

Aus dem Bereich Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. Rima Obeid

Knochenmarker und B- und D-Vitamine bei Kindern und Jugendlichen mit gastrointestinalen Erkrankungen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Nicole Klein

geboren am 02. Juli 1987 in Neunkirchen (Saar)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Morbus Crohn (M. Crohn).....	2
1.1.1 Inzidenz des M. Crohn	2
1.1.2 Pathogenese des M. Crohn.....	3
1.1.3 Klinik des M. Crohn	9
1.1.4 Diagnostik des M. Crohn	11
1.1.5 Therapie des M. Crohn	12
1.2 Zöliakie	14
1.2.1 Prävalenz der Zöliakie.....	14
1.2.2 Pathogenese der Zöliakie.....	15
1.2.3 Klinik der Zöliakie.....	17
1.2.4 Diagnostik der Zöliakie	19
1.2.5 Therapie der Zöliakie	20
1.3 Knochenentwicklung.....	21
1.4 CED als Ursache für schlechte Knochenqualität bei Kindern	24
1.5 Vitaminmangel bei Kindern mit CED	26
1.6 Vitamine	27
1.6.1 Vitamin B12.....	27
1.6.2 Folat.....	31
1.6.3 Hyperhomocysteinämie (HHcy).....	34
1.6.4 Vitamin D	36
2. Material und Methodik	38
2.1 Probanden.....	38
2.2 Präanalytik.....	39
2.3 Laborchemische Methodik.....	40
2.3.1 Messung von Homocystein (tHcy), Cystathionin (Cys) und Methylmalonsäure (MMA)	40
2.3.2 Messung von S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosylhomocystein (SAH)	43
2.3.3 Messung von Vitamin B12 (Cobalamin)	45
2.3.4 Messung von Holotranscobalamin (holoTC).....	45
2.3.5 Messung von 25-OH-Vitamin D.....	45
2.3.6 Messung der Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP5b).....	46
2.3.7 Messung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (BAP)	46
2.3.8 Messung von Deoxypyridinolin-(DPD)-Crosslinks	46
2.3.9 Messung von Parathormon	47
2.3.10 Messung von CRP.....	48

2.3.11 Messung von Kreatinin, Eiweiß, GOT, GPT, Hämoglobin und Eisen.....	48
2.4 Statistik.....	48
3. Ergebnisse	49
4. Diskussion	62
5. Literaturverzeichnis	73
6. Danksagung	86

Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ASCA	anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Antikörper
ATG16L	autophagy related 16-like
B12	Vitamin B12
BAP	knochenspezifische alkalische Phosphatase
BHMT	Betain-Homocysteine-Methyltransferase
BMI	body mass index
Cbl	Cobalamin
CBS	Cystathionin β -Synthase
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CF	cystische Fibrose
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CV	Variationskoeffizient
Cys	Cystathionin
DEXA	dual-energy x-ray absorptiometry
DHF	Dihydrofolat
D.m. I	Diabetes mellitus I
DNA	deoxyribonucleic acid
DPD	Deoxypyridinolin
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	1,4-Dithiotritol
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
EIM	extraintestinale Manifestation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Endomysium-auto-Antikörper
EW	Einwohner
GC/MS	gas chromatography-mass spectrometry
GFD	glutenfreie Diät
Gly	Glycin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HC	Haptocorrin
Hcy	Homocystein
HHcy	Hyperhomocysteinämie
HLA	Histocompatibility Leukocyte Antigen
HoloTC	Holo transcobalamin
HPLC	high-performance liquid chromatography
IBD5	inflammatory bowel disease 5
IEL	intraepitheliale Lymphozytenzahl
IF	Intrinsic Factor
IFN- γ	Interferon- γ

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	interne Standards
KHK	koronare Herzkrankheit
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MAT	Methioninadenosyltransferase
MBDSTFA	N-methyl-butyltrimethylsilyl-Tri-fluoroacetamid
MCoA	Methylmalonyl-CoA
MCoAM	Methylmalonyl-CoA-Mutase
M. Crohn	Morbus Crohn
Met	Methionin
MMA	Methylmalonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Methioninsynthase
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolat
5,10-MTHFR	5,10 Methyltetrahydrofolatreduktase
MTX	Methotrexat
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOD2/CARD15	nucleotide-binding oligomerisation domain containing 2/caspase recruitment domain 15
1,25(OH) $_2$ D $_3$	1,25-(OH) $_2$ -Dihydroxycholecalciferol
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
OmpC	outer membrane porin C
pANCA	perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies
PBM	peak bone mass
PCFT	proton-coupled folate transporter
PTH	Parathormon
RFC	reduced folate carrier
RNA	ribonucleic acid
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocysteinhydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SCoA	Succinyl-CoA
Ser	Serin
SH2B3	SH2B adaptor protein 3
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
TC	Transcobalamin
TH1-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 1
TH17-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 17
tHcy	Gesamthomocystein
THF	Tetrahydrofolat
TNF- α	tumor necrosis factor α
TRAP5b	Tartratresistente saure Phosphatase
TS	Thymidylatsynthase
tTG	tissue-Transglutaminase
UPLC-MS-MS	ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
UVB	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 280-315 nm

Zusammenfassung

Einleitung: Im Zeitraum der Knochenentwicklung von der Kindheit bis zur Adoleszenz wird die maximale Knochenmasse (peak bone mass) aufgebaut. Faktoren, die in dieser Zeit auf den Knochen einwirken, können das Osteoporoserisiko im Jugend- und Erwachsenenalter beeinflussen. Bei Kindern mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen sich häufig Beeinträchtigungen der Knochenqualität bis hin zur Osteoporoseentwicklung. Mögliche Ursache einer schlechten Knochenqualität kann, neben einer chronischen entzündlichen Aktivität, ein Mangel an B- und D-Vitaminen sein. In dieser Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Knochenqualität und B-Vitaminen und Vitamin D bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 3-18 Jahren mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung untersucht.

Material und Methoden: An der Studie nahmen 94 Probanden teil (M. Crohn: 24, Colitis ulcerosa: 7, Zöliakie: 23, Kontrollen: 40). Aus den gewonnenen Blutproben wurden die Konzentrationen von Vitamin B12, Holotranscobalamin (holoTC), Gesamthomocystein (tHcy), Cystathionin (Cys), Methylmalonsäure (MMA), S-Adenosylhomocystein (SAH), S-Adosylmethionin (SAM), Vitamin D, knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP), Osteocalcin, tartratresistente saure Phosphatase 5b (TRAP5b) und Parathormon sowie CRP, Kreatinin, Eiweiß, GOT, GPT, Hämoglobin und Eisen gemessen. Die Deoxypyridinolinkonzentration wurde im zweiten Morgenurin gemessen.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Obwohl bei keinem der Probanden ein Vitamin B12-Mangel beobachtet wurde, waren in der Patientengruppe (M.Crohn, Zöliakie) höhere Vitamin B12-Konzentrationen mit einem höheren Methylierungsindex (SAM/SAH-Quotient) assoziiert. Das könnte einen Hinweis darauf geben, dass höhere Vitamin B12-Konzentrationen die Lieferung von Methylgruppen unterstützen, auch wenn die Vitamin B12- und tHcy-Konzentrationen im Normbereich lagen. Es bestand eine positive Korrelation zwischen dem Methylierungsindex (SAM/SAH-Quotient) und BAP in der Patientengruppe (M.Crohn, Zöliakie). Das lässt vermuten, dass es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsindex und der Osteoblastenfunktion gibt. Ein möglicher Regulationsmechanismus könnte die Beeinflussung epigenetischer Mechanismen

durch Methylierung und Demethylierung sein. Es bestand eine positive Korrelation zwischen CRP und BAP in der Patientengruppe (M.Crohn, Zöliakie). Das gibt Hinweise darauf, dass die entzündliche Aktivität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein eigenständiger Risikofaktor für schlechte Knochenqualität bei Kindern und Jugendlichen mit M. Crohn sein könnte.

Abstract

Bone turnover markers and B and D vitamins in children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease

Background: Childhood and adolescence are very important for bone development, because in this stage the peak bone mass is built up. During this period, factors that have an impact on bone development may influence the osteoporosis risk in adolescence and adulthood. Children with chronic inflammatory bowel disease often show low bone quality or even osteoporosis. Apart from chronic inflammation, the reasons for low bone quality may be a lack of vitamin D and B vitamins. The objective of this study was to evaluate possible causes between bone quality and B and D vitamin status in children and adolescent persons (age: 3-18 years) with chronic inflammatory bowel disease.

Methods: A total number of 94 subjects (Crohn's disease: 24, Ulcerative colitis: 7, celiac disease: 23, controls: 40) were collected. We measured the concentration of vitamin B12, holotranscobalamin (holoTC), total homocysteine (tHcy), cystathionine (Cys), methyl malonic acid (MMA), S-adenosyl homocysteine (SAH), S-adenosyl methionine (SAM), vitamin D, bone specific alkaline phosphatase (BAP), osteocalcin, tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b), deoxypyridinoline, parathyroid hormone, c-reactive protein (CRP), creatinine, total protein, glutamate oxalate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), hemoglobin, and iron.

Results and Conclusion: A correlation between vitamin B12 and the methylation index (SAM/SAH) could be observed although none of the subjects showed a vitamin B12 deficit. This connection might indicate that high concentrations of vitamin B12 support the delivery of methyl groups even though vitamin B12 and tHcy

concentrations were normal. There was a positive correlation between methylation index and BAP in the group with chronic inflammatory bowel disease, suggesting a correlation between methylation index and osteoblast capacity. A potential mechanism of regulation may be caused by influencing epigenetic mechanisms with the help of methylation and demethylation. A positive interrelation between CRP and BAP was shown. This might be evidence of inflammation being an independent risk factor of low bone quality in children and adolescents with chronic inflammatory bowel disease.

1. Einleitung

Osteoporose ist eine weit verbreitete Erkrankung des höheren Lebensalters. Bei Osteoporose kommt es durch die abnehmende Knochendichte vermehrt zu Frakturen (96) und gesteigerter Gebrechlichkeit. Frakturen führen bei älteren Menschen zu eingeschränkter Mobilität und Selbstständigkeit mit der Folge einer eingeschränkten Lebensqualität. Eine frühzeitige Osteoporoseprävention durch die Beeinflussung modifizierbarer Ursachen ist ein möglicher Ansatz zur Senkung der Osteoporoserate.

Während Kindheit, Pubertät und Adoleszenz baut der Mensch seine maximale Knochenmasse, die so genannte peak bone mass (PBM), auf. Dieser Entwicklungszeitraum ist sehr wichtig für die spätere Knochenkonfiguration. In einer Studie zeigte sich bei prämenopausalen Frauen eine positive Korrelation zwischen Bewegungsausmaß in der Kindheit und der Knochendichte im Erwachsenenalter (107). Daraus kann man schließen, dass Bewegung wichtig für die Entwicklung der PBM ist und Faktoren, die während der Entwicklung auf den Knochen einwirken, Auswirkungen auf das Osteoporoserisiko im Erwachsenenalter haben.

Chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I (D.m. I) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) führen bei Kindern zur negativen Beeinflussung der Knochendichte. Osteoporose gilt als Komplikation bei Erwachsenen (35) und Kindern (135) mit CED. Eine ausreichende Zufuhr an Vitamin D, Vitamin B12 und Folat ist wichtig für eine gute Knochenqualität. Niedriges Vitamin B12 führt zu erhöhtem Knochenumsatz (51). Niedrige Folatspiegel führen zu einer veränderten Knochenmorphologie (55). Bei Kindern und Jugendlichen mit CED kann es zu einem Mangel an Vitamin D, Vitamin B12 oder Folaten kommen (47;99). Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Vitaminmangel und der schlechten Knochenqualität bei Kindern und Jugendlichen mit CED.

1.1 Morbus Crohn (M. Crohn)

1.1.1 Inzidenz des M. Crohn

Ethnische und geographische Herkunft haben einen Einfluss auf die Inzidenz des M. Crohn. Die höchste Inzidenz für M. Crohn zeigt sich in Kanada (76) und Australien (17-20/100.000 Einwohner (EW)) (142). Auch in Nordamerika und Europa ist die Inzidenz mit etwa 8/100.000 EW hoch (75;78). In der jüdischen Bevölkerungsgruppe finden sich 2-4 mal häufiger M. Crohn-Patienten als in der nicht-jüdischen Bevölkerung. Die Inzidenz für M. Crohn ist in afroamerikanischen, lateinamerikanischen (3,5/100.000 EW) und asiatischen (0,8/100.000 EW) Bevölkerungsgruppen niedriger als in Europa und Nordamerika (130;146). Abbildung 1 zeigt die Inzidenz für M. Crohn in ausgewählten Ländern.

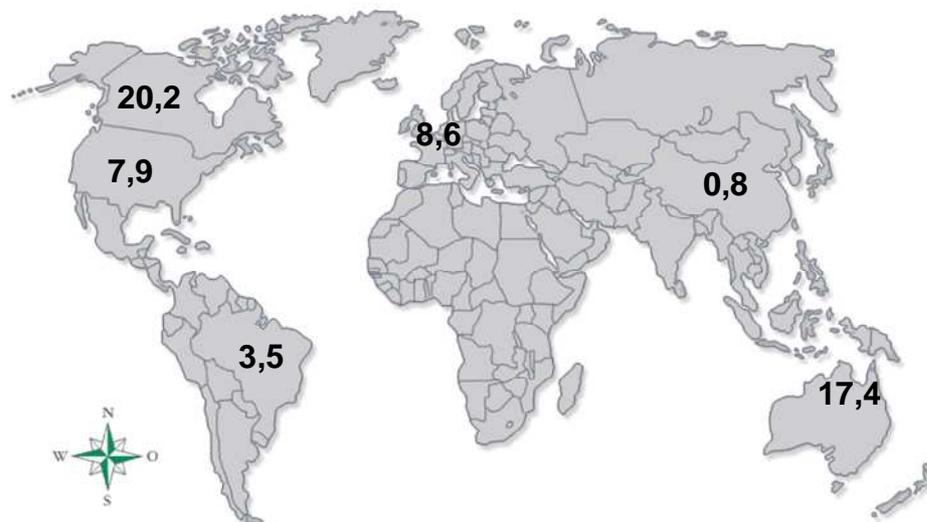


Abb.1 M. Crohn-Inzidenz in ausgewählten Ländern; Zahlen zeigen Inzidenz pro 100.000 Einwohner

Es gibt eine altersabhängige Inzidenzverteilung bei M. Crohn. In der Gruppe der Kinder und Jugendlichen erkranken 38 % vor dem 12. Lebensjahr an M. Crohn, wohingegen eine Manifestation vor dem 5. Lebensjahr selten ist (100). Die meisten Neuerkrankungen treten in der Pubertät auf (100). Das Auftreten der akuten ersten Episode des M. Crohn beeinträchtigt bei vielen Kindern und Jugendlichen die Entwicklung vor und während der Pubertät.

Bestimmte genetische Veränderungen scheinen das Risiko für das Auftreten einer CED zu erhöhen. In einer japanischen Studie mit 11.305 M. Crohn-Patienten hatten 2,6% der Probanden eine familiäre Prädisposition (70). Modifizierbare Risikofaktoren für M. Crohn sind das Rauchen (16), ein hoher sozioökonomischer Status und das Leben in einer städtischen Umgebung (115).

