Biopsieentnahme ging der Nachweis von vermehrten **Chymase- positiven Zellen** mit höchster Einflussstärke und **Erosionsbildung** im histologischen Präparat ein.

Das Modell wurde bei einer Gesamttrefferquote von 97,4% und  $R^2 = 0,508$  als sehr gut geeignet befunden. Der positive Vorhersagewert liegt bei 1,0, der negative bei 0,971.

#### **Rein entzündlicher Verlauf innerhalb eines Jahres:**

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CRP erhöht	-2,237	,922	,015	,107	,018	,651
Glukokortikoide	-1,561	,671	,020	,210	,056	,782
Antibiose	-1,783	,776	,022	,168	,037	,769
Konstante	3,884	1,113	,000	48,618		

**Tabelle 41: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen bei allen Biopsien**

Die Wahrscheinlichkeit eines *rein entzündlichen Verlaufs bis zu einem Jahr* nach Biopsieentnahme korreliert mit **normalem CRP** zum Entnahmezeitpunkt sowie **fehlender** Medikation mit **Antibiotika** und **Glukokortikoiden**, letztere mit größter Einflussstärke unter allen Variablen.

Anhand von  $R^2 = 0,407$  und der Gesamttrefferquote von 70,2% wurde das Modell als akzeptabel befunden. Der positive prädiktive Wert beträgt 0,733, der negative 0,583.

**Krankheitsschub innerhalb eines Jahres:**

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CRP erhöht	2,788	1,482	,060	16,249	,890	296,601
Mukosaatrophie	-1,694	,736	,021	,184	,043	,777
Ödembildung	3,024	1,322	,022	20,565	1,541	274,452
Konstante	-22,417	16390,336	,999	,000		

**Tabelle 42: Modell zur Assoziation mit einem Krankheitsschub innerhalb eines Jahres unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen bei allen Biopsien**

Hingegen steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines *Krankheitsschubs innerhalb* des Zeitraums *von einem Jahr* nach Biopsieentnahme bei **erhöhtem CRP** zum Entnahmetag und **Ödembildung** bei **nicht nachgewiesener Mukosaatrophie** der Krypten im histologischen Präparat.

Mit  $R^2 = 0,506$  und einer Gesamttrefferquote von 81,6% kann das Modell als sehr gut betrachtet werden. Der positive Vorhersagewert ist 0,727, der negative 0,852.

Folgende Parameter waren in keinem der berechneten Modelle relevant:

- die Krankheitsaktivität zum Entnahmezeitpunkt, Medikation mit Azathioprin, lokale Anwendung von Glukokortikoiden oder Mesalazin, Behandlung mit Methotrexat,
- die immunhistochemischen Variablen CD3, CD68, CD4, CD8 oder CD25, Actin oder Tryptase.

### 3.2.4 Logistische Regression allein immunhistochemischer Variablen bei allen Biopsien

Zuletzt wurden in der vierten Gruppe ebenfalls ausschließlich die immunhistochemischen Parameter aller Biopsien zur Analyse herangezogen. Auch hier liefern Tabellen eine Übersicht über die berechneten Ergebnisse:

#### 3.2.4.1 Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf

##### Fistulierender Krankheitsverlauf:

Allein aus den verwendeten immunhistochemischen Variablen konnte mit den zu Grunde liegenden Validitätskriterien kein geeignetes Modell zur Assoziation mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf erstellt werden.

##### Stenosierender Krankheitsverlauf:

Ebenso ergab sich kein Modell zur Vorhersage des rein stenosierenden Krankheitsverlaufs aus allein immunhistochemischen Variablen.

##### Rein entzündlicher Krankheitsverlauf:

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
Actin	-1,305	,783	,095	,271	,058	1,257
Chymase	-1,647	,810	,042	,193	,039	,943
Konstante	,739	1,003	,461	2,094		

**Tabelle 43: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf unter Verwendung allein histochemischer Variablen bei allen Biopsien**

Wie aus der Tabelle ersichtlich, deutet auf einen *rein entzündlichen* Verlauf der **fehlende** vermehrte Nachweis von **Actin** und **Chymase** hin, ersteres nimmt den größeren Einfluss.

Mit  $R^2 = 0,224$  und einer Gesamttrefferquote von 80,4% gilt das Modell als akzeptabel. Der positive prädiktive Wert beträgt 0,5, der negative 0,816.

### 3.2.4.2 Geeignete Modelle zur Assoziation mit dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres

#### **Fistulierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:**

Zur Assoziation mit dem Auftreten einer Fistel innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme konnte kein Modell aus den verwendeten Parametern erstellt werden, das die zu Grunde liegenden Validitätskriterien erfüllt ( $R^2 \geq 0,2$ ).

#### **Stenosierender Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme:**

Auch zur Assoziation mit einem stenosierenden Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres konnte kein geeignetes Modell unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen errechnet werden.

#### **Rein entzündlicher Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres:**

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	Signi- fikanz	Exp (B)	95% Konfidenzintervall für EXP (B)	
					unterer Wert	oberer Wert
CD 3	-1,230	,745	,099	,292	,068	1,259
Chymase	-1,065	,597	,075	,345	,107	1,111
CD 68	1,616	,747	,030	5,034	1,164	21,758
CD 8	1,474	,780	,059	4,366	,947	20,127
Konstante	-1,273	1,557	,414	,280		

**Tabelle 44: Modell zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen bei allen Biopsien**

Ein nach Ablauf *eines Jahres weiterhin rein entzündlicher Krankheitsverlauf* ist am ehesten bei vermehrtem Nachweis von **CD68+ - Makrophagen**(größter Einfluss), sowie **CD8+ - Lymphozyten** anhand der Biopsie und **fehlenden** Vermehrung von **CD3+ - Lymphozyten** und **Chymase** zu erwarten. Jedoch ist aufgrund der Definition, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Abschätzung des Einflusses der einzelnen Variablen auf den Krankheitsverlauf kleiner oder gleich 5% betragen muss, bei 9,9% Irrtumswahrscheinlichkeit für das Auftreten von CD3+ - Lymphozyten, 7,5% für den Nachweis von Chymase und 5,8% für das Auftreten von CD8+ - Lymphozyten allein dem Auftreten von CD68+ - Lymphozyten ein signifikanter Einfluss auf einen rein entzündlichen Krankheitsverlauf bis zu ein Jahr nach Biopsieentnahme zuzuschreiben.

Mittels des Nagelkerke-R<sup>2</sup>-Tests von 0,292 und der Gesamttrefferquote von 73,5% konnte das verwendete Modell lediglich als akzeptabel eingestuft werden. Der positive Vorhersagewert liegt bei 0,786, der negative bei 0,667.

### **Krankheitsschub innerhalb eines Jahres:**

Die Erstellung eines validen Modells zur Assoziation mit einem Krankheitsschub innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme gelang anhand lediglich immunhistochemischer Variablen nicht.