Manninen *et al.* beobachteten in Finnland im Zeitraum zwischen 1986 und 1999 bei M. Crohn einen Inzidenzanstieg von 5,0 auf 9,4/100.000 EW (78). Dieser Inzidenzanstieg könnte mit der Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten zusammenhängen, hat aber möglicherweise seinen Ursprung auch in der Veränderung der Ernährungsgewohnheiten oder der gestiegenen Zahl der Stadtbevölkerung.

1.1.2 Pathogenese des M. Crohn

Im humanen Intestinaltrakt besteht eine Homöostase zwischen intestinaler Flora, den intestinalen Epithelzellen und dem intestinalen Immunsystem. Im Intestinaltrakt von Patienten mit M. Crohn ist die Balance zwischen diesen drei Faktoren gestört. Ein Defekt der Epithelbarriere und Störungen der Immunantwort führen zu einer dauerhaften Aktivierung des Immunsystems durch die intestinale Flora. In Tabelle 1 sind die Haupteinflussfaktoren in der Pathogenese des M. Crohn dargestellt. In der Pathogenese des M. Crohn spielt die genetische Prädisposition eine Rolle. Verwandte ersten Grades von M. Crohn-Patienten haben ein zehnfach erhöhtes Risiko auch an M. Crohn zu erkranken (94). Eine Zwillingsstudie mit 68 monozygoten und 121 dizygoten Zwillingspaaren, bei denen mindestens ein Zwilling CED-Patient war, zeigte eine höhere Übereinstimmung bezüglich dem Auftreten von M. Crohn bei eineiigen (35 %) als bei zweieiigen (3 %) Zwillingen (119). Diese Datenlage lässt vermuten, dass Gene (nucleotide-binding oligomerisation domain containing 2/caspase recruitment domain 15 (NOD2/CARD15), inflammatory bowel disease 5 (IBD5), autophagy related 16-like (ATG16L)) eine wichtige Rolle in der Pathogenese

des M. Crohn spielen, aber auch Umweltfaktoren als Trigger der Erkrankung von Bedeutung sind. Bisher können etwa 30 % der angenommenen Assoziationen zwischen Genen und der Entstehung von M. Crohn mit bekannten Mutationen erklärt werden.

Tab.1 Einflussfaktoren in der Pathogenese des M. Crohn	
Geographische/ethnische Faktoren	- jüdisch - kaukasisch
Umweltfaktoren	- Rauchen - Wohnort: Stadt - hoher sozioökonomischer Status
Gene	- NOD2/CARD15-Gen - IBD5 - ATG16L
Gestörte Bakterienabwehr	- NOD2 - Defensine
Immunologische Faktoren	- TNF- α - TH1-Zellen, TH17-Zellen - IFN- γ - Interleukine
Antikörper	- Anti-I2 - Anti-Flagellin-IgG - Anti-OmpC - ASCA - pANCA

NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain containing 2; CARD15: caspase recruitment domain 15; IBD5: inflammatory bowel disease 5; ATG16L: autophagy-related 16-like; TNF- α : tumor necrosis factor α ; TH1-Zellen: T-Helfer-Zellen Typ 1; TH17-Zellen: T-Helfer-Zellen Typ 17; IFN- γ : Interferon- γ ; IgG: Immunglobulin G; OmpC: outer membrane porin C (von *E.coli*); ASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae*-Antikörper; pANCA: perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies

Das NOD2/CARD15-Gen (IBD1) auf Chromosom 16q12 ist als erstes Risikogen für M. Crohn identifiziert worden (93). Der Wildtyp des vornehmlich auf Monozyten exprimierten NOD2 aktiviert den nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B). Die Aktivierung des NF- κ B ist wichtig für die intestinale Abwehr gegen Bakterien. Die mutierte Form des NOD2 ist nicht zur Aktivierung des NF- κ B fähig (93). Die NOD2-Mutante unterdrückt außerdem die Produktion von Interleukin (IL)-10 (89), einem Cytokin, das die Immunantwort reguliert. Abbildung 2 zeigt die zentrale Rolle von NOD2 in der Pathogenese des M. Crohn. Die Assoziation der NOD2-Mutante mit M. Crohn lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen einer Störung der angeborenen Immunantwort gegen intestinale Bakterien und der Entstehung von M. Crohn gibt.

Ein weiterer Bestandteil der intestinalen Immunantwort zur Abwehr von Bakterien sind die Defensine (Abb. 2). Es gibt eine NOD2-abhängige und eine NOD2-unabhängige Defensinproduktion. Durch verschiedene Studien (140;141) wurde festgestellt, dass sowohl die NOD2 abhängige als auch die NOD2-unabhängige Defensin-Expression in der Ileumschleimhaut von M. Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen verringert ist. Der beobachtete Defensinmangel führt zu einer Barrierestörung der intestinalen Mukosa. Dadurch wird die Bakterieninvasion in die Darmmukosa bei M. Crohn erleichtert und die Bakterien lösen die bei M. Crohn typische Inflammation der Darmschleimhaut aus.

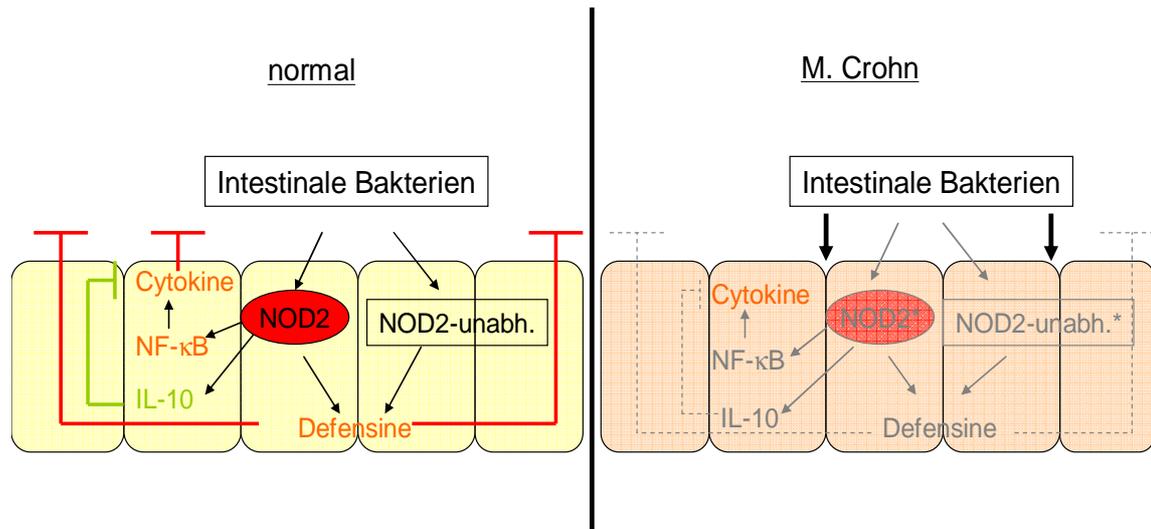


Abb.2 Rolle von NOD2, NF-κB, IL-10 und Defensinen in der Pathogenese des M. Crohn am Modell von Darmepithelzellen. Durch NOD2 kommt es beim Gesunden über eine Aktivierung von NF-κB zur Cytokinausschüttung, was das Eindringen intestinaler Bakterien in die Darmmukosa verhindert. Die Cytokinausschüttung wird gleichzeitig über IL-10 reguliert. Defensine, die sowohl NOD2-abhängig als auch NOD2-unabhängig aktiviert werden, sind ebenfalls Bestandteil der Abwehr intestinaler Bakterien. Bei M. Crohn ist die intestinale Bakterienabwehr durch Mutationen des NOD2 bzw. Störung der NOD2-unabhängigen Defensinproduktion gestört und es kommt zum Eindringen luminaler Darmbakterien in die Darmmukosa. NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain containing 2; NOD2*: NOD2-Mutante; NOD2-unabh.: NOD2-unabhängige Defensinaktivierung; NOD2-unabh.*: gestörte NOD2-unabhängige Defensinaktivierung; NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; IL-10: Interleukin-10

Die Bakterien der intestinalen Flora können als Trigger der Immunreaktion in der Darmmukosa von M. Crohn-Patienten wirken. Duchmann *et al.* beobachteten bei M. Crohn-Patienten eine durch die körpereigene intestinale Flora getriggerte Bildung von T-Zell-Klonen (33). Das weist auf eine Immunreaktion gegen Bakterien der Darmflora hin. Bei Untersuchungen zu postoperativen Rezidivraten bei 80 M. Crohn-Patienten nach Resektion betroffener Darmabschnitte trat bei über 70 % der Patienten innerhalb von sechs Monaten ein Rezidiv auf, wenn die Darmschleimhaut postoperativ Fäkalkontakt hatte. In Darmbereichen, die durch Anus praeter-Anlage von der Darmpassage ausgeschlossen waren, zeigte sich innerhalb von sechs Monaten kein Entzündungsrezidiv (110). Möglicherweise tragen die durch den Fäkalkontakt in den Darm eingebrachten Bakterien zum Entzündungsrezidiv nach Ileumresektion bei. Eine Senkung der Bakterienlast im Darm wirkt sich möglicherweise positiv auf den Krankheitsverlauf aus.

Das Eindringen luminaler Bakterien infolge epithelialer Barrierestörungen und die Enthemmung der Immunreaktion resultieren in einer starken Aktivierung des Immunsystems. Durch Untersuchungen an intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten konnte gezeigt werden, dass der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , ein Kofaktor für die Cytokinausschüttung der T-Helferzellen Typ 1 (TH1-Zellen), in der Mukosa und Submukosa von M. Crohn-Patienten vermehrt vorkommt (85). TNF- α führt vermutlich zur Störung der Endothel- und Epithelintegrität und vermehrter Rekrutierung von Entzündungszellen in die Darmwand und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Inflammation bei M. Crohn. Die zentrale Rolle des TNF- α in der Pathogenese des M. Crohn hat zu der Annahme geführt, dass Antikörper (AK) gegen TNF- α zur Therapie des M. Crohn geeignet sind. Monoklonale AK gegen TNF- α werden bereits erfolgreich in der M. Crohn-Therapie eingesetzt.

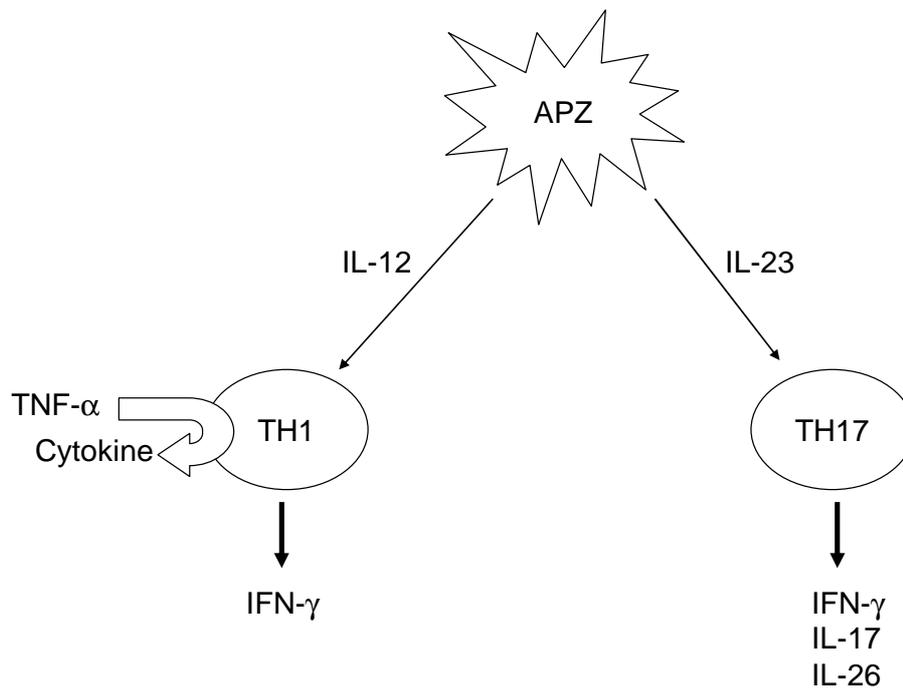


Abb.3 TH1 und TH17, TNF- α , Cytokinausschüttung in der Darmmukosa
 Antigen-präsentierende Zellen der Darmmukosa schütten bei Bakterienkontakt IL-12 und IL-23 aus. Die Aktivierung von TH1-Zellen durch IL-12 und TNF- α führt zur Ausschüttung von Cytokinen und IFN- γ . Die Aktivierung von TH17-Zellen durch IL-23 führt zur Ausschüttung von IFN- γ , IL-17 und IL-26. TH1: T-Helferzellen Typ 1; TH17: T-Helferzellen Typ 17; APZ: Antigen-präsentierende Zellen, IFN- γ : Interferon- γ ; TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α ; IL: Interleukin

Seit längerer Zeit gilt die Hypothese, dass die Inflammation bei M. Crohn ein durch TH1-Zellen vermittelter Vorgang ist. Colpaert *et al.* haben gezeigt, dass IL-12 als Induktor der Interferon (IFN)- γ -Produktion von TH1-Zellen in M. Crohn-Mukosa vermehrt vorkommt (22). Das stützt die Vermutung, dass bei Bakterienkontakt ausgeschüttetes IL-12 die TH1-Zellen zur IFN- γ -Produktion stimuliert und dadurch zur inflammatorischen Reaktion beiträgt. Neuere Studien (24;40) lassen vermuten, dass neben TH1-Zellen auch TH17-Zellen an der Inflammation beteiligt sind (Abb. 3). In der involvierten Darmmukosa von M. Crohn-Patienten ist die IL-23-vermittelte Ausschüttung der TH17-Zell-Cytokine IL-17, IL-22, IL-26 erhöht (24;40). Inwiefern die Reaktionen der TH1- und der TH17-Zellen zusammenwirken oder sich gegenseitig beeinflussen, ist noch nicht vollständig geklärt. In einer Studie (68) mit 30 pädiatrischen M. Crohn-Patienten zeigten Kinder in der ersten Episode der Erkrankung eine typische TH1-Zell-Reaktion mit erhöhtem IFN- γ und IL-12. Bei Kindern mit fortgeschrittenem M. Crohn kam es nicht zu einem starken IL-12-Anstieg und der TH1-Polarisation. Das lässt vermuten, dass sich die Immunreaktion im Verlauf des M. Crohn verändert. Es ist möglich, dass TH1-Zellen die akute Reaktion zu Beginn der Erkrankung vermitteln und im Verlauf durch die TH17-vermittelte Immunreaktion abgelöst werden.

Im Rahmen der Immunreaktion gegenüber bakteriellen Antigenen werden AK (anti-I2, anti-Flagellin-IgG, anti-OmpC (outer membrane porin C des *E. coli*), ASCA (anti-*saccharomyces cerevisiae* antibodies), pANCA (perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies)) gebildet. In einer Studie mit 142 M. Crohn-Patienten zeigten 52% der Patienten im Serum AK gegen das T-Zell-Superantigen I2 des *Pseudomonas fluorescens* (1). Lodes *et al.* fanden bei M. Crohn-Patienten erhöhte Serum-IgG-Spiegel gegen das bakterielle Antigen Flagellin (74). Arnott *et al.* beobachteten im Serum von M. Crohn-Patienten AK gegen OmpC, *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) und perinukleäre Neutrophilenbestandteile (pANCA) (1). Der Nachweis von AK gegen Bakterienbestandteile unterstützt die Hypothese, dass intestinale Bakterien die Entzündungsreaktion bei M. Crohn triggern und lässt vermuten, welche Bakterien häufig an der Pathogenese des M. Crohn beteiligt sind. Das Ausmaß der Immunreaktion gegen bakterielle Antigene ist assoziiert mit der Schwere des Krankheitsverlaufs. Je mehr verschiedene AK im Serum nachgewiesen werden und je stärker die Immunantwort ist, desto eher neigt der M. Crohn-Patient zu Krankheitsprogression und Komplikationen wie Fisteln und Stenosen (31). Mit Hilfe

der AK ist eine Einschätzung bzgl. des Risikos für Komplikationen und schnelle Krankheitsprogression möglich, bevor diese eintreten.