Die folgenden Variablen fanden sich in keinem der erstellten Modelle:

Nachweis von CD20+ - Lymphozyten und CD20-positiven Lymphfollikeln, CD4+ - Lymphozyten und CD68+ - Makrophagen und der Nachweis von Tryptase.

### 3.2.5. Zusammenfassung

Eine Übersicht über die errechneten Modelle unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen liefert die folgende Tabelle. Dabei wurde die Ausprägung der einzelnen Variablen mit „+“ für stattgehabte Medikation oder positiven Nachweis der entsprechenden Zellen oder Enzyme vereinfacht, mit „-“ für unterbliebene Medikation oder den fehlenden Nachweis.

Krankheitsverlauf	Nur eine kolonische Biopsie pro Patient			Alle Biopsien		
	Modell (Ausprägung)	Pos. prädikt. Wert	Neg. prädikt. Wert	Modell (Ausprägung)	Pos. präd. Wert	Neg. prädikt. Wert
<b>Fistel</b>	Geschlecht (w) Antibiotika (+) Actin (+)	0,684	0,8	Geschlecht (w) Glukokortikoide (+) Mesalazin (-) Antibiose (+) CD 20 (+)	0,815	0,909
<b>Stenose</b>	-			-		
<b>Reine Entzündung</b>	Epithelstörung (-)	0,375	0,944	Geschlecht (m) CRP (normal) LF in CD 20 (+)	0,8	0,9
<b>Fistel 1 Jahr</b>	Antibiotika (+) CD 68 (-)	0,75	0,914	Glukokortikoide (+) Antibiose (+)	0,556	0,829
<b>Stenose 1 Jahr</b>	CD 68 (-) Epithelstörung (+)	0,667	0,882	Chymase (+) Erosion (+)	1	0,971
<b>Reine Entzündung 1 Jahr</b>	CD 68 (+) Infiltration mit Lymphozyten (-)	0,905	0,778	CRP (normal) Glukokortikoide (-) Antibiose (-)	0,733	0,583
<b>Schub 1 Jahr</b>	Erosion/ Ulzeration (+) Mukosaatrophie (-)	0,545	0,75	CRP (erhöht) Mukosaatrophie (-) Ödembildung (+)	0,727	0,852

Tabelle 45: Errechnete Modelle unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen

In keinem der errechneten Modelle kamen die folgenden Variablen zur Anwendung:

- Krankheitsaktivität zum Entnahmezeitpunkt, Medikation mit Azathioprin oder Methotrexat, lokale Anwendung von Glukokortikoiden oder Mesalazin
- Immunhistochemischer Nachweis von CD3+-, CD4+-, CD8+ oder CD25+- Zellen, Tryptase- positiven Zellen.

Des Weiteren liefert die unten aufgeführte Tabelle eine Übersicht über die unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen erstellten Modelle. Die Kennzeichnung der Ausprägung der einzelnen Variablen erfolgte mit „+“ für den Nachweis der entsprechenden Zellen oder Enzyme, mit „-“ für den fehlenden Nachweis.

	Nur eine kolonische Biopsie pro Patient			Alle Biopsien		
	Modell (Ausprägung)	Pos. prädikt. Wert	Neg. prädikt. Wert	Modell (Ausprägung)	Pos. prädikt. Wert	Neg. prädikt. Wert
<b>Fistel</b>	-			-		
<b>Stenose</b>	CD 20 (+) LF in CD 20 (-) Chymase (+)	0,810	0,7	-		
<b>Reine Entzündung</b>	-			Actin (-) Chymase (-)	0,5	0,816
<b>Fistel 1 Jahr</b>	CD 68 (-)	1,0	0,842	-		
<b>Stenose 1 Jahr</b>	CD 3 (+) Chymase (+) CD 68 (-) CD 8 (-)	0,8	0,912	-		
<b>Reine Entzündung 1 Jahr</b>	CD 3 (-) Chymase (-) CD 68 (+) CD 8 (+)	0,806	0,875	CD 3 (-) Chymase (-) CD 68 (+) CD 8 (+)	0,786	0,667
<b>Schub 1 Jahr</b>	-			-		

**Tabelle 46: Errechnete Modelle unter Verwendung allein immunhistochemischer Variablen**

In keinem der errechneten Modelle kamen die immunhistochemischen Variablen Actin und CD4+- Zellen zur Anwendung.

## 4 Diskussion

Ein großes Problem bei der Behandlung von Patienten mit Morbus Crohn stellt der variable Krankheitsverlauf dar. Viele Patienten weisen einen so genannten „komplikationslosen“, also rein entzündlichen Verlauf auf, dagegen entwickeln andere Komplikationen wie Fisteln oder Stenosen, welche neue Therapien, oft bis hin zu operativen Eingriffen erfordern. Bisher werden die Patienten nach relativ uniformen Therapieschemata behandelt, welche erst im Falle von Komplikationen modifiziert werden. Aus diesem Grund wäre es wichtig, bereits im Vorhinein Aussagen über den zu erwarteten Krankheitsverlauf treffen zu können, um mit der Auswahl einer geeigneten Medikation das Auftreten von Komplikationen im besten Fall verhindern oder gegebenenfalls die Ausprägung mildern oder verzögern zu können.

Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit ausgewählte immunhistochemische Marker in Kombination mit klinischen Parametern auf eine mögliche Assoziation mit dem Krankheitsverhalten anhand der Vienna-Klassifikation oder aber mit dem Krankheitsverlauf innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme untersucht. Zur Verwendung kamen in Koloskopien gewonnene Biopsien. In einem Arbeitsgang wurden alle Biopsien auf das Auftreten der Marker untersucht und mit dem Krankheitsverlauf assoziiert, in einem zweiten, separat gerechneten, wurde jeweils eine zufällig ausgewählte Kolonbiopsie pro Patient verwendet. Letzteres wurde durchgeführt, um ein Bias durch die Verwendung einer unterschiedlichen Biopsiezahl pro Patient zu verhindern, allerdings mit dem Nachteil, dass die verwendete Zahl an Biopsien insgesamt sinkt und damit auch die Wahrscheinlichkeit, eine vorhandene Assoziation nachzuweisen.

Sowohl in der univariaten Analyse als auch in den logistischen Regressionen zeigte sich eine Assoziation zwischen dem Geschlecht und dem zu erwartenden Krankheitsverlauf. Ein weibliches Geschlecht stand sowohl unter Verwendung aller Biopsien als auch einer zufällig ausgewählten pro Patient mit einem fistulierenden Krankheitsverlauf in Zusammenhang, ein männliches mit einem rein entzündlichen Verlauf. Letzteres war allerdings unter Verwendung allein einer kolonischen Biopsie nicht mehr deutlich. In die logistischen Regressionen fand das Geschlecht ebenfalls teilweise Einzug in die Modelle. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einem weiblichen Geschlecht und einem fistulierenden Verlauf konnte bereits in früheren Studien festgestellt werden (85, 91).