1.1.3 Klinik des M. Crohn

M. Crohn ist eine transmurale Erkrankung; alle Wandschichten des Darms sind betroffen. Die chronische Entzündung kann in allen Abschnitten des Darmtraktes auftreten. Das Befallsmuster ist segmental. Lokalisation und Ausprägung können sich im Verlauf verändern und variieren von Patient zu Patient. In einer Untersuchung mit 404 M. Crohn-Patienten im Alter zwischen 0-17 Jahren zeigten sich als bevorzugt betroffene Darmabschnitte das terminale Ileum und das proximale Kolon (129).

Le Berre *et al.* haben in einer retrospektiven Doppelblindstudie kolorektale Biopsate von CED-Patienten auf histologische Merkmale untersucht, die CED von anderen Formen der Colitis abgrenzen und somit zur Diagnostik geeignet sind (72). Histologisch zeigte sich bei M. Crohn eine Architekturstörung der Krypten und Unregelmäßigkeiten an der Mukosaoberfläche. Es wurde die Infiltration von Neutrophilen und Lymphozyten in die Mukosa und in der Folge die Ausbildung von Kryptenabszessen und Granulomen beobachtet (72). Diese histologischen Veränderungen sind Ausdruck der chronischen Inflammation. In Tabelle 2 sind die klinischen Aspekte des M. Crohn dargestellt.

Tab. 2 Klinik des M. Crohn	
endoskopisch	<ul style="list-style-type: none"> - Aphten und Ulcerationen - Pflastersteinrelief - Ödematöse Verdickung der Darmwand - Fibrotischer Umbau der Darmwand - Strikturen - Fisteln
histologisch	<ul style="list-style-type: none"> - Störung der Kryptenarchitektur, unregelmäßige Mukosaoberfläche - Lymphozyten- und Neutrophileninfiltration in die Mukosa - Kryptenabszess - Granulome
Symptome	<ul style="list-style-type: none"> - chronische Diarrhö (>6 Wochen) - kolikartige Bauchschmerzen - Fieber - Perianal: Fissur, Fistel, Abszess
Extraintestinale Manifestationen	<ul style="list-style-type: none"> - sekundäre Anämie - Wachstumsretardierung - Nephrolithiasis - Osteopenie - Arthritis - Hautmanifestationen - Tiefe Venenthrombose, Lungenembolie
Malignome	<ul style="list-style-type: none"> - Kolon, Dünndarm - Leber - Lymphome

Eine Arbeitsgruppe der „North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition“ und der „Crohn’s and Colitis Foundation of America“ hat endoskopische Kriterien zusammengestellt, die für das Vorliegen eines M. Crohn sprechen (14). Es entstehen Aphten und Ulcerationen, die sich auch ausbreiten und fusionieren können. Es kommt häufig zur Ausbildung des M. Crohn-typischen Pflastersteinreliefs mit abwechselnd unversehrter und geschädigter Mukosa. Die Darmwand zeigt sich bei M. Crohn ödematös verdickt, Submukosa und Muscularis sind fibrotisch umgebaut. Im Rahmen der chronischen entzündlichen Veränderungen in der Darmwand entwickeln sich bei M. Crohn-Patienten häufig Strikturen oder Fisteln mit Verbindung zur Haut, in den Bauchraum oder zu anderen intraabdominellen Organen (Blase). Thia *et al.* (124) stellten bei Beobachtungen an 306 M. Crohn-Patienten fest, dass das kumulative Risiko für mindestens eine der beiden Komplikationen (Strikturen, Fisteln) mit der Krankheitsdauer zunimmt und nach 20 Jahren bei 50,8 % liegt.

Am häufigsten manifestiert sich M. Crohn durch das Auftreten chronischer Durchfälle (>6 Wochen; selten mit Blutauflagerung), kolikartiger Bauchschmerzen und Fieber. In einer Untersuchung von Palder *et al.* (98) zeigten sich bei 47% der pädiatrischen Patienten (n=325) perianale Manifestationen wie Fissuren, Fisteln oder Abszesse als erstes Symptom. Es fanden sich auch M. Crohn-assoziierte Symptome außerhalb des Gastrointestinaltraktes. Stawarski *et al.* haben durch Beobachtungen einer Gruppe von Kindern mit M. Crohn (n=26) gezeigt, dass sekundäre Anämie (70 %), Wachstumsverzögerung (80 %) und Osteopenie (41 %) verbreitete extraintestinale Manifestationen (EIM) sind (121). Arthritis, Hautmanifestationen und Nephrolithiasis sind als weitere EIM beobachtet worden (121). M. Crohn-Patienten haben ein dreifach erhöhtes Risiko, eine tiefe Venenthrombose oder Lungenembolie zu entwickeln (118). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass im Rahmen der chronischen Inflammation prothrombotische Faktoren aktiviert werden.

M. Crohn-Patienten haben ein erhöhtes Risiko für verschiedene Malignome. Bernstein *et al.* haben bei M. Crohn-Patienten im Vergleich zur Gruppe ohne M. Crohn eine höhere Inzidenz für Kolon-, Dünndarm- und Lebertumoren und für Lymphome beobachtet (7). Das vermehrte Auftreten von Tumoren bei M. Crohn-Patienten lässt Gemeinsamkeiten in der Pathogenese von M. Crohn und Tumoren vermuten. Möglicherweise spielt die autoimmune Komponente des M. Crohn eine

Rolle in der Tumorgenese. Innerhalb des Kolorektum führen möglicherweise die chronischen Entzündungsvorgänge zu Entartungen und folgender Tumorbildung.

1.1.4 Diagnostik des M. Crohn

Die Diagnostik des M. Crohn setzt sich aus klinischen, laborchemischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Befunden zusammen (Tab. 3). In Anamnese und körperlicher Untersuchung zeigen sich M. Crohn-typische Symptome wie Durchfall und Bauchschmerzen. Laborchemisch werden ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) (>6mg/l), eine Leukozytose (>10.000/ μ l) und Anämiezeichen beobachtet. Serologisch sind eventuell M. Crohn-typische AK (anti-OmpC, ASCA, pANCA) nachweisbar. Die Calprotectinbestimmung im Stuhl ist eine nicht invasive Methode zur Detektion entzündlicher Prozesse im Gastrointestinaltrakt. Langhorst *et al.* berichten, dass die Calprotectinmenge im Stuhl bei M. Crohn-Patienten mit aktiver Entzündung höher ist, als bei Patienten ohne aktive Entzündung (71). Sonographie und Magnetresonanztomographie (MRT) sind gut geeignet um betroffene Darmabschnitte zu erkennen und transmurale Veränderungen wie Lymphadenopathie oder Fisteln darzustellen (80).

Tab. 3 Diagnostik des M. Crohn	
Klinik	<ul style="list-style-type: none"> - Typische intestinale Symptome (Diarrhö, Bauchschmerzen) - extraintestinale Symptome
Labor	<ul style="list-style-type: none"> - CRP (>6mg/l) - Leukozytose (>10.000/μl) - Anämiezeichen - Antikörper (ASCA, pANCA, anti-OmpC) - Calprotectin im Stuhl
Bildgebung	<ul style="list-style-type: none"> - Sonographie - MRT
Endoskopie/Biopsie	<ul style="list-style-type: none"> - Ileokoloskopie mit Biopsieentnahme - Doppelballonendoskopie - Kapselendoskopie - Ösophagogastroduodenoskopie

CRP: C-reaktives Protein; ASCA: anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies; pANCA: perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies; anti-OmpC: anti-outer membrane porin C; MRT: Magnetresonanztomographie

In der Ileokoloskopie können makroskopische Veränderungen der Darmmukosa gut beurteilt werden. Doppelballonendoskopie und Kapselendoskopie sind gut geeignet um M. Crohn-Läsionen (Ulcera, Erosionen, Aphten, Stenosen) im Ileum und Jejunum zu detektieren (18;42) und sind damit eine Ergänzung zur Koloskopie. Die Biopsieentnahme aus Ileum und Kolon mit anschließender histopathologischer Untersuchung der Biopsate dient dem Nachweis spezifischer histopathologischer M. Crohn-Veränderungen und führt zur Sicherung der Diagnose. Zur Beurteilung der Befundausdehnung wird der gesamte Gastrointestinaltrakt endoskopisch beurteilt. Pytrus *et al.* haben durch eine Studie mit 97 an CED erkrankten Kindern festgestellt, dass bei Kindern mit M. Crohn häufig auch im oberen Gastrointestinaltrakt M. Crohn-Läsionen bestehen (Magen: 88 %; Duodenum: 23 %) (101). Deshalb ist die Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) eine essentielle Komponente der initialen M. Crohn-Diagnostik.

1.1.5 Therapie des M. Crohn

Patienten mit leichter bis moderater Entzündungsaktivität werden zunächst mit einem Corticosteroid behandelt. In einer randomisierten Doppelblindstudie mit 201 M. Crohn-Patienten wurden die Wirkungen von Budesonid und Prednisolon verglichen (4). Prednisolon und Budesonid erreichten vergleichbare Werte für die Remissionsinduktion von 51-69 %. Budesonid führte durch seine lokal begrenzte Wirkung seltener zu unerwünschten systemischen Nebenwirkungen und war dadurch besser verträglich als Prednisolon.

Der Einsatz von Antibiotika wie Rifaximin, Metronidazol und Ciprofloxacin führt zu einer kurzzeitigen Verbesserung der klinischen Situation. In einer Gruppe von M. Crohn-Patienten (n=18) mit Rifaximin-Monotherapie erreichten 67 % die Remission (114). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass fäkale Bakterien eine wichtige Rolle in der Pathogenese des M. Crohn spielen. Die enterale Ernährungstherapie kann bei manchen Patienten unterstützend angewandt werden und zum Ausgleich von nutritiven Defiziten beitragen.

Mantzaris *et al.* haben an einer Gruppe von 77 M. Crohn-Patienten gezeigt, dass Azathioprin in der längerfristigen Therapie (1 Jahr) dem Budesonid in Bezug auf endoskopische und histologische Remission überlegen ist (79). Azathioprin ist zu Remissionsinduktion und -erhalt bei steroidabhängigen oder steroidrefraktären Patienten geeignet. Patienten, die nicht auf Azathioprin ansprechen, können mit

Methotrexat (MTX) behandelt werden, was in einer Studie mit 131 CED-Patienten bei 62 % der M. Crohn-Patienten zur Remission führte (133).

Führen Corticosteroide, Azathioprin oder MTX bei M. Crohn-Patienten nicht zur dauerhaften Remission, werden monoklonale Antikörper wie Infliximab eingesetzt. Infliximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen TNF- α . Van den Brande *et al.* haben durch Untersuchungen an Lamina propria-T-Zellen von M. Crohn-Patienten gezeigt, dass Infliximab zu einer effektiven Neutralisation von TNF- α und einer verstärkten Apoptose von aktivierten T-Lymphozyten führt (127). Infliximab hemmt die bei M. Crohn überschießende T-Zell-Aktivität und dämmt dadurch die Inflammation ein.

Bei Versagen der konservativen Therapie werden operative Maßnahmen eingesetzt. In einer prospektiven Studie der IBSEN (Inflammatory Bowel South-Eastern Norway)-Gruppe wurden 197 M. Crohn-Patienten über 10 Jahre beobachtet; das kumulative Risiko für eine Operation war mit 38 % niedriger als erwartet (117). Betroffen waren besonders Patienten mit Ileumbefall und Diagnosestellung in jungem Alter. Hauptursachen für eine Operation waren Fisteln, Abszesse oder Strikturen. Die Operationsrate kann bei M. Crohn durch frühzeitige Diagnosestellung, frühzeitigen Therapiebeginn und gute konservative Therapiemöglichkeiten relativ niedrig gehalten werden. Bei M. Crohn ist in keinem Fall eine kurative Therapie, sondern immer nur eine symptomatische Therapie möglich. Im besten Fall wird eine Remission erreicht mit guter Lebensqualität für den Patienten.

1.2 Zöliakie

1.2.1 Prävalenz der Zöliakie

Es besteht weltweit eine hohe Prävalenz für Zöliakie (Abb. 4). Die Zöliakie-Prävalenz beträgt 0,75% in den USA (37) und etwa 1 % in Australien (21) und Europa (87). Innerhalb Europas unterscheidet sich die Prävalenz zwischen Finnland (2,4 %), Italien (0,7 %) und Deutschland (0,3 %) leicht. In den letzten Jahren ist ein Prävalenzanstieg zu verzeichnen, der unter anderem von Rajani *et al.* im Beobachtungszeitraum von 2003 bis 2007 (9 versus 149) festgestellt wurde (103). Mögliche Erklärungsansätze für die gestiegene Anzahl an Zöliakie-Patienten sind veränderte Ernährungsgewohnheiten und eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten. Durch die Einführung serologischer Marker (tissue-Transglutaminase (tTG)-AK, Endomysium-auto-AK (EMA)) ist es möglich, auch subklinische bzw. asymptomatische Zöliakie-Patienten zu erkennen.

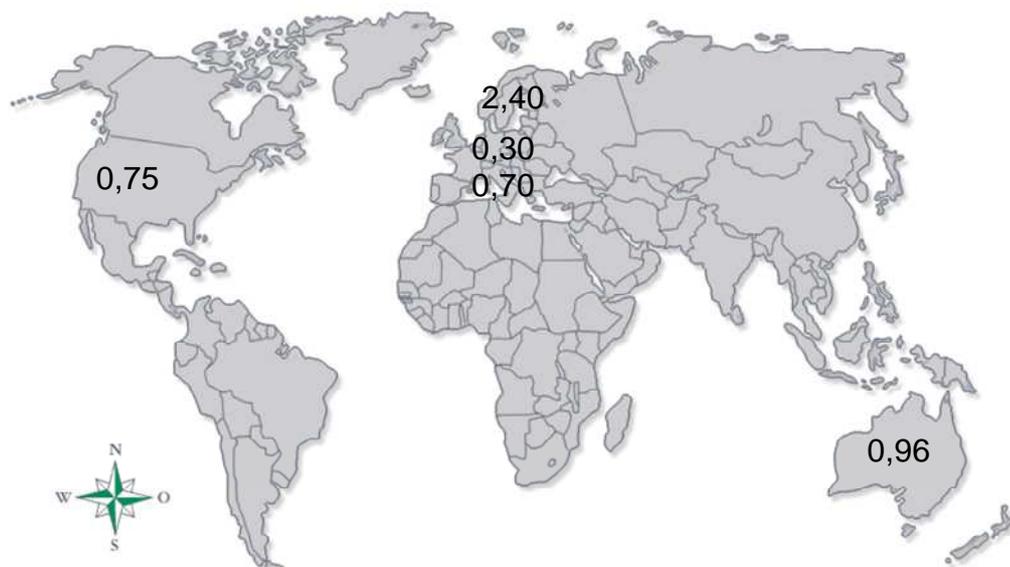


Abb.4 Zöliakieprävalenz in ausgewählten Ländern, Zahlen zeigen Prävalenz pro 100 Einwohner

Zöliakie wird häufig im Kindesalter diagnostiziert. Das junge Diagnosealter bei Zöliakie ist zu erklären durch die Manifestation der Zöliakie nach Beginn der Getreidezufütterung mit der Folge der Glutenexposition. Norris *et al.* postulierten, dass der Beginn der Glutenexposition durch die Nahrung vor dem dritten oder nach dem siebten Lebensmonat im Vergleich zur ersten Glutenexposition zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat bei Kindern zu einem erhöhten Risiko für Zöliakie führt (90). Das Verhältnis der Erkrankungsrate von Zöliakie zwischen Frauen und Männern beträgt 2,3:1 (♀:♂) (6). Die familiäre Prädisposition scheint bei Zöliakie eine große Rolle zu spielen. Das Risiko für Zöliakie liegt bei Verwandten ersten Grades von Zöliakie-Patienten mit etwa 20 % weit über der durchschnittlichen Prävalenz der Allgemeinbevölkerung (125).

Es gibt verschiedene Erkrankungen, die mit einer erhöhten Prävalenz für Zöliakie einhergehen. Baptista *et al.* haben gezeigt, dass die Prävalenz von Zöliakie bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ I (D.m. I) mit 4,8 % höher als in der Allgemeinbevölkerung (0,3-2,4 %, Abb. 7) ist (3). Weitere Erkrankungen, die wie D.m. I und Zöliakie zu den Autoimmunerkrankungen gehören (Hashimoto-Thyreoiditis, Psoriasis) treten häufig parallel zu Zöliakie auf. Cystische Fibrose (CF) (134) und Down-Syndrom (144) sind Krankheiten, die mit einer erhöhten Prävalenz für Zöliakie einhergehen. Das gemeinsame Auftreten von Zöliakie mit anderen Autoimmunerkrankungen, mit CF oder mit Down-Syndrom spricht für Gemeinsamkeiten in der Pathogenese dieser Erkrankungen, wie z.B. die gemeinsame autoimmune Komponente bei Zöliakie und D.m. I oder gemeinsame prädisponierende Gene. Ein Zöliakie-AK-Screening ist bei diesen Risikogruppen sinnvoll um asymptotische Patienten frühzeitig zu erkennen und einer Therapie zuführen zu können.

1.2.2 Pathogenese der Zöliakie

Zöliakie entsteht in genetisch prädisponierten Individuen durch die Immunreaktion gegen die Gliadinfraktion des Nahrungsbestandteiles Gluten. Die wichtige Rolle der genetischen Prädisposition zeigt sich in Studien zum Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)- Genlocus. Die Allele HLA-DQ2 und HLA-DQ8 sind stark mit Zöliakie assoziiert und wurden in einer Studie mit 186 Probanden (84 Zöliakie, 102 Kontrollen) bei 97 % der Zöliakie-Patienten nachgewiesen (86). Tab. 4 zeigt Faktoren, die die Pathogenese der Zöliakie beeinflussen.

Zwei wesentliche Faktoren der Zöliakie-Pathogenese sind die Erhöhung der intestinalen Permeabilität für Gluten und die Dysregulation der T-Zell-Antwort mit überschießender autoimmuner Reaktion. HLA-DQ2/-DQ8 übermitteln die gluteninduzierte Aktivierung von T-Zellen durch die Präsentation von Glutenbestandteilen. Bethune *et al.* (8) haben gezeigt, dass die Inkubation einer Epithelzellschicht mit glutensensitiven T-Zellen von Zöliakie-Patienten eine Erhöhung des transepithelialen Glutentransports zur Folge hat und haben beobachtet, dass IFN- γ als Vermittler der erhöhten Permeabilität für Gluten fungiert. Bei Zöliakie besteht möglicherweise ein Circulus vitiosus zwischen gluteninduzierter IFN- γ -Produktion durch cytotoxischer CD8⁺ T-Zellen und einem darauf folgenden, durch IFN- γ -induzierten erhöhten transepithelialen Glutentransport.

Tab.4 Pathogenese der Zöliakie	
Alter	Erkrankungsgipfel im Kindesalter (1. Glutenexposition)
Geschlecht	Höheres Risiko für Frauen
Koprävalenz anderer Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - Autoimmunerkrankungen (D.m. I, Hashimoto-Thyreoiditis, Psoriasis) - Cystische Fibrose - Down-Syndrom
Gene	<ul style="list-style-type: none"> - HLA-DQ - SH2B3 - IL-2 - CTLA-4
Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> - anti-Gliadin-AK - anti-tTG-AK - EMA

D.m. I: Diabetes mellitus Typ I; HLA-DQ: histocompatibility leukocyte antigen-DQ; SH2B3: SH2B adaptor protein 3; IL-2: Interleukin-2; CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4; anti-tTG-AK: anti-tissue Transglutaminase-Antikörper; EMA: Endomysium-auto-Antikörper

In der Pathogenese der Zöliakie spielen verschiedene Proteine eine Rolle, die in die T-Zell-Regulation eingreifen. Mutationen im cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA)-4 (17), SH2B adaptor protein 3 (SH2B3) und IL-2 (109) sind mit Zöliakie assoziiert. Die Mutationen beeinträchtigen diese Proteine in ihrer Funktion und es kommt zur Dysregulation der T-Zell-Antwort mit folgender überschießender Immunreaktion gegen Gluten. Das lässt vermuten, dass der Toleranzverlust gegenüber dem Nahrungsbestandteil Gluten bei Zöliakie zum Teil durch genetische Varianten von Proteinen entsteht, die an der Regulation der T-Zell-Antwort und der Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz beteiligt sind.

Die Darmmukosa von Zöliakie-Patienten reagiert auf Glutenkontakt mit der Bildung von AK. Falchuk *et al.* haben gezeigt, dass ein Teil des beobachteten glutenvermittelten Anstiegs von IgA und IgM durch die Synthese von anti-Gliadin-AK zustande kommt (36). Dieterich *et al.* haben bei 98,1 % der von ihnen untersuchten 106 Zöliakie-Patienten mit Glutenexposition IgA-AK gegen die tissue Transglutaminase (tTG-AK) nachgewiesen (30). In einer Studie von Dickey *et al.* (n=89) entwickelten 78 % der Zöliakie-Patienten Endomysium-auto-Antikörper (EMA) (28). Die AK können in der Zöliakie-Diagnostik zum Screening und zur Therapiekontrolle eingesetzt werden.

1.2.3 Klinik der Zöliakie

Die entzündlichen Veränderungen im Rahmen der Zöliakie führen zu histologischen Schleimhautveränderungen im Dünndarm. In einer Untersuchung mit 686 Zöliakie-Patienten (106) zeigten 96,2 % eine Atrophie der Dünndarmzotten mit einem Spektrum von milder bis zu totaler Zottenatrophie. Innerhalb einer Biopsie kann die Ausprägung der Zottenatrophie variieren, es kann auch Bereiche ohne Zottenatrophie geben. Es kommt zu einer Erhöhung der intraepithelialen Lymphozytenzahl (IEL), bei unbehandelten Zöliakie-Patienten im Vergleich zu behandelten Zöliakie-Patienten und gesunden Kontrollen, auch in makroskopisch unauffälligen Schleimhautbereichen (9). Die IEL sind auf >40 IEL/100 Enterozyten erhöht. Die Kryptenhyperplasie ist eine weitere Zöliakie-typische Veränderung. Maurino *et al.* beschrieben nach endoskopischer Untersuchung von 100 Zöliakie-Patienten spezifische Schleimhautveränderungen bei Zöliakie (81). Die Kerckring'schen Falten zeigten eine veränderte Architektur, waren abgeflacht oder

komplett verschwunden, die Mukosa zeigte ein Mosaikmuster (81). Tabelle 5 fasst die klinischen Aspekte der Zöliakie zusammen.

Tab.5 Klinik der Zöliakie	
Makroskopisch	<ul style="list-style-type: none"> - Mosaikmuster der Mukosa - Abflachung der Kerckring'sche-Falten
histologisch	<ul style="list-style-type: none"> - Zottenatrophie - Kryptenhyperplasie - erhöhte intraepitheliale Lymphozytenzahl
Symptom-Typ	<ul style="list-style-type: none"> - klassisch: chronische Diarrhö Bauchschmerzen Wachstumsretardierung - subklinisch: häufig nur Anämie - silent: ø Symptome, pos. Serologie und Biopsie
Komplikation	<ul style="list-style-type: none"> - refraktäre Zöliakie, Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
Koprävalenz von Autoimmunerkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - Hashimoto-Thyreoiditis - Diabetes mellitus Typ I - rheumatoide Arthritis

Bei Zöliakie wird der klassische Typ vom subklinischen Typ und vom silenten Typ unterschieden. Kuloglu *et al.* stellten durch eine retrospektive Studie mit 109 Kindern mit Zöliakie eine Häufigkeitsverteilung von 60,6 % klassischer Typ, 37,6 % subklinischer Typ und 1,8 % silenter Typ fest (69). Der klassische Typ ist gekennzeichnet durch die Zöliakie-typischen Symptome chronische Diarrhö, Bauchschmerzen, aufgeblähtes Abdomen, Anämie, leichte Ermüdbarkeit, Gewichtsverlust und Wachstumsretardierung bei Kindern (112). Jones *et al.* (62) haben festgestellt, dass die Zöliakie bei Erwachsenen häufig subklinisch verläuft, wobei die typischen Zöliakie-Symptome wie Bauchschmerzen und Diarrhö fehlen. Anämie ist dabei häufig das einzige Symptom einer bestehenden Zöliakie. Neunundfünfzig % der Patienten zeigten eine Beeinträchtigung der Knochenqualität in Form einer Osteopenie oder Osteoporose. Der silente Typ ist gekennzeichnet durch das Fehlen von Symptomen bei positiver Zöliakie-Serologie und pathologischen Biopsiebefunden.

Führt die glutenfreie Diät (GFD) bei Zöliakie nicht zur Verbesserung der Symptome und pathologischen Schleimhautveränderungen, handelt es sich um eine refraktäre Zöliakie. Bei der refraktären Zöliakie tritt oft eine Proliferation phänotypisch veränderter T-Zellen auf, wie sie auch typisch für das Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphom (EATL) sind. Cellier *et al.* postulierten, dass die Kombination aus refraktärer Zöliakie und phänotypisch veränderten T-Zellen eine frühe Form des EATL darstellt (19). Etwa ein Viertel der Zöliakie-Patienten entwickeln weitere

Autoimmunerkrankungen wie D.m. I, Hashimoto-Thyreoiditis oder Rheumatoide Arthritis (5). Die Erkrankungen verbindet die gemeinsame autoimmune Komponente in der Pathogenese; möglicherweise entstehen Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Geweben.

1.2.4 Diagnostik der Zöliakie

Zur Diagnostik der Zöliakie gehören klinische, serologische, endoskopische und histologische Aspekte (Tab. 6). Klinische Zeichen der Zöliakie sind die typischen Symptome Diarrhö, aufgeblähtes Abdomen, Bauchschmerzen und Gedeihstörung. Hinweise auf eine silent oder subklinisch verlaufende Zöliakie sind andere Autoimmunerkrankungen wie Hashimoto-Thyreoiditis oder D.m. I oder das Vorliegen einer Anämie.

Ein wichtiges Diagnostikkriterium für das Vorliegen einer Zöliakie sind anti-Gliadin-AK, tTG-AK und EMA. AK gegen tTG und deaminierte Gliadinpeptide (dGliadin) haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität mit jeweils 91 % und 98 % für dGliadin-AK und vergleichbar hohen Werten für tTG-AK (63). EMA haben eine geringere Sensitivität für Zöliakie. Die AK gegen dGliadin und tTG sind gut geeignet als Screeningmarker für Zöliakie und zur Verlaufs-/Compliancebeobachtung der Zöliakie-Patienten.

Tab.6 Diagnostik der Zöliakie	
Symptome	- Klassisch (Diarrhö, Bauchschmerzen, Gedeihstörung) - Subklinisch (Anämie) - Silent (keine Symptome)
Antikörper	- anti-dGliadin-AK - anti-tTG-AK - EMA
Endoskopie	- Duodenoskopie - Kapselendoskopie
Biopsie	- histologische Untersuchung - aus verschiedenen Duodenumbereichen

dGliadin: deaminierte Gliadinpeptide; anti-tTG-AK: anti-tissue Transglutaminase-Antikörper; EMA: Endomysium-auto-Antikörper

Mit Hilfe einer Duodenoskopie kann man die Dünndarmschleimhaut beurteilen und prüfen, ob Schleimhautveränderungen wie Abflachung des Kerckring'schen Faltenreliefs, Rötung und Mosaikmuster vorliegen. Biopsate der Duodenalschleimhaut werden auf Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und IEL-Zahl untersucht. Rashid *et al.* haben durch Untersuchungen an 35 pädiatrischen Zöliakie-Patienten gezeigt, dass aufgrund des möglicherweise diskontinuierlichen Auftretens mukosaler Veränderungen die Biopsieentnahme aus verschiedenen Teilen des Duodenum erforderlich ist (104). Bei alleiniger Biopsieentnahme aus dem distalen Duodenum blieben einige Zöliakie-Patienten unerkannt. Eine Alternative zur Endoskopie mit Biopsieentnahme ist die Kapselendoskopie. Eine Studie von Lidums *et al.* zeigte eine gute Sensitivität und Spezifität der Kapselendoskopie im Vergleich zur histologischen Diagnostik der Zöliakie (73). Beweisend für das Vorliegen einer Zöliakie ist das Ansprechen auf eine GFD, also der Rückgang der Symptome und endoskopischen sowie histologischen Veränderungen.

1.2.5 Therapie der Zöliakie

Die Therapie der Zöliakie besteht in einer strikten GFD. Hutchinson *et al.* beobachteten an 284 Zöliakie-Patienten, dass die GFD bei guter Compliance nach etwa ein bis zwei Jahren zur Besserung der endoskopischen und histologischen Befunde führt und bei manchen Patienten sogar wieder ein Normalbefund hergestellt werden kann (58). Die Besserung der Symptomatik erfolgt schon früher. Auch Begleiterscheinungen wie Gedeihstörung und Anämie sprechen meist gut auf die Therapie an. Gründe für ein Therapieversagen sind eine schlechte Compliance, eine Fehldiagnose oder das Vorliegen einer refraktären Zöliakie. Bei der refraktären Zöliakie führt die GFD nicht zur Besserung der Symptome und pathologischen Mukosabefunde. Eine medikamentöse antiinflammatorische Therapie mit Steroiden, 5-ASA-Präparaten oder Azathioprin führt bei einem Teil der Patienten mit refraktärer Zöliakie zur Besserung (43;61).

1.3 Knochenentwicklung

Die Knochenentwicklung ist der Zeitraum zwischen Knorpelanlage in der Embryonalzeit bis zum Schluss der Epiphysenfugen in der Pubertät und beinhaltet die Entwicklung und das Wachstum der Knochen. Die Entwicklung der menschlichen Knochen verläuft in einem genetisch vorgegebenen Rahmen, phasenhaft und ist durch von außen einwirkende Kräfte beeinflussbar.

Die Knochenentwicklung beginnt pränatal mit der Entstehung des knorpeligen Skelettmodells. Gesichtsschädel, Schädeldach und Klavikula entstehen durch desmale Osteogenese. Bei dieser direkten Form der Knochenneubildung differenzieren die Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten, die Osteoid bilden und die Mineralisation der Kollagenfibrillen steuern. Bei der desmalen Osteogenese entsteht der Knochen durch appositionelles Wachstum.