Bei Patienten mit einem fistulierenden oder ein Jahr nach Entnahme fistulierenden Verlauf kristallisierte sich sowohl unter Verwendung aller als auch einer kolonischen Biopsie in

beiden Analysemethoden ein Zusammenhang mit der Einnahme von Antibiotika heraus. Einschränkend ist jedoch zu erwägen, dass die Einnahme von Antibiotika möglicherweise wegen einer Entzündung des Darmes erfolgt sein könnte, die zum Zeitpunkt der Medikation z. B. wegen einer noch nicht erkannten Fistel nötig war. Die Medikation mit Antibiotika wäre somit kein Parameter zur Prädiktion, sondern viel mehr Folge einer noch nicht erfolgten Diagnosestellung einer bereits vorhandenen Komplikation. Unterstützt wird diese Vermutung noch dadurch, dass Patienten, welche einen Krankheitsverlauf ohne Komplikationen ein Jahr nach Biopsieentnahme aufwiesen, eher keine Antibiose erhalten hatten. Insgesamt ergibt sich daher auch eine starke Einschränkung in der Relevanz der erstellten Modelle zur Prädiktion eines fistulierenden Krankheitsverlaufs, da sich neben dem Geschlecht der Patienten die Medikation mit Antibiotika als einzig aussagekräftiger Parameter erwiesen hatte.

Eine Beschränkung der Krankheitslokalisation auf das terminale Ileum (Vienna-Klassifikation L1) wies einen Zusammenhang mit einem rein entzündlichen Verlauf in der univariaten Analyse sowohl unter Verwendung einer kolonischen als auch aller Biopsien auf. Dies fand jedoch keinen relevanten Einzug in die logistischen Regressionen. Im Vergleich zu anderen Arbeiten ist dies jedoch diskrepant. Dort war ein Befall des Ileocolon eher mit der Entstehung von Komplikationen, am ehesten dem Auftreten eine Stenose assoziiert. Die Lokalisation blieb dabei während des Krankheitsverlaufs relativ stabil (92, 93, 94). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte eine Beobachtung der Krankheitsverläufe in diversen Studien teilweise über 10 Jahre, wodurch sich die Aussagekraft natürlich deutlich erhöht, aber für die Vorhersage im Laufe des nächsten Jahres weniger relevant wird.

Es zeigte sich ein Zusammenhang von vermehrten Auftreten von CD68+- Makrophagen mit einem rein entzündlichen Verlauf innerhalb eines Jahres in der univariaten und multivariaten Analyse, sowie ein Zusammenhang des fehlenden Nachweises mit der Entstehung einer Fistel oder Stenose innerhalb eines Jahres in der multivariaten Analyse. Allerdings ist bei Patienten mit Morbus Crohn auch ohne Entstehung von Komplikationen der vermehrte Nachweis von CD68+- Makrophagen in der intestinalen Lamina propria beschrieben worden (95). Zusätzlich fanden sich in den Biopsien aus Fisteln von Patienten mit Morbus Crohn signifikant weniger CD68+- Zellen (75), so dass von einem eher geringen Einfluss auf einen fistulierenden Verlauf ausgegangen werden muss.

Eine weitere Assoziation scheint zwischen der Einnahme von Azathioprin und einem rein entzündlichen Verlauf zu bestehen. Patienten, die eine Medikation mit Azathioprin erhalten hatten, zeigten eher einen Krankheitsverlauf ohne Komplikationen. Dieser Effekt kam allerdings nicht unter Verwendung allein einer kolonischen Biopsie und in den logistischen Regressionsmodellen zum Tragen. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass die Einnahme von Azathioprin einen komplikationslosen Verlauf begünstigt. Auch in anderen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass viele Patienten mit Morbus Crohn von einer Behandlung mit Azathioprin profitieren. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich Patienten, die mehr als 6 Monate mit Azathioprin behandelt wurden, länger in Krankheitsremission befanden als Patienten, welche Azathioprin in einem kürzeren Zeitrahmen erhalten hatten (96). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einem inaktiven Krankheitsverlauf nach 2 Jahren einer Behandlung mit Azathioprin von einer Weiterführung der Medikation profitierten, signifikant häufiger das Bild einer Remission zeigten, dagegen seltener eine Krankheitsaktivität entwickelten, welche Interventionen erforderlich machte (97).

In beiden Analysemethoden konnte eine Assoziation zwischen dem vermehrten Nachweis von Chymase und der Entstehung einer Stenose innerhalb eines Jahres festgestellt werden. Unter Verwendung allein immunhistochemischer Parameter zeigte sich dieser Zusammenhang zusätzlich auch für einen prinzipiell stenosierenden Krankheitsverlauf. Der fehlende Nachweis schien eher auf einen prinzipiell oder innerhalb eines Jahres rein entzündlichen Verlauf hinzudeuten. Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit den Resultaten anderer Arbeiten. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Anzahl Chymase- positiver Mastzellen in der Darmmucosa von Patienten mit inaktivem Morbus Crohn deutlich erhöht war gegenüber einer Vergleichsgruppe von gesunden Menschen, viel mehr jedoch noch bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn (98). Bei letzteren konnten diese Zellen weiterhin in der Submucosa, Muscularis propria und dem umgebenden Fettgewebe dargestellt werden. Insgesamt konnte die Hypothese herausgearbeitet werden, dass Chymase- positive Mastzellen als wichtiger Stimulus für die fortschreitenden Gewebsfibrose und den Gewebsumbau in der Pathophysiologie des Morbus Crohn dienen könnten. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem die hypertrophe und fibrotisch umgewandelte Muscularis propria von Stenosen bei Patienten mit Morbus Crohn eine vergleichsweise hohe Anzahl von Mastzellen aufweist (99). In unmittelbarer Nachbarschaft aller Mastzellen fanden sich zudem vermehrte Gewebsinlagerungen von Laminin, nicht jedoch von Fibronectin oder Vitronectin. Aus

diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass eine Interaktion von Mastzellen mit Muskelzellen deren hypertrophierenden und fibrosierende Reaktion beeinflusst und dadurch wesentlich an der Entstehung einer Fibrose und folglich insgesamt der Entwicklung von Stenosen beteiligt ist.

CD20+- positive Zellen konnten bei Patienten mit einem fistulierenden Verlauf gehäuft nachgewiesen werden, allerdings konnte dieser Effekt unter Heranziehen lediglich einer zufällig ausgewählten Biopsie nicht verifiziert werden. Dies könnte auf eine interindividuell unterschiedliche Bedeutung von CD20+- Zellen hinweisen. Eine vermehrter Nachweis von CD20+- Zellen konnte bereits in einer vorliegenden Studie am äußeren Wall einer Fistel bei Patienten mit Morbus Crohn festgestellt werden (75). Bei den Patienten der Kontrollgruppe konnten dagegen nur vereinzelte CD20+- Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren unabhängig von Fistellokalisierung. Die Zusammenschau der Befund legt daher nahe, dass CD20- positive B- Zellen bei der Entstehung von Fisteln bei einzelnen Patienten mit Morbus Crohn eine bedeutende Rolle spielen könnten.