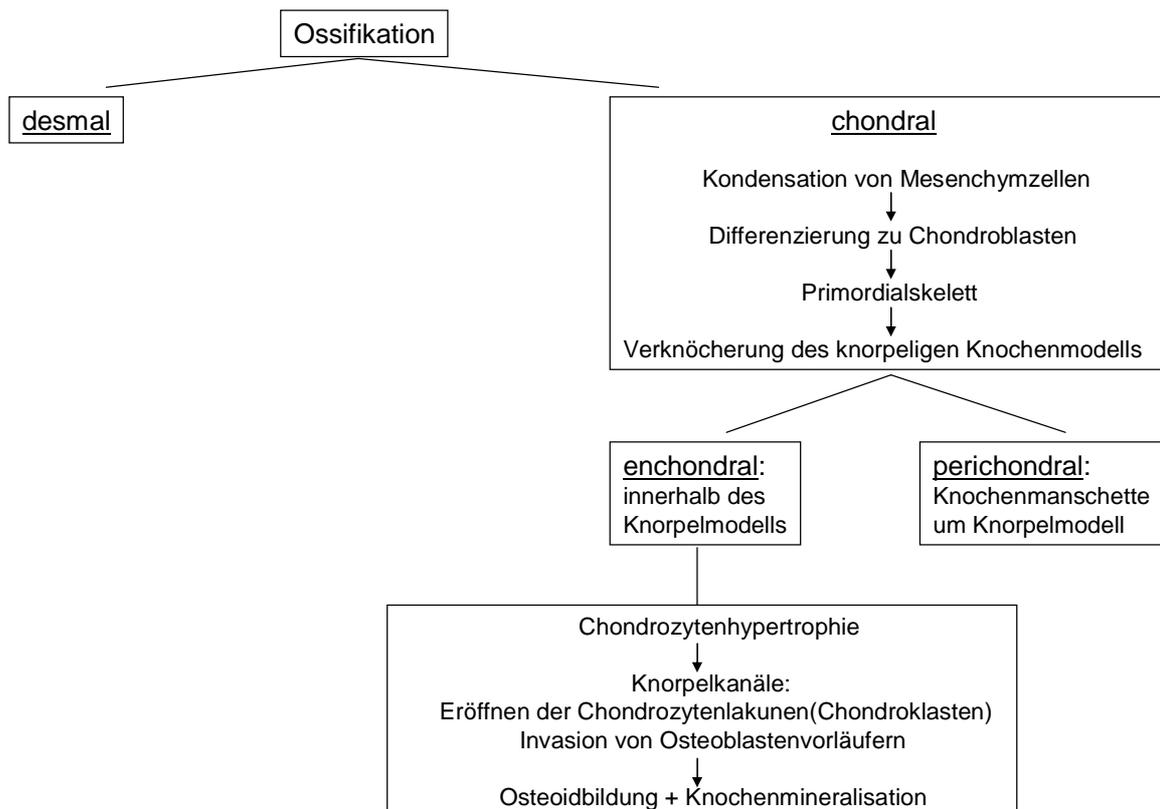


Abb.5 Knochenbildung

Desmale Ossifikation von Gesichtsschädel, Schädeldach und Klavikula; chondrale Ossifikation der übrigen Knochen. Bei der chondralen Ossifikation findet zunächst eine Kondensation von Mesenchymzellen statt, die zu Chondroblasten differenzieren und das knorpelige Primordialskelett bilden. Darin enthaltene Chondrozyten hypertrophieren und mineralisieren die Knorpelmatrix. Über Knorpelkanäle wandern Osteoblastenvorläufer in die Knorpelmatrix ein und es kommt zur Osteoidbildung und anschließender Knochenmineralisation.

Die restlichen Knochen des menschlichen Körpers werden durch chondrale Osteogenese gebildet. Abbildung 5 stellt den Ablauf der chondralen Ossifikation dar. Untersuchungen von Rivas *et al.* (108) zu den Mechanismen und der zeitlichen Abfolge der Entwicklung langer Röhrenknochen an Hasen verschiedener prä- und postnataler Entwicklungsstufen lassen Rückschlüsse auf die chondrale Ossifikation beim Menschen zu. Es kommt zur Kondensation von Mesenchymzellen an Orten späterer Knochenbildung. Die kondensierten Mesenchymzellen differenzieren zu Chondroblasten, die das Primordialskelett aus hyalinem Knorpel bilden. Im Innern des Knorpelmodells hypertrophieren die Chondrozyten und mineralisieren die umgebende Knorpelmatrix. Blumer *et al.* (13) haben an Hühnerknochen die Rolle der Knorpelkanäle im weiteren Verlauf der chondralen Ossifikation untersucht, wie sie auch im menschlichen Knochen vorkommen. Ausgehend vom Perichondrium, das vaskularisiert ist und mesenchymale Stammzellen enthält, bilden sich Knorpelkanäle in das Knorpelmodell hinein. Die Knorpelkanäle enthalten Chondroblasten, die mineralisierte Knorpelmatrix abbauen und die Lakunen der hypertrophen Chondrozyten eröffnen. Über die Knorpelkanäle kommt es zur Invasion von Blutgefäßen und mesenchymalen Osteoblastenvorläufern in die Lakunen und es entstehen Ossifikationszentren für die enchondrale Ossifikation im Innern des Knorpelmodells. Die eingewanderten mesenchymalen Zellen differenzieren zu Osteoblasten. Die Osteoblasten setzen über Matrixvesikel Osteoid frei und bewirken dessen Mineralisation.

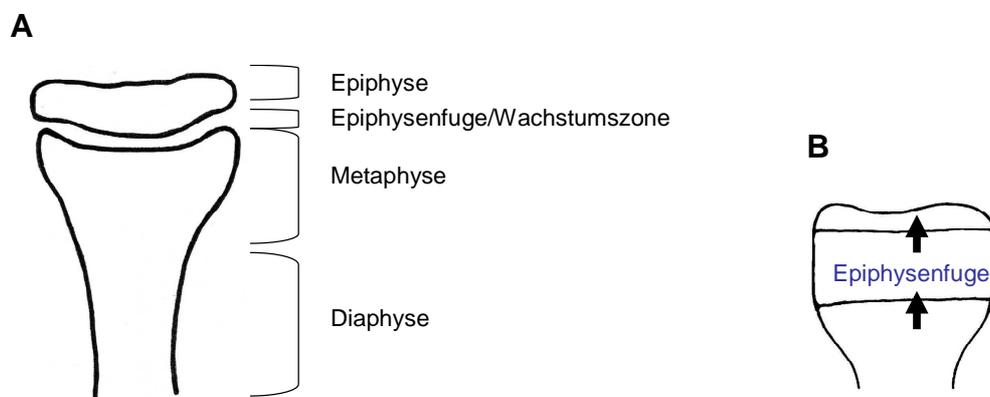


Abb.6 **A:** Schematische Darstellung der verschiedenen Knochenabschnitte: Epiphyse, Wachstumszone, Metaphyse, Diaphyse; **B:** Die Ausdehnung der knorpeligen Epiphysenfuge Richtung Epiphyse und die parallel ablaufende Verknöcherung aus Richtung der Diaphyse führen zum Längenwachstum der Knochen

Postnatal ist die Knochenentwicklung durch die zunehmende Verknöcherung des Knorpelskeletts, das Längenwachstum der Knochen und die Zunahme der Knochenmasse und -dichte gekennzeichnet. Das Längenwachstum der Knochen wird durch die knorpelige Epiphysenfuge ermöglicht, die zwischen Epiphyse und Metaphyse angelegt wird (Abb. 6). Die Epiphysenfuge enthält undifferenzierte Chondrozytenvorläufer, die den Zellenachschub für den Erhalt der Wachstumszone darstellen. Hier findet fortwährend Knorpelbildung und Ossifikation statt. Die Epiphysenfuge dehnt sich mit der gleichen Geschwindigkeit in Richtung Epiphyse aus, mit der sie von der Markhöhle her durch Knochengewebe ersetzt wird. Die Epiphysenfuge schließt sich, indem sie komplett durch Knochen ersetzt wird, wenn die Chondrozyten ihre Proliferation beenden. Nilsson *et al.* (88) haben durch Studien an Hasen herausgefunden, dass die DNA-Methylierung der Reservezone-Chondrozyten mit der Zeit abnimmt. Die Abnahme der DNA-Methylierung ist ein möglicher Mechanismus, der die Proliferation der Chondrozyten in der Epiphysenfuge von Säugern stoppt und dadurch das Längenwachstum limitiert. Nach dem Schluss der Epiphysenfuge ist das Längenwachstum der Knochen abgeschlossen.

Die Pubertät ist eine wichtige Phase der Knochenentwicklung und trägt zu einem großen Teil zur Entwicklung der PBM bei. Im Zuge des pubertären Wachstumsschubes unter dem Einfluss der Sexualhormone nehmen Knochenlänge, -masse und -dichte stark zu. In einer Follow-up-Studie über pubertierende Mädchen zeigte sich ein bis zwei Jahre vor der Menarche ein Peak in der Wachstumsgeschwindigkeit (131). Mora *et al.* (83) haben gezeigt, dass die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP), ein Marker für den Knochenaufbau, die höchste Konzentration im Serum bei Mädchen im Alter zwischen 10 bis 12 Jahren und bei Jungen im Alter zwischen 12-14 Jahren erreicht. Kröger *et al.* (67) haben die Zunahme der Knochendichte bei gesunden Kindern und Jugendlichen zwischen 7-20 Jahren beobachtet. Die größte Zunahme der Knochenmasse findet bei Mädchen im Zeitraum der Menarche (11-13 Jahre), bei Jungen etwas später zwischen dem 13. und 17. Lebensjahr statt. Der größte Teil der PBM wird während der Pubertät und Adoleszenz aufgebaut.

Während der Pubertät tragen verschiedene Einflussfaktoren zur Entwicklung der Knochen bei. Die in einer Studie bei 174 gesunden Jugendlichen zwischen 11-15 Jahren beobachtete positive Korrelation zwischen der ausgeschütteten Menge an Sexualhormonen (Östrogen, Testosteron) und der Knochendichte (143) spricht dafür, dass die Sexualhormone eine wichtige Rolle in der Regulation der pubertären Knochenentwicklung spielen. Es gibt auch individuell beeinflussbare Einflussfaktoren der Knochenentwicklung, die zur Optimierung der Knochenstärke und der PBM führen können. Eine Beobachtung von 109 Jungen und 121 Mädchen über sieben Jahre hat gezeigt, dass gerade während Kindheit, Pubertät und Adoleszenz körperliche Aktivität für eine optimale Entwicklung der Knochendichte und -festigkeit wichtig ist (39).

1.4 CED als Ursache für schlechte Knochenqualität bei Kindern

Patienten mit M. Crohn oder Zöliakie haben ein erhöhtes Risiko für eine verminderte Knochendichte und die Entwicklung einer Osteoporose. Schlechte Knochenqualität bei CED ist nicht nur ein Problem bei älteren CED-Patienten. Auch Kinder mit CED können eine niedrigere Knochendichte aufweisen als gesunde Kontrollprobanden. In einer Studie mit 144 Kindern und Jugendlichen mit CED haben 47 % Z-Scores < -1 standard deviation (SD) und 25 % Z-Scores $< -2SD$ (113). Die bei der Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) gemessenen Z-Scores geben die Abweichung der Knochendichte vom durchschnittlichen Wert gesunder Gleichaltriger an. Die in der Studie gemessenen Werte für die Knochendichte zwischen < -1 SD und < -2 SD liegen unterhalb der alterstypischen Norm und weisen auf das Vorliegen einer Osteopenie, Werte < -2 auf eine Osteoporose in der Gruppe der CED-Patienten hin.

Die Entstehung der Osteopenie bzw. Osteoporose bei CED ist multifaktoriell und die kausalen Zusammenhänge sind noch nicht vollkommen verstanden. Tabelle 7 zeigt mögliche Ursachen für schlechte Knochenqualität bei Kindern mit CED. Schmidt *et al.* (113) haben männliches Geschlecht und einen niedrigen body mass index (BMI) als Faktoren identifiziert, die mit niedriger Knochendichte bei Kindern mit CED assoziiert sind. Paganelli *et al.* (97) haben bei Kindern mit CED (n=56) gezeigt, dass eine niedrige Knochendichte mit hohen IL-6-Spiegeln und hohem Krankheitsaktivitätsindex korrelierte und dass die antiinflammatorische Therapie mit Infliximab einen positiven Effekt auf die Knochendichte hatte. Daraus kann man

schließen, dass die Entzündungsaktivität ein entscheidender Einflussfaktor für die Knochenqualität bei Kindern mit CED ist.

Tab.7 Ursachen schlechter Knochenqualität bei Kindern mit CED	
Entzündungsaktivität	- IL-6 - Hoher Krankheitsaktivitätsindex
Geschlecht	- ♂ > ♀
BMI	- pos. Korrelation zur Knochendichte
Steroide	- Einfluss der Steroide unklar
nutritiv	- Calciummangel - Vitamin D-Mangel

Die Rolle der Corticosteroide im Zusammenhang mit der Knochenqualität bei CED ist umstritten. Es ist fraglich, ob die direkte negative Wirkung des Steroids auf den Knochen oder die indirekte positive Wirkung durch die Senkung der Entzündungsaktivität überwiegt. Die Ergebnisse einer Studie mit 86 glukokortikoidbehandelten Kindern (132) sprechen dafür, dass sich hohe kumulative Steroiddosen negativ auf die Knochendichte auswirken. Dubner *et al.* beobachteten bei 67 Kindern mit M. Crohn die Entwicklung der Knochendichte während der Steroidtherapie und zeigten eine positive Assoziation zwischen der Gabe von Glukokortikoiden und dem Anstieg der kortikalen Knochendichte (32). Eine mit 90 pädiatrischen CED-Patienten durchgeführte Untersuchung zeigte keine Unterschiede in der Osteoporoseprävalenz zwischen der steroidnaiven und der Steroidtherapie-Gruppe (135). Dieses Ergebnis stellt in Frage, ob die Steroidtherapie schon bei Kindern messbare Folgen für die Knochendichte hat oder diese möglicherweise erst im Erwachsenenalter zum Tragen kommen.

Bei Kindern und Jugendlichen mit Zöliakie hängt die Knochendichte von der Compliance bezüglich der GFD ab. Das zeigte sich in einer Studie mit 74 Zöliakie-Patienten (12), in der die Kinder mit strikter GFD höhere Werte für die Knochendichte aufwiesen als Kinder ohne strenge GFD. In dieser Gruppe von Zöliakie-Patienten lagen Calciumaufnahme und Vitamin D-Spiegel bei allen Patienten unterhalb der empfohlenen Mindestwerte. Niedrige Calcium- und Vitamin D-Werte stellen weitere Risikofaktoren für eine niedrige Knochendichte dar.

1.5 Vitaminmangel bei Kindern mit CED

M. Crohn und Zöliakie prädisponieren für die Entwicklung eines Mangels an Vitamin B12 und Folat. Die intestinale Absorption von Folat und Vitamin B12 ist bei unbehandelter Zöliakie beeinträchtigt. Eine Studie zum Vitaminstatus bei Kindern mit Zöliakie (54) hat gezeigt, dass die fraktionelle Absorption von Vitamin B12 und Folat bei Glutenexposition gegenüber Einhaltung der GFD signifikant erniedrigt ist. Besonders häufig vom Vitamin B12- und Folatmangel betroffen sind M. Crohn-Patienten mit Ileumbefall/-resektion und Patienten mit Bedarf an medikamentöser Therapie, also hoher Krankheitsaktivität (48); bei ihnen ist die Vitaminaufnahme im Darm gestört.