Der fehlende Nachweis einer Vermehrung von CD3+- Zellen stand unter Verwendung aller Biopsien und univariater Analyse in Assoziation mit der Entwicklung eines Schubs innerhalb eines Jahres. Mittels logistischer Regressionen konnte dies jedoch nicht als relevant identifiziert werden. Neuere Studien zeigen dabei, dass bei Patienten mit Morbus Crohn vermehrt CD3+- Zellen in der kolonischen Mukosa nachgewiesen werden konnten (100). In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass vor allem T-Helfer- Zellen Typ 1 an der Entstehung eines Morbus Crohn beteiligt sind, bei Fortschreiten der Erkrankung möglicherweise aber an Bedeutung verlieren (101). Andererseits konnte gezeigt werden, dass insbesondere CD4- Lymphozyten in der Lamina propria von Patienten mit Morbus Crohn einen chronisch aktiven Phänotyp hervorrufen und eine vermehrte Cytotoxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen (102). So liegt insgesamt die Vermutung nahe, dass T- Lymphozyten die Entzündung unterhalten und daher eine wichtige Rolle für mögliche Exacerbationen spielen könnten. Weitere Arbeiten über den Zusammenhang mit den zu erwartenden Komplikationen im Krankheitsverlauf könnten daher von Interesse sein.

Ebenso wie unter anderem die vorliegende Arbeit setzten sich Rodgers et al. mit der Korrelation des CRP mit dem Krankheitsverlauf bei Patienten mit Morbus Crohn auseinander. Dabei wurde ein erhöhter Wert bei 54% der Patienten mit unauffälligem Verlauf, bei 70% mit

mildem, 75% mit moderatem und 100% mit aggressivem Verlauf festgestellt. Weiterhin wurde in einen rein entzündlichen, fistulierenden oder stenosierenden Verlauf unterteilt. Insbesondere ein stenosierender und unauffälliger Verlauf war negativ mit einem erhöhten CRP assoziiert (103), was sich nur teilweise mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Ein erhöhtes CRP war mit einem generell oder innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme fistulierenden Verlaufs verbunden, ein normales CRP mit einem rein entzündlichen Verlauf innerhalb eines Jahres. Beides konnte jedoch unter Verwendung allein einer kolonischen Biopsie nicht belegt werden. In den logistischen Regressionen stand ein normales CRP in beiden Kategorien in Zusammenhang mit einem rein entzündlichen Verlauf ein Jahr nach Entnahme und bei allen Biopsien mit einem generell rein entzündlichen Verlauf. Beide Arbeiten umfassen ein relativ geringes Patientenkollektiv. Ein großer Vorteil gegenüber anderen Parametern zur Prädiktion des zu erwartenden Krankheitsverlaufs läge dabei sicher in der einfachen Bestimmung des CRP als Bestandteil des Routinelabors.

Mannigfaltig waren die Ergebnisse der Auswertung unter Verwendung aller koloskopisch gewonnenen Biopsien im Vergleich zu jener unter Beschränkung auf lediglich eine zufällig ausgewählte kolonische Biopsie unterschiedlich. So scheinen einige Assoziationen an Signifikanz zu verlieren. Die Verwendung aller Biopsien weist hierbei den Vorteil einer höheren Sensitivität aufgrund der höheren Fallzahlen im Vergleich zur Verwendung nur einer kolonischen Biopsie auf. Allerdings wird dies durch einen Bias erkauft, der in einem verstärkten Einfluss einzelner Patienten mit höherer Biopsiezahl besteht. Der Vorteil beider Gruppen besteht darin, dass konsistente Ergebnisse als zuverlässiger erscheinen.

Unter Betrachtung der positiven und negativen Vorhersagewerte zeigten sich unter Verwendung allein immunhistochemischer Parameter gute Ergebnisse für die Prädiktion eines rein entzündlichen Verlaufs innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme sowohl bei Verwendung einer kolonischen (positiver Vorhersagewert 0,806, negativer 0,875) als auch aller Biopsien (positiver Vorhersagewert 0,786, negativer 0,667). In beiden Modellen kamen die Parameter fehlender Nachweis von CD3+- Zellen, fehlender Nachweis von Chymase, vermehrter Nachweis von CD68+- Makrophagen und CD8+- Zellen vor. Mit positiven Vorhersagewerten zwischen 0,8 und 1,0 ließen sich zudem valide Modelle sowohl zur Prädiktion eines prinzipiell oder innerhalb eines Jahres stenosierenden Verlaufs als auch eines fistulierenden Verlaufs innerhalb eines Jahres erstellen. Einschränkend muss aber erwähnt werden, dass sich dies lediglich unter Verwendung einer zufällig ausgewählten kolonischen

Biopsie pro Patient, nicht jedoch unter Verwendung aller Biopsien zeigte, so dass die Relevanz der Ergebnisse bei höherer Sensitivität letzterer Modelle als stark eingeschränkt zu betrachten ist. Keine Modelle mit ausreichender Signifikanz konnten zur Prädiktion eines fistulierenden oder rein entzündlichen Krankheitsverlaufs sowie der Entwicklung eines Krankheitsschubs innerhalb eines Jahres nach Entnahme erstellt werden. Weder in die Ergebnisse der univariate Analyse noch die mittels der logistischen Regression errechneten Modelle fanden die immunhistochemischen Parameter Actin, Tryptase, CD4+-, CD8+- oder CD25+- Zellen Einzug. Ein Zusammenhang mit dem zu erwartenden Krankheitsverlauf stellt sich in dieser Arbeit nicht dar, so dass eine weitere Erforschung möglicher Zusammenhänge nicht weiterführend erscheint.

Unter Verwendung sämtlicher nominaler Variablen ließ sich mittels logistischer Regression kein geeignetes Modell zur Prädiktion eines stenosierenden Krankheitsverlaufs erstellen. Valide Modelle ließen sich unter Verwendung aller gewonnenen Biopsien zur Prädiktion eines fistulierenden (positiver Vorhersagewert 0,815, negativer 0,909) oder rein entzündlichen Verlaufs (positiver Vorhersagewert 0,8, negativer 0,9) sowie eines Krankheitsverlaufs mit Entwicklung einer Stenose (positiver Vorhersagewert 1, negativer 0,971) oder eines Krankheitsschubs (positiver Vorhersagewert 0,727, negativer 0,852) innerhalb eines Jahres erstellen. Das errechnete Modell zur Prädiktion eines fistulierenden Verlaufs ist wie das Ergebnis bei Beschränkung auf nur eine kolonische Biopsie (positiver Vorhersagewert 0,684, negativer 0,8) jedoch nur teilweise aussagekräftig, da neben dem weiblichen Geschlecht der Medikation mit Antibiotika der größte Einfluss zukam und sich bei der Interpretation der Ergebnisse die bereits oben beschriebene Einschränkung in Hinblick auf mögliche, bereits vorbestehende, noch nicht diagnostizierte Komplikationen ergab. Die gleiche Problematik ergibt sich in Hinblick auf die Modelle zur Prädiktion einer Fistel innerhalb eines Jahres unter Verwendung einer zufällig ausgewählten kolonischen Biopsie. Bei einem positiven Vorhersagewert von 0,75 (negativer 0,914) kommt nur dem fehlenden Nachweis einer Vermehrung von CD68+- Makrophagen ein sicherer Einfluss zu.