In einer Studie (99) mit 130 Patienten zum Vitamin D-Mangel bei Kindern mit CED zeigte sich eine Vitamin D-Mangel-Prävalenz von 34,6 %. Der Vitamin D-Mangel tritt vor allem im frühen Krankheitsstadium, bei niedrigem BMI, bei starker Krankheitsausprägung und Befall des oberen Gastrointestinaltraktes auf. Dunkle Haut und geringe Sonneneinstrahlung im Winter verstärken den Vitamin D-Mangel. In Tabelle 8 sind mögliche Ursachen eines Mangels an Vitamin B12, Folat und Vitamin D bei Kindern mit CED aufgeführt.

Tab.8 Ursachen für Vitaminmangel bei CED	
Vitamin B12, Folat	Vitamin D
Glutenexposition hohe Krankheitsaktivität Befall des oberen Gastrointestinaltraktes	
	niedriger BMI
	geringe Sonnenexposition, dunkle Haut

1.6 Vitamine

1.6.1 Vitamin B12

Das wasserlösliche Vitamin B12 (Cobalamin) besteht aus einem Corrinringsystem mit einem zentralen Cobaltatom. Nur Mikroorganismen sind befähigt Cobalamin zu synthetisieren. Tiere können das in ihrem eigenen Magen-Darm-Trakt von Mikroorganismen gebildete Cobalamin resorbieren. Menschen sind auf Cobalamin-haltige tierische Produkte (Fleisch, Fisch, Eier, Milchprodukte) als einzige Cobalaminquelle angewiesen. Das im menschlichen Kolon durch Mikroorganismen synthetisierte Cobalamin kann nur unzureichend resorbiert werden. Die Unfähigkeit des Menschen, das im Kolon synthetisierte Cobalamin zu resorbieren, führt in Kombination mit der fehlenden Aufnahme tierischer Eiweiße bei Vegetariern und in höherem Maße bei Veganern, häufig zu einem Vitamin B12-Mangel (51). Vegetarier und Veganer haben ein erhöhtes Risiko klinische Folgen eines Vitamin B12-Mangels zu entwickeln. Tabelle 9 zeigt einen Überblick über natürliche Quellen und die Funktion von Vitamin B12, Ursachen und Folgen eines Vitamin B12-Mangels und durch welche Laborparameter ein Mangel zu erkennen ist.

Tab.9 Vitamin B12: Vorkommen, Funktion, Mangel	
Natürliche Quellen	- tierische Produkte: Fleisch, Fisch, Eier, Milchprodukte
Risikofaktoren für Vitamin B12-Mangel	- vegetarische/vegane Diät - Alter - Mangel an Intrinsic Factor (atrophische Gastritis) - Erkrankungen des terminalen Ileum (M. Crohn)
Laborparameter	- Vitamin B12 - holoTC - Homocystein - Methylmalonsäure
Funktion	- Coenzym für Methioninsynthase - Coenzym für Methylmalonyl-CoA-Mutase
Folgen des Vitamin B12-Mangel	- megaloblastäre Anämie - neurologisch: kognitive Störung, Demenz - Knochenresorption

holoTC: Holotranscobalamin

Bei Patienten, die infolge einer atrophischen Gastritis einen Mangel an Intrinsic Factor (IF) haben, sind niedrige Vitamin B12-Spiegel verbreitet (116). Das mit der Nahrung aufgenommene Cobalamin bildet im Duodenum einen Komplex mit dem in den Parietalzellen des Magens produzierten IF. Der IF ist wichtig für die IF-Rezeptor-vermittelte Resorption von Cobalamin durch Enterozyten des terminalen Ileum. In den Enterozyten wird Cobalamin auf das Transportprotein Transcobalamin (TC) übertragen und gelangt ins Blut. Der TC-Cobalamin-Komplex (Holotranscobalamin; holoTC) wird über rezeptorvermittelte Endozytose in Zellen extraintestinaler Gewebe aufgenommen. Im Blut sind 10 % des Vitamin B12 an TC gebunden. Achtzig-90 % des Plasma-Vitamin B12 sind an das Transportprotein Haptocorrin gebunden, das den Rücktransport zur Leber gewährleistet. In Abbildung 7 sind Aufnahme- und Transportmechanismen von Vitamin B12 aus der Nahrung bis in die peripheren Zellen gezeigt.

Neben dem IF-Mangel infolge atrophischer Gastritis und der vegetarischen/veganen Diät, entsteht ein Mangel an Vitamin B12 auch bei Erkrankungen des terminalen Ileum (z.B. M. Crohn), dem Ort der Cobalaminresorption. Bei älteren Menschen kommt es häufig zu Störungen der Vitamin B12-Aufnahme. Eine Studie mit 827 Probanden über 60 Jahren hat gezeigt, dass die Prävalenz des Vitamin B12-Mangels mit dem Alter zunimmt (136). Symptome wie unsicherer Gang und Hypästhesie und neuroelektrophysiologische Veränderungen können bei älteren Menschen mit einem Vitamin B12-Mangel in Verbindung gebracht werden.

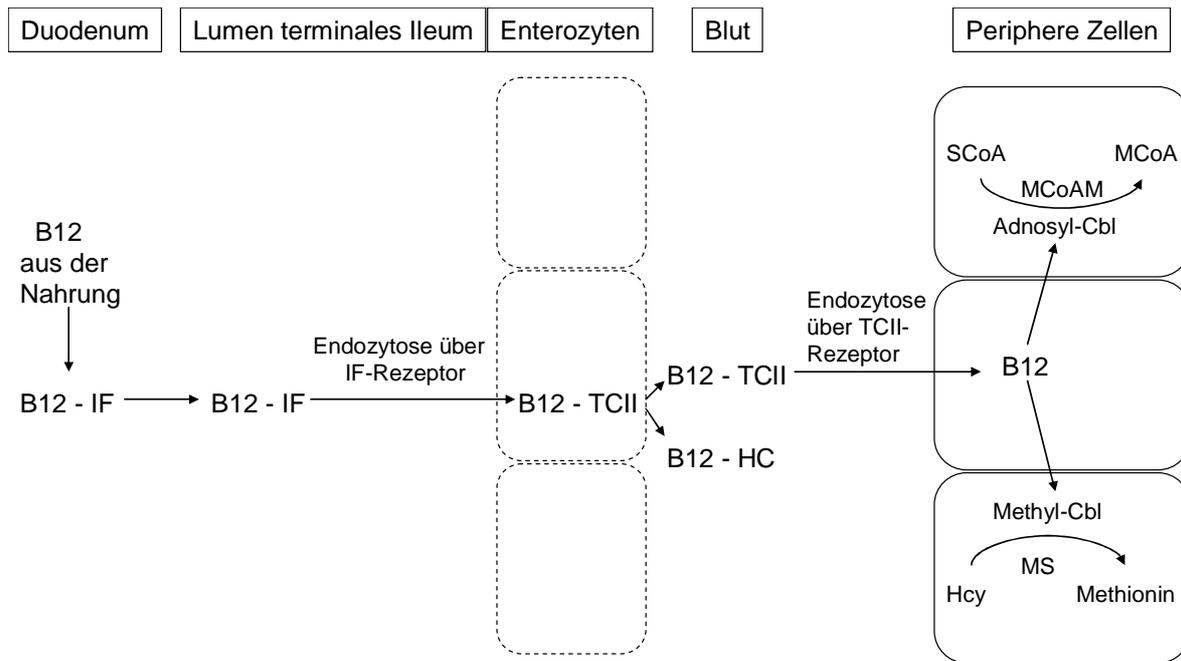


Abb.7: Resorption, Transport und Stoffwechsel von Vitamin B12.

Das B12 aus der Nahrung bindet im Duodenum an den im Magen gebildeten IF. B12 wird über den IF-Rezeptor in die Enterozyten im terminalen Ileum aufgenommen und bildet dort durch Bindung an TC II das holoTC. Im Blut ist B12 an TCII oder HC gebunden. Der B12-HC-Komplex wird zur Leber zurücktransportiert; als holoTC wird B12 in periphere Zellen aufgenommen. B12 dient als Adnosyl-Cbl als Kofaktor für die MCoAM bei der Reaktion von SCoA zu MCoA und als Methyl-Cbl als Kofaktor für die Methioninsynthese bei der Reaktion von Hcy zu Methionin. B12: Vitamin B12; IF: Intrinsic Factor; TCII: Transcobalamin II; HC: Haptocorrin; Hcy: Homocystein; Cbl: Cobalamin; MS: Methioninsynthase; SCoA: Succinyl-CoA; MCoA: Methylmalonyl-CoA; MCoAM: Methylmalonyl-CoA-Mutase

Cobalamin wirkt im Körper als Coenzym für zwei verschiedene Enzyme (Abb.7). Die Methioninsynthase katalysiert Vitamin B12-abhängig die Übertragung einer Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) auf Homocystein, wobei Methionin und Tetrahydrofolat (THF) entsteht. Bandarian *et al.* haben gezeigt, dass die Bindung von Cobalamin an die Methioninsynthase für eine effiziente Katalyse dieser Reaktion essentiell ist (2). Aus Methionin entsteht der universelle Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM). Als Adenosylcobalamin ist Vitamin B12 der Cofaktor für das Enzym Methylmalonyl-CoA-Mutase, welches die Reaktion von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA katalysiert.

Tab.10 Tagesbedarf an Vitamin B12	
Alter (Jahre)	Bedarf (µg)
0-3	1,0
4-6	1,5
7-9	1,8
10-12	2,0
13-17	3
>=18	4-7

Im menschlichen Körper sind große Mengen an Vitamin B12 gespeichert. Zur klinischen Manifestation eines Vitamin B12-Mangels kommt es erst, wenn durch eine über längere Zeit bestehende Vitamin B12-Mangelsituation die Speicher aufgebraucht sind und die Vitamin B12-abhängigen Stoffwechselwege nicht länger aufrechterhalten werden können. Tabelle 10 zeigt den altersabhängigen Tagesbedarf an Vitamin B12. Ein Vitamin B12-Mangel äußert sich v.a. durch hämatologische und neurologische Störungen. Eine häufige neurologische Manifestation des Vitamin B12-Mangels ist die funikuläre Myelose mit degenerativen Veränderungen der Hinter- und Seitenstränge des Rückenmarks. In einer Patientengruppe (n=26) mit niedrigen Vitamin B12-Spiegeln (77) zeigten sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) Demyelinisierungen des Rückenmarks und die Patienten hatten neurologische Symptome wie periphere Neuropathie und Parästhesien. Ein Vitamin B12-Mangel kann sich auch in Form von kognitiver Beeinträchtigung (84) und Demenz (95) klinisch manifestieren. Als hämatologische Folge des Cobalaminmangels wird die Entwicklung einer megaloblastären Anämie mit erhöhtem Erythrozytenvolumen und erhöhtem Hämoglobingehalt der Erythrozyten (M. CrohnV: >94 fl, M. CrohnH: >34 pg) beschrieben. In einer Gruppe von 220 Patienten mit megaloblastärer Anämie kam ein Vitamin B12-Mangel bei 78,5 % der Patienten vor und schien eine der Hauptursachen für die Entstehung der Anämie zu sein (60).

Herrmann *et al.* stellten durch in vitro-Untersuchungen an Osteoklastenkulturen fest, dass es bei niedrigen Vitamin B12-Spiegeln zu einer vermehrten Aktivierung von Osteoklasten kommt (49). Niedrige Vitamin B12-Spiegel scheinen also eine Rolle bei der Knochenresorption zu spielen. Umgekehrt kann man schlussfolgern, dass Vitamin B12 wichtig für eine gute Knochenqualität ist.

1.6.2 Folat

Folat enthält ein Pteridinringsystem, eine p-Aminobenzoessäure und ein oder mehrere Glutamate. Im Blut liegt Folat in Monoglutamatform vor, in den Zellen und Geweben als Polyglutamat. Folsäure, die künstliche Form des Folat, die nur in Supplementen und nicht in natürlichen Nahrungsmitteln vorkommt, liegt als Monoglutamat vor. Das wasserlösliche Folat stellt die Grundverbindung einer großen Gruppe von Folatverbindungen dar. Die aktive Form des Folats ist das THF. In der Natur kommt Folat in allen tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln, v.a. in Leber, Hefe, grünem Gemüse (Spinat, Salat, Gurken) und Getreideprodukten, vor. Ein Teil (bis zu 90 %) der in den Lebensmitteln enthaltenen Folate gehen durch die Verarbeitung, Hitze- und Lichteinwirkung verloren. Ein großer Teil der mitteleuropäischen Bevölkerung ist nicht in der Lage den täglichen Folatbedarf von 400 µg aus natürlichen Lebensmittelquellen zu decken. Eine Befragung zum Lebensmittelkonsum in Spanien (n=619) (128) hat ergeben, dass nur unzureichende Mengen an Folat mit der Nahrung aufgenommen wurden. Als Folge einer Folatmangelversorgung können funktionelle Störungen auftreten. In Tabelle 11 sind natürliche Folatquellen, die Funktionen des Folat sowie Ursache, Folgen und Laborparameter zum Erkennen eines Folatmangels aufgeführt.

Tab.11 Folat: Vorkommen, Funktion, Mangel	
Natürliche Quellen	<ul style="list-style-type: none"> - Leber - Hefe - grünes Gemüse - Getreideprodukte
Risikofaktoren für Folatmangel	<ul style="list-style-type: none"> - einseitige Ernährung - Alter - Malabsorption (M. Crohn) - Schwangerschaft - Alkoholabusus - Medikamenteninterferenz (Methotrexat)
Laborwerte	<ul style="list-style-type: none"> - Folat im Serum - Folat in den Erythrozyten - Homocystein
Funktion	<ul style="list-style-type: none"> - Synthese von Purinen und Thymidylaten - Methylierungsreaktionen: DNA, RNA, Proteine Hcy → Methionin
Folgen des Folatmangels	<ul style="list-style-type: none"> - Hypomethylierung der DNA - Tumorentwicklung - Schleimhautveränderungen im Mundbereich - Megaloblastäre Anämie - Neuralrohrdefekte - Atherosklerose - kognitive Störungen

Folat wird im Duodenum und proximalen Jejunum über einen aktiven Protonen-abhängigen Transport (proton-coupled folate transporter, PCFT) pH-abhängig aufgenommen (102). Die Aufnahmerate ist am höchsten bei pH 5,5. Die Folatabsorption im Darm erfolgt in Monoglutamatform. Die in der Nahrung vorkommenden Polyglutamatformen werden vor der Absorption in Monoglutamate umgewandelt. Alternativ zum PCFT kann Folat im Darm auch über passive Diffusion und den reduced folate carrier (RFC) aufgenommen werden. Der Transport von Folat im Blut erfolgt in Monoglutamatform; die Speicherform des Folat sind die Polyglutamate.

THF und seine Derivate dienen als Überträger von C₁-Resten. Bei der Reaktion von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) fungiert 5,10-Methylen-THF als C₁-Gruppendedonator und spielt damit eine wichtige Rolle in der DNA-Synthese. Purine, ein weiterer DNA-Bestandteil, werden ebenfalls folatabhängig synthetisiert; bei diesem Vorgang ist 10-Formyl-THF beteiligt. Die Methylgruppe für die Synthese von Methionin aus Hcy wird von 5-MTHF geliefert. Das zeigte eine Studie von Cuskelly *et al.* (23), in der die Methioninsynthese aus Hcy bei Patienten mit Folatmangel gehemmt war. Methionin wird zu S-Adenosylmethionin (SAM), dem universellen Methylgruppendedonator transformiert.