Bei Beschränkung auf eine kolonische Biopsie pro Patient konnten bei einem jeweiligen positiven Vorhersagewert von 0,375 und 0,545 keine aussagekräftigen Modelle zur Prädiktion eines rein entzündlichen Verlaufs sowie der Entstehung eines Krankheitsschubes innerhalb eines Jahres erstellt werden. Das Modell zur Prädiktion eines stenosierenden Verlaufs innerhalb eines Jahres weist mit einem positiven Vorhersagewert von 0,667 (negativ 0,882) eine mäßige Signifikanz auf. Das Modell zur Prädiktion eines rein entzündlichen Verlaufs

innerhalb eines Jahres erscheint mit einem positiven Vorhersagewert von 0,905 (negativ 0,778) dagegen auf den ersten Blick eher hilfreich.

Zusammenfassend ließ sich unter Verwendung aller nominaler Variablen kein Modell zur Prädiktion eines stenosierenden Verlaufs erstellen, nur stark eingeschränkt aussagefähige Modelle sowohl unter Verwendung aller als auch Beschränkung auf eine kolonische Biopsie zur Prädiktion eines prinzipiell oder innerhalb eines Jahres fistulierenden Verlaufs. Zur Assoziation mit einem rein entzündlichen Verlauf prinzipiell oder innerhalb eines Jahres und der Entwicklung einer Stenose oder Krankheitsschubs innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme zeigten sich die aussagekräftigeren positiven und negativen Vorhersagewerte unter Verwendung aller Biopsien.

Letztlich ist der Vergleich der Ergebnisse der mit unterschiedlichen Ansätzen erfolgten Regressionsanalysen aber ernüchternd: Keine der Prädiktionsmodelle für einen speziellen Verlaufstyp, also z. B. rein entzündlich, stenosierend oder fistulierend, schließen konsistent die gleichen Parameter als relevant ein. Dies stellt natürlich die Generalisierbarkeit der Modelle insgesamt in Frage. Es wird nichts anderes übrig bleiben, als sie in einer zweiten, größeren Kohorte zu überprüfen. Die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse ist zudem durch die relativ geringen Fallzahlen eingeschränkt.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte mit histopathologischen Parametern ohne Verwendung von immunhistochemischen Färbungen ein Regressionsmodell zur Prädiktion eines unkomplizierten Erkrankungsverlaufs im nächsten Jahr mit einem positiven Vorhersagewert von 0,75 erstellt werden (105). Demgegenüber erbringen die dargestellten Modelle unter Verwendung immunhistochemischer Parameter keine wesentliche Verbesserung. Für einen stenosierenden oder fistulierenden Verlauf hatten die Vorhersagemodelle in der älteren Untersuchung zwar eine hohe Spezifität, aber eine niedrige Sensitivität von 13% bzw. 10%. Gerade für den stenosierenden Verlauf könnte der Einbezug immunhistochemischer Parameter eine Verbesserung erbringen. Je nachdem, ob nur eine kolonische Biopsie pro Patient oder alle Biopsien berücksichtigt wurden, lag die Trefferquote der entworfenen Modelle bei 84,2% bzw. 97,4%. Eine Beschränkung allein auf immunhistochemische Parameter war hingegen gerade in der letzteren Auswertesituation nicht sinnvoll, weil damit kein sinnvolles Modell erstellt werden konnte.

Unabhängig von den in dieser Arbeit untersuchten Markern gibt es weitere – serologische und genetische – Parameter, die bei der Prädiktion des Verlaufs eines Morbus Crohn hilfreich sein könnten. Als einer der am häufigsten diskutierten Parameter steht so z.B. das NOD2/CARD15

(„Nucleotide-Binding oligomerization domain“ / „Caspase recruitment domain“)- Gen in Zusammenhang mit dem Auftreten und dem Krankheitsverlauf bei Morbus Crohn. In einer Studie aus dem vergangenen Jahr wurde gezeigt, dass Mutationen zu einer Dysregulation der Expression von DMBT1 und damit zu einer Störung der intestinalen Barrierefunktion führen können (106). NOD2/CARD15- Varianten schienen in einer anderen Untersuchung weiterhin mit dem Auftreten von Stenosen assoziiert zu sein, welche eine frühe operative Behandlung nötig machen, jedoch auch eine hohe Rückfallquote aufweisen (107). Zusätzlich wurden Mutationen des NOD2/CARD15- Gens (R702W, G908R, 1007fs) in Zusammenhang mit einem Befall des terminalen Ileums und des Ileokolons und eines insgesamt fibrostenosierenden Verlaufs sowie einem früheren Krankheitsbeginn in Verbindung gebracht. Eine besondere Rolle kommt dabei R702W zu, welches prädisponierend für einen generalisierteren und ausgedehnteren Verlauf zu sein scheint (108).

In einer weiteren Studie wurde der ASCA- Titer auf seine Bedeutung als Marker für den klinischen Verlauf untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein erhöhter Titer mit einem Befall des terminalen Ileums sowie einem Verlauf mit Komplikationen wie Fisteln oder Stenosen, und damit einem frühen Entstehen von Komplikationen assoziiert war. Betroffene Patienten könnten daher von aggressiveren antiinflammatorischen Therapien, welche möglicherweise das Auftreten von Komplikationen hinauszögern oder verhindern, profitieren (109). Weiterhin scheinen Patienten mit erhöhten Titern von ASCA- IgA und -IgG vermehrt einen Befall des oberen Gastrointestinaltraktes gemäß der Vienna- Klassifikation aufzuweisen, seltener jedoch einen alleinigen kolorektalen Befall (110). Ebenso stehen andere Antikörper, außer jenen gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), also Anti- Laminaribioside (ALCA), Anti- Chitobioside (ACCA), Anti- Mannobioside (AMCA) und Anti- äußere Membranporine (Omp), in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Morbus Crohn. Erhöhte Titer korrelieren zum Teil mit einem komplizierten Verlauf und dem frühen Bedarf operativer Eingriffe (111, 112).

Es darf daher spekuliert werden, dass das Einbeziehen weiterer Faktoren als rein histopathologischer und immunhistochemischer eine bessere Prädiktion ermöglichen könnte. Abschließend bleibt zu vermerken, dass in dieser Arbeit für die Prädiktion von Krankheitsverläufen bei Morbus Crohn Modelle erstellt wurden, deren Nutzen in weiteren Kohorten überprüft werden muss. Somit stellt diese explorative Analyse einen weiteren Schritt hin zu einer besseren Vorhersage dar.

## 5 Zusammenfassung

Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, welche einen äußerst variablen Verlauf aufweist. Zum einen ist die Krankheit durch Schübe mit erhöhter Aktivität charakterisiert, zum anderen durch das Gegenüber von rein entzündlichen Krankheitsverläufen und Verläufen mit der Entstehung von Komplikationen wie Fisteln und Stenosen. Marker, welche mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sind und Komplikationen voraussagen können, wären daher von großem Nutzen.