Dem Körper stehen nur geringe Folatspeicher zur Verfügung. In einer Folatmangelsituation wird zuerst das Serumfolat und dann das in den Erythrozyten gespeicherte Folat aufgebraucht. Danach treten Störungen der folatabhängigen Stoffwechselwege auf. Bei Folatmangel steigt die Zahl der Strangbrüche in der DNA und des fehlerhaften Einbaus von Uracil; die Reparatur von DNA-Schäden ist bei Folatmangel beeinträchtigt (34). Ein Folatmangel führt außerdem zur Hypomethylierung der DNA, wodurch es zur Tumorentwicklung kommen kann. Durch Untersuchungen an Kulturen von humanen Kolonkarzinomzellen (138) zeigte sich, dass Kolonzellen in folatfreiem Medium eine stärkere Hypomethylierung aufwiesen als Zellen in folathaltigem Milieu. Die beobachtete Hypomethylierung im Bereich des Tumorsuppressorgens p53 ist eine mögliche Erklärung für das erhöhte Risiko der Entwicklung kolorektaler Tumoren bei Folatmangel.

Frühe klinische Manifestationen des Folatmangels waren bei einer Studie mit 161 Probanden über 70 Jahren Veränderungen der Zungenschleimhaut und die Mundwinkelstomatitis (11). Nach längeren Phasen des Folatmangels entwickelt sich, infolge der Beeinträchtigung der Erythropoese, eine megaloblastäre Anämie. Untersuchungen von 85-jährigen Probanden aus der Allgemeinbevölkerung im Rahmen der Leiden 85-plus Studie (27) zeigten eine Assoziation zwischen einem Folatmangel und der Entwicklung einer Anämie. Diese Studie zeigte, dass ältere Menschen ohne Folatsupplementation eine Risikopopulation für die Entwicklung eines Folatmangels darstellen.

Gründe für einen Folatmangel sind mangelnde Aufnahme im Rahmen einer Fehlernährung oder einer Malabsorption (M. Crohn) und Arzneimittelinterferenzen (MTX). Ein erhöhter Folatbedarf besteht während der Schwangerschaft. Es ist bekannt, dass niedrige Folat Spiegel bei schwangeren Frauen bzw. im Zeitraum der Konzeption zu einem erhöhten Risiko für Neuralrohrdefekte führen und eine Folatsupplementation in diesem Zeitraum präventiv wirkt. In Kanada hat die Rate der Neuralrohrdefekte durch die Fortifikation von Lebensmitteln mit Folat um 46% abgenommen (26). Man empfiehlt daher Frauen mit Kinderwunsch und Schwangeren eine tägliche Aufnahme von 600 µg Folsäure pro Tag. Tabelle 12 zeigt den altersabhängigen Tagesbedarf an Folat.

Tab.12 Tagesbedarf an Folat	
Alter (Jahre)/Lebenssituation	Bedarf (µg)
1-3	200
4-9	300
>9	400
Perikonzeptionell/Schwangerschaft	600
Stillzeit	500

1.6.3 Hyperhomocysteinämie (HHcy)

Die nicht-proteinbildende Aminosäure Hcy ist an zwei Stoffwechselwegen beteiligt. Im Rahmen des C₁-Kreislaufes findet die Vitamin B12-abhängige Reaktion von Hcy zu Methionin statt. Die benötigte Methylgruppe stammt von 5-MTHF; in der Leber kann alternativ Betain die Methylgruppe liefern. Aus Methionin entsteht der universelle Methylgruppendonor SAM. Im Rahmen der katabolen Transsulfurierung entsteht aus Hcy und Serin Cystathionin. Abbildung 8 stellt den C₁-Kreislauf dar.

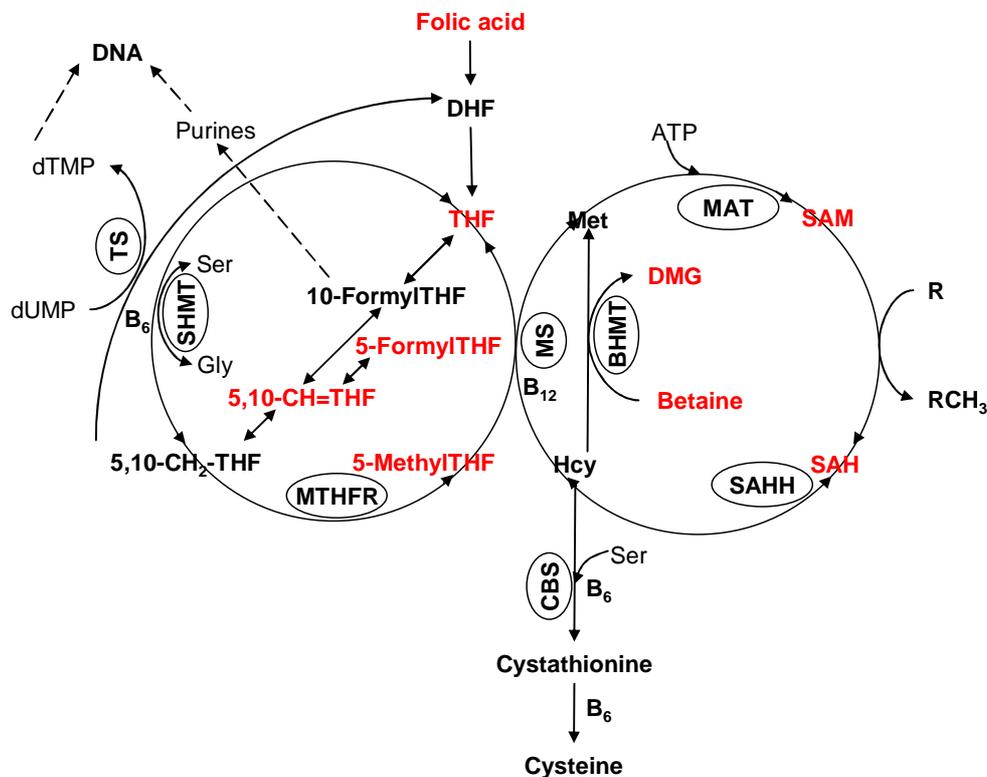


Abb.8: C₁-Kreislauf

Hcy: B12-abhängige Reaktion des Hcy zu Methionin durch MS; dabei ist 5-Methyl-THF der Methylgruppendonor. Alternativ kann auch Betain die Methylgruppe zur Methionin-Bildung liefern. Methionin wird zu SAM; SAM wird durch Demethylierung zu SAH, das durch hydrolytische Spaltung zu Hcy wird. Alternativ kann Hcy B6-abhängig durch die CBS zu Cystathionin transsulfuriert werden, das B6-abhängig zu Cystein transformiert wird. Folat: 5,10-Methylen-THF ist an der B6-abhängigen Reaktion von dUMP zu dTMP durch die TS bei der Thymidylatsynthese beteiligt. 10-Formyl-THF liefert Formylgruppen bei der Purinsynthese. BHMT: Betain-Homocysteine-Methyltransferase; CBS: Cystathionin β-Synthase; DHF: Dihydrofolat; Hcy: Homocystein; MAT: Methioninadenosyltransferase; Met: Methionin; MTHFR: 5,10 Methylentetrahydrofolatreduktase; MS: Methioninsynthase; SAH: S-Adenosylhomocystein; SAHH: S-Adenosylhomocysteinhydrolase; SAM: S-Adenosylmethionin; Ser: Serin; Gly: Glycin; SHMT: Serinhydroxymethyltransferase; THF: Tetrahydrofolat; TS: Thymidylatsynthase

Folat- und Vitamin B12-Mangel sind die häufigsten Ursachen für eine HHcy. Sowohl durch den Mangel an Vitamin B12 als Kofaktor der Methioninsynthese als auch durch den Mangel an 5-MTHF als Methionindonor, ist die Reaktion von Hcy zu Methionin gehemmt und es kommt zum Anstieg des Hcy. Eine HHcy kann auch durch Mutationen von am Hcy-Stoffwechsel beteiligten Enzymen entstehen. Bei Niereninsuffizienz kommt es zu Störungen des Hcy-Metabolismus. In einer Studie (53) mit 63 nierentransplantierten Patienten und 38 Dialysepatienten zeigte sich in beiden Patientengruppen eine Erhöhung des tHcy. Als Ursache für die HHcy wurde neben der renalen Dysfunktion auch ein Mangel an Vitamin B12 vermutet.

HHcy gilt als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor. In einer Studie mit 208 Probanden (45) hatten die Teilnehmer mit stattgehabtem Myokardinfarkt höhere tHcy-Werte als ihre Kontrollen und tHcy-Werte über 15 µmol/l stellten einen signifikanten Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse dar. Eine Studie mit 112 Koronare Herzkrankheit (KHK)-Patienten zeigt eine positive Korrelation zwischen der tHcy-Konzentration im Serum und dem Schweregrad der KHK (105).

Eine HHcy kann auch neurologische Folgen haben. Obeid *et al.* (92) haben festgestellt, dass erhöhte tHcy- und S-Adenosylhomocystein (SAH)-Spiegel im Liquor mit höheren Konzentrationen an phosphoryliertem Tau-Protein (P-tau), einem Protein, das bei Demenzpatienten akkumuliert, assoziiert ist. Es wurde vermutet, dass die HHcy bei Demenzpatienten Ausdruck eines gestörten C₁-Metabolismus ist, was zur Neurodegeneration beiträgt. Die Normalisierung der tHcy-Spiegel könnte eine Möglichkeit sein, die P-tau-Akkumulation und damit die Neurodegeneration zu reduzieren.

Hcy und die B-Vitamine haben einen Einfluss auf die Knochenqualität. In einer Studie mit 82 Probanden (57) gingen hohe tHcy- und SAH-Spiegel im Knochen mit einer gestörten Knochenmorphologie in Form einer reduzierten Trabekeldicke und -zahl einher. Herrmann *et al.* (50) haben gezeigt, dass hohe tHcy-Konzentrationen in vitro zur Aktivierung von Osteoklasten führen. Diese Daten weisen darauf hin, dass tHcy eine Rolle bei der Knochenresorption spielt.

1.6.4 Vitamin D

Vitamin D kann im menschlichen Körper aus Cholesterin synthetisiert werden. Externe Vitamin D-Quellen sind pflanzliche und tierische Nahrungsmittel, v.a. Leber, verschiedene Fische (Aal, Lachs) und Eier. Durch Hydroxylierung in Leber und Nieren entsteht 1,25-(OH)₂-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃), die metabolisch aktive Form des Vitamin D.

Ein Mangel an Vitamin D ist in der gesunden Bevölkerung verbreitet. In einer Population gesunder Erwachsener (n=70) (91) zeigte die Hälfte der Probanden einen Vitamin D-Mangel. In dieser Studie waren die Wintermonate ein positiver Prädiktor für niedrige Vitamin D-Spiegel. Gründe für geringe UVB-Wirkung in der Haut und damit Risikofaktoren für einen Vitamin D-Mangel sind auch der überwiegende Aufenthalt in geschlossenen Räumen und starke Hautpigmentierung.

Vitamin D spielt eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. Der positive Effekt des 1,25(OH)₂D₃ auf den Knochenstoffwechsel zeigt sich in seiner Fähigkeit in Osteoblasten über den Vitamin D-Rezeptor eine Überlebenskaskade zu starten, die die Zellen vor apoptotischem Abbau schützt (145). Eine Studie mit 301 gesunden adoleszenten Chinesinnen hat gezeigt, dass Mädchen mit ausreichenden Vitamin D-Spiegeln niedrigere Knochenumbaumarker, einen höheren Knochenmineralgehalt und eine größere Knochenmasse aufwiesen (38). Das zeigt, dass adäquate Vitamin D-Spiegel während Pubertät und Adoleszenz wichtig für eine gute PBM sind. Leanne *et al.* berichteten, dass die Vitamin D-Mangelrachitis auch heute noch in Kanada bei Kindern vorkommt, die im Norden des Landes leben und dadurch eine nur geringe UVB-Exposition haben, eine starke Pigmentierung der Haut aufweisen oder gestillt worden sind, ohne eine Vitamin D-Supplementation zu erhalten (137). Diese Studie zeigt, dass eine adäquate Vitamin D-Versorgung ab dem Säuglingsalter wichtig für die Entwicklung einer guten Knochenqualität ist. In Tabelle 13 sind natürliche Quellen und der Tagesbedarf an Vitamin D aufgeführt und es werden Risiken für einen Vitamin D-Mangel sowie die Rolle des Vitamin D im Knochenstoffwechsel aufgezeigt.

Tab. 13 Vitamin D: Vorkommen, Funktion, Mangel, Bedarf	
Natürliche Quellen	<ul style="list-style-type: none"> - körpereigene Synthese - tierische Produkte (Leber), pflanzliche Produkte
Tagesbedarf	<ul style="list-style-type: none"> - 400IE
Risiko für Vitamin D-Mangel	<ul style="list-style-type: none"> - geringe Sonneneinwirkung: dunkle Haut Wintermonate Breitengrad Aufenthalt in geschlossenen Räumen
Rolle im Knochenstoffwechsel	<ul style="list-style-type: none"> - Apoptoseschutz für Osteoblasten - Vitamin D-Mangelrachitis in Risikopopulation - Aufbau der peak bone mass

Ziel der Studie

Die Hypothese dieser Studie war, dass Kinder mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen niedrigere Konzentrationen an D- und B-Vitaminen aufweisen als gesunde Kontrollen. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob es in Bezug auf Vitamin D und B-Vitamin-abhängige Marker (tHcy, SAH, SAM) einen Unterschied zwischen Gesunden und Kinder und Jugendlichen mit M. Crohn und Zöliakie gibt und ob der B- und D-Vitaminstatus mit den Knochenmarkern (BAP, TRAP5b) korreliert.

2. Material und Methodik

2.1 Probanden

Die Probanden der vorliegenden Studie wurden im Zeitraum von September 2009 bis Januar 2011 im Rahmen einer ambulanten Vorstellung oder eines stationären Aufenthaltes in der pädiatrischen Klinik des Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert. In diesem Zeitraum nahmen insgesamt 94 Probanden an der Studie teil, wovon 54 Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (24 M. Crohn, 7 Colitis ulcerosa, 23 Zöliakie) waren und 40 zur Kontrollgruppe gehörten.

Einschlusskriterium für die Patientengruppe waren Kinder und Jugendliche im Alter zwischen 3-18 Jahren mit der gesicherten Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (M. Crohn, Colitis ulcerosa) oder Zöliakie. In die Kontrollgruppe wurden gesunde Kinder und Jugendliche im Alter zwischen 3-18 Jahren aufgenommen. Klinisches Ausschlusskriterium für die Kontrollgruppe waren chronische Erkrankungen, hormonelle Störungen oder Wachstumsretardierung. Im Hinblick auf laborchemische Parameter wurden bei der Auswertung der CRP-Werte in beiden Gruppen Probanden mit akuter Entzündung (CRP >20 mg/l) von der Auswertung ausgeschlossen. Die regelmäßige Einnahme von Folat und/oder Vitamin B12 war ein weiteres Ausschlusskriterium für alle Probandengruppen. Die Patienten mit Colitis ulcerosa (n=7) wurden aufgrund der geringen Fallzahl nicht in der Auswertung berücksichtigt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission begutachtet und die Durchführung der Studie wurde genehmigt. Die Studie ist mit der Helsinki Deklaration vereinbar. Die Probanden und ihre Erziehungsberechtigten wurden über die Art der Probenentnahme, die laborchemischen Untersuchungen und die Datenschutzbedingungen informiert. Die Probanden, die an der Studie teilnehmen wollten, haben schriftlich ihre Einwilligung gegeben.