In dieser Arbeit wurden insbesondere immunhistochemische Parameter (Actin, Chymase, Tryptase, CD3, CD4, CD8, CD25 und CD68) aus Darmbiopsien, aber auch klinische Parameter auf eine mögliche Korrelation mit dem Krankheitsverlauf insgesamt und innerhalb eines Jahres nach Biopsieentnahme untersucht.

In der univariaten Analyse waren folgende Parameter mit dem Krankheitsverlauf assoziiert: weibliches Geschlecht (Fistel), Befall des terminalen Ileum (kompliktionsloser Verlauf), fehlender Nachweis einer Vermehrung von CD3-positiven Lymphozyten (Krankheitsschub innerhalb eines Jahres), vermehrte CD20-Lymphozyten (Fistel) und vermehrter Nachweis von Chymase-positiven Zellen (Stenose innerhalb eines Jahres). In logistischen Regressionsanalysen ließen sich bei Verwendung nur einer Biopsie pro Patient als sehr gut bewertete Modelle (Nagelkerke  $R^2 \geq 0,5$ ) für einen rein entzündlichen Verlauf innerhalb eines Jahres, eines fistulierenden Verlaufs innerhalb eines Jahres und eines stenosierenden Verlaufs innerhalb eines Jahres erstellen. Die Wertigkeit des Modells für den fistulierenden Verlauf erscheint wegen der Bedeutung des Parameters „Antibiose“ fraglich. Die Beschränkung auf immunhistochemische Parameter ergibt lediglich schwächere Modelle. Für den prinzipiellen Krankheitsverlauf ließen sich keine oder lediglich akzeptable Modelle ( $0,2 < R^2 < 0,5$ ) errechnen. Die Verwendung aller Biopsien erbringt Modelle mit zum Teil erheblich unterschiedlichen Einflußparametern.

Der Nutzen der gefundenen Prädiktionsmodelle muss in einer zweiten Kohorte bestätigt werden. Allerdings lässt die fehlende Konsistenz der Einflußparameter Zweifel an der Reliabilität der Modelle.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Stange E, Schreiber S, Fölsch U, von Herbay A, Schölmerich J (2003): Diagnostik und Therapie des M. Crohn - Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. *Z Gastroenterol* 41: 19-20
- 2 Shivanda S, Lennard-Jones J, Logan R, EC-IBD Study Group (1996): Incidence of inflammatory disease across Europe: Is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study of inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 39:690-697
- 3 Loftus EV Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ et al. (1998): Crohn`s disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence and survival. *Gastroenterology* 114:1161-1168
- 4 Sonnenberg A, McCarthy DJ, Jacobsen SJ (1991): Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 100:143-149
- 5 Adler G: *M. Crohn, Colitis ulcerosa*. Springer; Berlin-Heidelberg-New York, 2. Auflage, 1996
- 6 Russel MG, Stockbrugger RW (1996): Epidemiology of Crohn`s disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. *AM J Gastroenterol* 94: 2961-2965
- 7 Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP (1996): Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 38: 738-741
- 8 Tysk C, Riedesel H, Lindberg E et al. (1991): Colonic glycoproteins in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100: 419-423
- 9 Monsen U, Brostrom O, Nordenvall B, Sorstad J, Hellers G (1987): Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 22: 214-218
- 10 Sirlin SM, Benkov KJ, Kazlow P et al. (1986): Identical twins concordant for Crohn`s disease. *J Clin Gastroenterol* 8: 290-294
- 11 Satsangi J, Jewell DP, Bell JI (1997): The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 40: 572-574
- 12 Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH (1995): Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109: 1344-1367

- 13 Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W (1993): IL-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-274
- 14 Sadlack B, Nerz H, Schorle H et al. (1993): Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2-gene. *Cell* 75: 253-261
- 15 Shull MK, Ormsby I, Kier AB (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor  $\beta$ 1, gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699
- 16 Satsangi J, Parkes M, Louis E et al. (1996): Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 14: 199-202
- 17 Hugot LP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al (1996): Mapping of a susceptibility locus for Crohn`s disease on Chromosome 16. *Nature* 379: 821-823
- 18 Cuthbert AP, Fisher SA et al (2002): The contribution of NOD2 gene mutation to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 867-874
- 19 Helio T, Halme L, Lappalainen M et al. (2003): CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn`s disease. *Gut* 52: 558-562
- 20 Vermeire S, Wild G, Kocher K et al. (2002): CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 71: 74-83
- 21 Hugot JP, Camailard M, Zouali H et al. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn`s disease. *Nature* 411: 599-603
- 22 Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y et al. (2002): Lack of common NOD2-variants in Japanese patients with Crohn`s disease. *Gastroenterology* 123: 86-91
- 23 Danze PM, Colombel FJ, Jacquot S et al. (1996): Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn`s disease. *Gut* 39: 69-72
- 24 Nakajima A, Matsushashi N, Kodama T et al. (1995): HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn`s disease. *Gastroenterology* 109: 1462-1467
- 25 Toyoda H, Wang SJ, Yang HY et al. (1993): Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104: 741-748
- 26 Satsangi J, Welsh KI, Bunce M et al. (1996): Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 347: 1212-1217

- 27 Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK et al. (1994): Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 106: 637-642
- 28 Yang H, Vora DK, Targan SR et al. (1995): Intercellular adhesion molecule 1 gene associations with immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109: 440-448
- 29 Podolsky DK, Isselbacher KJ (1984): Glycoprotein composition of colonic mucosa. Specific alterations in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 87: 991-998
- 30 Peña AS, Crusius JBA (1998): Genetics of inflammatory bowel disease: Implications for the future. *World J Surg* 22: 390-393
- 31 The Wellcome Trust Case Control Consortium (2007): Genome- wide association study of 14000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 447: 661-677.
- 32 Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS et al. (1996): Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis and arthritis in HLA-B27 human  $\beta$ 2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 98: 945-953
- 33 Koutroubakis I, Manousos ON, Meuwissen SG, Pena AS (1996): Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 43: 381-393
- 34 Schölmerich J, Andus T, Gross V (2000): Etiology and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease- Environmental Factors. *Hepato-Gastroenterol* 47: 29-43
- 35 Thomas GA, Rhodes J, Green JT (1998): Inflammatory bowel disease and smoking- a review. *Am J Gastroenterol* 93: 144-149
- 36 Timmer A, Sutherland LR, Martin F et al. (1998): Oral Contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn`s disease. *Gastroenterology* 114: 1143-1150
- 37 Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, Wakefield AJ (1999): Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 116: 796-803
- 38 Wakefield AJ, Ekblom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE (1995): Crohn`s disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108: 911-916

- 39 Feeney M, Ciegg A, Winwood P, Snook J (1997): a case-control study of measles vaccination and inflammatory bowel disease. The East Dorset Gastroenterology Group. *Lancet* 350: 764-766
- 40 Jones P, Fine P, Piracha S (1997): Crohn`s disease and measles. *Lancet* 349: 473
- 41 Thompson NP, Fleming DM, Pounder RE, Wakefield AJ (1996): Crohn`s disease, measles and measles vaccination: a case-control failure. *Lancet* 347:263
- 42 Liu Y, Van Kruiningen HJ, West AB et al. (1995): Immunocytochemical Evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus Antigens in Crohn`s disease. *Gastroenterology* 108: 1396-1404
- 43 Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, Hermon-Taylor J (1992): Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn`s disease tissue. *Gut* 33: 890-896
- 44 Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M et al. (1994): Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35: 353-359.
- 45 Katz KD, Hollander D, Vadheim CM et al. (1989): Intestinal permeability in patients with Crohn`s disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 97: 927-931
- 46 May GR, Sutherland LR, Meddings JB (1993): Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn`s disease? *Gastroenterology* 104: 1627-1632
- 47 Munkholm P, Langholz E, Hollander D et al. (1994): Intestinal permeability in patients with Crohn`s disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut* 35: 68-72
- 48 Hermiston ML, Gordon JI (1995): Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270:1203-1207
- 49 Mashimo J, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC (1996): Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274: 262-265
- 50 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. (2004): NOD2 (CARD15) mutations in Crohn`s disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ - defensin expression. *Gut* 53: 1658-1664.
- 51 Sartor RB (1997): Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 92: 59-119
- 52 Autenrieth IB, Bucheler N, Bohn E, Heinze G, Horak I (1997): Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2-deficient mice with bowel inflammation. *Gut* 41: 793-800

- 53 Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W (1997): Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 158: 56-573
- 54 Ma A, Datta M, Margosian E, Chen J, Horak I (1995): T-cells, but not B-cells, are required for bowel inflammation in interleukin-2-deficient mice. *J Exp Med* 182: 1567-1572
- 55 Harrison TR (1999): Entzündliche Erkrankungen des Darms: Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Harrison`s Innere Medizin, 14. Auflage McGraw-Hill, 1922-1937
- 56 Otto HF, Remmele W (1996): Entzündliche Darmerkrankungen. In Remmele W (Hrsg) Pathologie, Bd. II. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 163-186
- 57 Fahrländer H, Bianchi L, Mihatsch MJ (1979): Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde. Bd.42. Springer, Berlin Heidelberg New York: 1-111.
- 58 Renison DM, Forouhar FA, Levine JB, Breiter JR (1983): Filiform polyposis of the colon presenting as massive hemorrhage: an uncommon complication of Crohn`s disease. *Am J Gastroenterol* 78:413-416
- 59 Ambroze WL, Pemberton JH, Dozios RR et al. (1993): The histological pattern and pathological involvement of the anal transition zone in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104: 514-518
- 60 Von Herbay A (1996): Pathologie der idiopathischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. In Adler G (Hrsg): Morbus Crohn – Colitis ulcerosa, 2. Aufl., Springer Berlin Heidelberg New York, S.163-186
- 61 Tanaka M, Riddell RH, Saito H et al. (1999): Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn`s disease from ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 34(1): 55-67
- 62 Theodossi A, Spiegelhalter DJ, Jass J et al. (1994): Observer variation and discriminatory value of biopsy features in inflammatory bowel disease. *Gut* 35: 961-968
- 63 Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB (1975): Clinical patterns in Crohn`s disease. A statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 70: 369-370
- 64 Sachar DG, Andrews HA, Farmer RG et al. (1992): Proposed classification of patient subgroups in Crohn`s disease. *Gastroenterol Intl* 5: 141-154

- 65 Gasché C, Schölmerich J, Brynskov J et al. (2000): A simple classification of Crohn`s disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 6: 8-15
- 66 Cosnes J, Cattan S, Blain A et al. (2002): Long-term evolution of disease behaviour of Crohn`s disease. *Inflamm Bowel Dis* 8: 244-250
- 67 Louis E, Michel V, Hugot JP et al. (2003): Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn`s disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD 15 genotype. *Gut* 52: 552-557
- 68 Veloso FT, Ferreira JT, Barros T, Almeida S (2001): Clinical outcome of Crohn`s disease: analysis according to the Vienna classification and clinical activity. *Inflamm Bowel Dis* 7: 306-313
- 69 Schölmerich J, Gasché C (2000): Complications of inflammatory bowel disease. *Hepato-Gastroenterology* 47: 49-56
- 70 Buhr HJ, Kroesen AJ, Stange EF (2003): Leitlinien der DGVS: Chirurgie – Fisteln. *Z Gastroenterol* 41:43-49
- 71 Van Hogezaand RA, Witte AMC, Veenendaal RA, Wagtmans MJ, Lamers CBHW (2001): Proximal Crohn`s disease: review of the clinicopathologic features and therapy. *Inflamm Bowel Dis* 7: 328-337
- 72 Thomas-Gibson S, Brooker JC, Hayward CM et al. (2003): Colonoscopic balloon dilation of Crohn`s strictures: a review of long-term outcomes. *Eur J Gastroenterol* 15: 485-488
- 73 Yamamoto T, Allan RN, Keighley MR (1999): An audit of gastroduodenal Crohn`s disease: clinicopathologic features and management. *Scand J Gastroenterol* 34: 1019-1024
- 74 Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G et al. (1984): Natural history of recurrent Crohn`s disease at the ileocolonic anastomosis after curative surgery. *Gut* 25: 665-672
- 75 Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holmstrom B (1980): Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn`s disease. *Gut* 21: 525-527
- 76 Michelassi F, Stella M, Balestracci T et al. (1993): Incidence, diagnosis and treatment of enteric and colorectal fistulae in patients with Crohn`s disease. *Ann Surg* 218: 660-666
- 77 Bataille F, Klebl F, Rümmele P et al. (2004): Morphological characterisation of Crohn`s disease fistulae. *Gut* 53: 1314-1321

- 78 Givel JC, Hawker P, Allan R, Keighley MR, Alexander-Williams J (1983): Enterointeric fistula complicating Crohn`s disease. *J Clin Gastroenterol* 5: 321-323
- 79 Present DH (2002): Urinary tract fistulas in Crohn`s disease: surgery versus medical therapy. *Am J Gastroenterol* 97: 2165-2167
- 80 Buhr HJ, Kroesen AJ, Herfarth C (1995): Surgical therapy of recurrent Crohn`s disease. *Chirurg* 66: 764-773
- 81 Hoffmann JC, Zeitz M (2000): Treatment of Crohn`s disease. *Hepatogastroenterology* 47: 90-100
- 82 Bell SJ, Kamm MA (2000): Review article: The clinical role of anti-TNF- $\alpha$  antibody treatment in Crohn`s disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 501-514
- 83 Present DH (1999): Review article: The efficacy of infliximab in Crohn`s disease – healing of fistulae. *Aliment Pharmacol Ther* 13(Suppl 4): 23-28
- 84 Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T et al. (2003): Antibiotics and azathioprine for the treatment of perianal fistulae in Crohn`s disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 1113-1120
- 85 Schwartz DA, Loftus EV, Tremaine WJ et al. (2002): The natural history of fistulizing Crohn`s disease in Olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology* 122: 875-880
- 86 Backhaus, Erichson, Plinke, Weiber: *Multivariate Analysemethoden- eine anwendungsorientierte Einführung*. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg- New York, 10. Auflage (2003)
- 87 Hastka J: *Immunzytologie*. Schattauer-Verlag, Stuttgart- New York, 1997 : 47-57
- 88 Thomas L: *Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. TH- Books, Frankfurt am Main, 6. Auflage (2005): 1940-1944
- 89 Janeway C, Travers P: *Immunologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg- Berlin, 5. Auflage (2002): 707-712
- 90 Böcker, Denk, Heitz: *Pathologie*. Urban & Fischer, München, 3. Auflage (2004): 114-127
- 91 Tekkis PP, Fazio VW, Remzi F et al (2005): Risk factors associated with ileal pouch- related fistula following restorative proctocolectomy. *Br J Surg* 92 (10): 1270-1276

- 92 Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E et al (2002): Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 51(4): 614
- 93 Louis E, Michel V, Hugot JP et al (2003) : Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut* 52(4): 552-557
- 94 Oostenbrug LE, van Dullemen HM, te Meerman GJ et al (2006): Clinical outcome of Crohn's disease according to the Vienna classification: disease location is a useful predictor of disease course. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18(3). 255-261
- 95 Nishida Y, Murase K, Isomoto H et al (2002): Different distribution of mast cells and macrophages in colonic mucosa of patients with collagenous colitis and inflammatory bowel disease. *Hepatology* 49(45): 678-682
- 96 Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP (2002): The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 50(4): 485-489
- 97 Vilien M, Dahlerup JF, M'Nunck LK et al (2004): Randomized controlled azathioprine withdrawal after more than two years treatment in Crohn's disease: increased relapse rate the following year. *Aliment Pharmacol Ther* 19(11):1147-1152
- 98 Andoh A, Deguchi Y, Inatomi O et al (2006): Immunohistochemical study of chymase- positive mast cells in inflammatory bowel disease. *Oncol Rep* 16(1): 103-107
- 99 Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V et al (1999): Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 45 (2): 210-217
- 100 Berndt U, Bartsch S, Philipsen L et al (2007): Proteomic analysis of the inflamed intestinal mucosa reveals distinctive immune response profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Immunol* 179(1): 295- 304
- 101 Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L et al (2007): Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 56(12): 1696-1705
- 102 Mariani P, Bachetoni A, D` Alessandro M et al (2000): Effector Th-1 cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 45(10): 2029-2035

- 103 Rodgers AD, Cummins AG (2007): CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn`s disease. *Dig Dis Sci* 52(9): 2063-2068
- 104 Rosenstiel P, Sina C, End C et al (2007): Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol* 178(12): 8203-8211.
- 105 Bataille F, Klebl F, Ruemmele P et al (2003): Histopathologic parameters as predictors for the course of Crohn`s disease. *Virchows Arch* 443: 501-507.
- 106 Rosenstiel P, Sina C, End C et al (2007): Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol* 178(12): 8203- 8211.
- 107 Alvarez-Lobos M, Arostequi JI, Sans M et al (2005): Crohn`s disease patients carrying Nod 2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 242(5): 693- 700.
- 108 Crawford NP, Colliver DW, Eichenberger MR et al (2007): CARD15 genotype-phenotype relationships in a small inflammatory bowel disease population with severe disease affection status. *Dig Dis Sci* 52(10): 2716- 2724.
- 109 Dassopoulos T, Frangakis C, Cruz-Correa M et al (2007): Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in Crohn`s disease: higher titers are associated with a greater frequency of mutant NOD2/CARD15 alleles and with a higher probability of complicated disease. *Inflamm Bowel Dis* 13(2): 143-151.
- 110 Klebl F, Bataille F, Berteau CR et al (2003): Association of perinuclear antineutrophil cytoplasmatic antibodies and anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies with Vienna classification subtypes of Crohn`s disease. *Inflamm Bowel Dis* 9: 302-307.
- 111 Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M et al (2007): New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 56(10): 1394-1403.
- 112 Targan SR, Landers CJ, Yang H et al (2005): Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn`s disease. *Gastroenterology* 128(7): 2020-2028.

## **7 Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an PD Dr. Frank Klebl für die tolle Betreuung, das große Verständnis und schier endlose Geduld bei allen Komplikationen und Verzögerungen. Einen hilfsbereiteren, freundlicheren und kompetenteren Doktorvater hätte ich mir nicht wünschen können! Ein weiterer, nicht minder herzlicher Dank geht an PD Dr. Frauke Bataille für die hervorragende Betreuung und große Hilfestellung bei allen Fragen. Ebenso bin ich Christian Huy, in dessen Aufgabenbereich sämtliche Behandlung der Biopsien gefallen ist, und Siegrid Meckel für die große Hilfe, freundliche und ausdauernde Beantwortung aller meiner Fragen sehr zu Dank verpflichtet. Außerdem möchte ich mich bei Professor Dr. Schölmerich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Sylvia Goss bedanken für die große Geduld und großartige Hilfe bei Auswertung der Statistiken, die sich mir ohne sie nicht so leicht erschlossen hätten. Ebenso bedanke ich mich bei Matthias Gruber für das erste Korrekturlesen, die vielen guten Tipps und nicht zuletzt die moralische Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Archivs der Uniklinik Regensburg, welche mir mit viel Geduld bei der Suche und bei der Behebung so mancher Gerätefehler zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich mich zum Abschluss bei meiner Familie und Olaf bedanken für die vielen Aufmunterungen, die große Unterstützung und manchmal auch den nötigen Schubs, ohne die diese Arbeit vermutlich nie entstanden wäre.

## 7.2 Lebenslauf

Geboren am 29.12.1978 in Regensburg, Eltern Elvira Liebl geb. Hofmann und Peter Liebl

1989 – 1998	Von- Müller- Gymnasium, Regensburg
1998	Abitur in den Fächern Latein, Mathematik, Deutsch, Geschichte
11/1998 – 11/2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
07/2002	Famulatur Innere Medizin, Caritaskrankenhaus St. Josef, Regensburg
08/2003	Famulatur Pathologie, Landeskliniken Salzburg
03/2004	Famulatur Neurologie, Krankenhaus München Bogenhausen
08/2004	Famulatur Radiologie, Krankenhaus München Bogenhausen
2005 – 2006	Praktisches Jahr, davon <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Terial Innere Medizin in den Abteilungen Gastroenterologie und Hämatologie/Onkologie, Uniklinik Regensburg</li> <li>2. Terial Radiologie, Kantonsspital Olten, Schweiz</li> <li>3. Terial Chirurgie, Krankenhaus Bruneck, Italien</li> </ol>
11/2006	2. Ärztliche Prüfung ( Neue Approbationsordnung )
12/2006	Approbation
seit 07/2007	Assistenzärztin im Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, Klinikum Ingolstadt