Es wurde eine Blutentnahme durchgeführt und eine Probe des zweiten Morgenurins gesammelt. Die Probanden wurden zur Erstellung eines detaillierten 7-tägigen Ernährungsprotokoll angeleitet, es haben aber nur wenige Probanden (n=20) ein Ernährungsprotokoll erstellt. Insgesamt konnten 19 Ernährungsprotokolle ausgewertet werden, 14 aus dem Patientenkollektiv und 5 aus dem Kontrollkollektiv. Ein Ernährungsprotokoll konnte wegen zu ungenauer Angaben nicht ausgewertet

werden. Die Auswertung der Ernährungsprotokolle wurde mit dem Programm EBISpro 2009 durchgeführt.

Zur Diagnostik wurden entnommen (jeweils in Monovetten[®] der Fa. Sarstedt):
2,7 ml Blut auf EDTA zur Bestimmung der Konzentrationen von Hämoglobin, SAH und SAM

4,7 ml Blut in trockener Monovette zur Bestimmung der Konzentrationen von tHcy, Cys, MMA, Folat, Vitamin B12, holoTC, BAP, OC, TRAP5b, PTH, Vitamin D, CRP, Kreatinin, Eiweiß, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Eisen.

Zweiter Morgenurin zur Bestimmung der Konzentration von DPD

2.2 Präanalytik

EDTA-Blut, Serum-Gel und Citrat-Blut wurden innerhalb von maximal 45 Minuten abzentrifugiert (2000 x g, 10 min), anschließend abgetrennt und aliquotiert. Zu einer EDTA-Plasma-Probe (500 µl) wurden 50 µl Essigsäure 1 N für die SAH/SAM-Messung zugefügt, um den Zerfall von SAM zu verhindern. Anschließend wurden alle Proben bei -70 °C gelagert. Der Urin wurde bis zur Verarbeitung bei 4 °C aufbewahrt, möglichst zeitnah aliquotiert und ebenfalls bei -70 °C gelagert.

2.3 Laborchemische Methodik

2.3.1 Messung von Homocystein (tHcy), Cystathionin (Cys) und Methylmalonsäure (MMA)

Cys, tHcy, und MMA werden mit Hilfe der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie (Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC/MS)) bestimmt. Dazu wurde die Methode von Stabler *et al.* (120) modifiziert. Vor der gaschromatographischen Auftrennung müssen gasförmige Derivate der Moleküle hergestellt werden. Im Anschluss an die Gaschromatographie gelangen die Moleküle in die Ionisationskammer, wo sie durch energiereiche Ladung ionisiert werden. Durch die überschüssige Energie brechen die Moleküle an labilen Bindungen in einem substanzspezifischen Fragmentierungsmuster auseinander. Diese werden von einem Detektor erfasst. Die Signalstärke ist proportional zur Ionenzahl einer spezifischen Masse. Das Ergebnis der Massenspektrometrie wird in Masse pro Ladung angegeben. Die Messung von tHcy und Cys kann mit dieser Methode simultan erfolgen. Den Proben werden interne Standards (IS) in Form von deuterierten Formen des Cys, Hcy bzw. MMA zugefügt. Die Konzentration des Stoffes in der Probe wird mit Hilfe der bekannten Konzentration der deuterierten Form in der Probe errechnet.

Geräte und Reagenzien:

- Gaschromatograph/Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies[®] (Typ 6890N)
- Poly-Prep Chromatography Columns der Firma Bio-Rad[®]
- Anionisches Resin der Firma Bio-Rad[®]
- Derivatisierung: N-methyl-butyldimethylsilyl-Tri-fluoroacetamid (MBDSTFA) der Firma Machery and Nagel[®]
- Interne Standards:

Hcy: DL-Homocystein (3,3,3', 3',4,4,4',4',D-8)

Arbeitskonzentration: 110,544 mg/l = 400 µmol/l

Cys: DL-(2-amino-2-carboxyethyl)Homocystein = DL-Cystathionin

Arbeitskonzentration: 1,78 mg/l = 7,86 µmol/l

MMA: DL-Methylmalonsäure

Arbeitskonzentration: 4 mg/l = 33,03 μ mol/l

- Reduktionsmittel: 1,4-Dithiothritol ($C_4H_{10}O_2S_2$, DTT) der Firma Roth[®]
Arbeitskonzentration: 10 mg/ml in 1N; NaOH
- Acetonitril, Methanol, Essigsäure und Chromatographenwasser (HPLC Grade) der Firma Merck[®]
- Concentrator (Typ 5301) der Firma Eppendorf[®]

Bevor die Messung von Cys/tHcy/MMA stattfindet, werden folgende Vorarbeiten durchgeführt. Bei der Cys/tHcy-Messung werden zu 200 μ l Serum 30 μ l DTT (30 mg/1 ml 1N NaOH) und je 30 μ l IS Cys 1:2 und IS Hcy 1:3 hinzugefügt und anschließend für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Für die Messung von MMA wird entsprechend 25 μ l IS MMA zugefügt. Die Festphase besteht aus 100 mg anionischem Resin pro Säule, das mit 1N:HCl und Methanol vorgewaschen wurde. Das Resin wird mit 1 ml Methanol und 3 ml Wasser gespült bevor die Proben zugefügt werden. Nachdem die Proben die Festphase durchlaufen haben, wird diese bei der Cys/tHcy-Messung zunächst dreimal mit 3 ml Wasser und dann einmal mit 3 ml Methanol gewaschen. Anschließend werden 1,1 ml einer 0,4N Essigsäure/Methanol-Mischung zur Eluation aufgetragen. Bei der MMA-Messung erfolgt der Waschschrift mit einmal 3 ml Wasser und anschließend mit dreimal 3 ml 0,01N Essigsäure/Methanol-Mischung. Die Eluationslösung für MMA ist ein Gemisch aus Essigsäure/Methanol und 1N:HCl im Verhältnis 9:1. Nachdem die Proben bei 60 °C 3 Stunden im Concentrator getrocknet wurden, werden sie mit 30 μ l eines Gemisches aus Acetonitril und MBDSTFA im Verhältnis 2:1 versetzt und 5 Minuten bei 440 Watt in der Mikrowelle derivatisiert. Anschließend wird die Messung im GC/MS-Gerät durchgeführt. Man erhält die Konzentration von MMA, tHcy und Cys, indem man den Quotient aus dem Integral des Probenkurven-Peaks und dem Integral des Standardkurven-Peaks bildet und mit einem substanzspezifischen Standardkonzentrationsfaktor multipliziert.

Formel zur Konzentrationsbestimmung:

$$\text{Konzentration} = (\text{Peakintegral}_{\text{Analyt}} / \text{Peakintegral}_{\text{Standard}}) \times \text{Konzentrationsfaktor}_{\text{Standard}}$$

	Einheit	Standardfaktor
tHcy	µmol/l	39,2
Cys	µmol/l	1000
MMA	Nmol/l	4087,5

Geräteeinstellung des Gaschromatographen:

Ofentemperatur: Min: 80°C Max: 310°C

Einlasstemperatur 230°C

Injektionsvolumen 1 µl

Flussgeschwindigkeit 1 ml/min

Retentionszeit MMA: 9 min

tHcy: 13,1 min

Cys: 17,1 min

Die Messung von Poolseren in jeder Messreihe dient der Qualitätskontrolle und der Ermittlung des Variationskoeffizienten (CV %):

$$\text{CV \%} = (\text{Standardabweichung}_{\text{Messwerte}} / \text{Mittelwert}_{\text{Messwerte}}) \times 100$$

CV %-Werte für diese Messungen:

	Level	CV %
tHcy	12 µmol/l	4 %
Cys	560 nmol/l	4,3 %
MMA	300 nmol/l	5 %

2.3.2 Messung von S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosylhomocystein (SAH)

Zur Messung von SAH und SAM wird eine Ultraperformance-Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS-Methode [stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry]) nach Kirsch *et al.* (66) verwendet, die eine simultane Bestimmung von SAH und SAM erlaubt. Nach der chromatographischen Auftrennung werden die Moleküle massenspektrometrisch erfasst. Durch positive Elektrospray-Ionisation (positive electrospray ionization, ESI) wird die Probe durch Einsprühen in ein starkes elektrisches Feld zerstäubt. Dadurch wird das Masse/Ladungs-Verhältnis reduziert und es werden schließlich Ionen freigesetzt, die vom Analysator erfasst werden.

Geräte und Reagenzien:

- Eppendorf-Zentrifuge 5810R
 - SPE-Säulen: BondElut[®] PBA der Firma Varian, an deren Kieselsäure-Oberfläche Phenylboronsäure kovalent gebunden ist; Straight Barrel Cartridge, 100 mg 1 ml
 - SAH und SAM der Firma Sigma-Aldrich
 - Interner Standard (3 mM für ²H₃-SAM und 0,8 mM für ¹³C₅-SAH)
 - LC Tandem-MS: Alliance[®] HT 2795 HPLC der Firma Waters mit Micromass Quattro Micro API Tandem Massenspektrometer
- Berechnung der Konzentration: Software QuanLynx, MassLynx V4.1
- Pufferlösung: 20 mM Ammonium (NH₄)-acetat-Lösung, pH 7,4
- Mobile Phase: Acetat/H₂O-Lösung, pH 2,636
- Probenneutralisierung: 1 M NH₃-Lösung

Zur Vorbereitung der SAH/SAM-Messung wird eine Kalibratorreihe erstellt. Ausgehend von einer 1:2 Verdünnung des SAM-Stockes bzw. einer 1:25 Verdünnung des SAH-Stockes wird der Ausgangskalibrator (200/48) aus 17,8 µl SAH 1:25, 20 µl SAM 1:2 und 1162,2 µl Puffer hergestellt. Die nächste Kalibratorstufe (100/24) entsteht durch Mischen von 600 µl der Ausgangskalibrator-Lösung und 600 µl Puffer. Nach dem gleichen Prinzip werden weitere Kalibratoren (50/12, 25/6) hergestellt. Außerdem stellt man eine Kontrolle im oberen Messbereich aus 14,9 µl SAH 1:25, 20 µl SAM 1:2 und 1465,1 µl Puffer und eine Kontrolle im unteren Messbereich aus 400 µl der High Control und 1200 µl Puffer her. Das anschließende Zufügen von je 50 µl Puffer zu je 500 µl der Kalibratoren bzw. je 50 µl 1M NH₃ zu je

500 µl der Proben dient der Neutralisation (pH 7,4-7,5). Dann werden Proben und Kalibratoren mit je 25 µl IS versetzt. Die Säulen werden vor Auftragen der Proben mit 1 ml Acetat/H₂O-Lösung und dann fünfmal mit 1 ml 20 mM Ammoniumacetat gespült. Nach jedem Spülschritt werden die Säulen eine Minute bei 500 x g zentrifugiert. Nach dem Auftragen der Proben werden die Säulen bei 250 x g für zwei Minuten zentrifugiert und dann mit zweimal 1 ml Puffer bei 500 x g für je eine Minute gespült. Die Elution erfolgt bei 250 x g und 4 °C mit dreimal 350 µl mobiler Phase für je zwei Minuten. Dann können die Proben im LC-MS/MS-Automaten gemessen werden. Die Konzentration von SAH/SAM erhält man durch Berechnung des Integrals der Masse-Ladungs-Kurve des Massenspektrogramms im definierten Bereich anhand der Referenzwerte der IS.

Geräteeinstellung:

Fluss:	0,3 ml/min
Probenvolumen:	20 µl
Retentionszeit:	SAM: 1 min SAH: 1,8 min
Laufzeit/Probe:	3 min
CV:	< 7 %

2.3.3 Messung von Vitamin B12 (Cobalamin)

Die Bestimmung von Cobalamin beruht auf dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay in Kombination mit Chemilumineszenzmarkierungen. Die Konzentration von Cobalamin wird maschinell mit dem ADVIA Centaur[®] System von Bayer gemessen. Das Vitamin wird aus seiner Proteinbindung herausgelöst. Das freigesetzte Vitamin B12 aus dem Serum konkurriert mit einer festgelegten Menge an Vitamin B12, das mit Acridiniumester markiert ist, um die Bindung des in der Festphase verankerten Intrinsic Factor. Die Signalstärke des markierten Vitamin B12 ist umgekehrt proportional zum B12 in der Probe.

2.3.4 Messung von Holotranscobalamin (holoTC)

Vitamin B12 bildet im Körper einen Komplex mit Transcobalamin (holoTC). HoloTC stellt die aktive Form des Cobalamin dar und kann von allen Zellen aufgenommen werden. HoloTC (aktives B12) stellt den sensitivsten Marker für einen Vitamin B12-Mangel dar (52). Die Messung des holoTC wird nach dem Prinzip des Mikropartikel-Enzym-Immunoassay (MEIA) nach Brady *et al.* (15) mit dem AxSYM Analyzer der Firma Abbott[®] durchgeführt. Bei diesem Verfahren sind holoTC-spezifische Antikörper an Matrixmikropartikel fixiert. Die Antikörper bilden Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem holoTC aus der Probe. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden anschließend durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration des holoTC in der Probe.

2.3.5 Messung von 25-OH-Vitamin D

Die Messung von 25-OH-Vitamin D erfolgte mit dem Liaison[®] Analyzer. Das Messverfahren beruht auf einem kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassay. Das in der Patientenprobe befindliche Vitamin D wird im ersten Schritt von seinem Bindeprotein abgelöst und bindet dann an einen spezifischen Vitamin D-Antikörper auf der Festphase. Anschließend wird das an ein Isoluminolderivat gebundene Vitamin D hinzugefügt. Das markierte Vitamin D konkurriert mit dem Vitamin D aus der Patientenprobe um die Bindung des auf der Festphase befindlichen Antikörpers. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten erfolgt ein Spülschritt, um das ungebundene Material abzuwaschen. Durch hinzufügen der Starter-Reagenzien läuft mit dem Isoluminolderivat eine Blitz-Chemilumineszenzreaktion ab. Das dabei entstehende Lichtsignal wird in relativen Lichteinheiten gemessen und ist umgekehrt

proportional zur in der Probe befindlichen Menge an Vitamin D. Der Liaison Analyzer berechnet automatisch die Vitamin-D-Konzentration. Die Werte werden in ng/ml angegeben.

2.3.6 Messung der Isoform 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP5b)

Das Glykoprotein TRAP5b wird von Osteoklasten in Korrelation mit ihrer Aktivität sezerniert. Die TRAP5b-Konzentration im Serum ist ein Indikator für die Osteoklastenaktivität und lässt Rückschlüsse auf die Knochenresorption zu. Die Bestimmung der TRAP5b-Konzentration im Serum erfolgt mit einem Immunocapture-Enzymassay. Das MicroVue TRAP5b-Assay der Firma Quidel® nutzt den monoklonalen Antikörper Trk62 als Capture-Antikörper für aktives TRAP5b. TRAP5b bildet einen Antigen-Antikörper-Komplex mit dem an die Mikrotiterplatten gebundenen spezifischen Antikörper Trk62. Nach Zugabe einer Substratlösung für TRAP5b kann dessen Enzymaktivität als Extinktion bei 405 nm gemessen werden. Die Stärke der Färbung ist direkt proportional zur TRAP5b-Konzentration in der Probe.

2.3.7 Messung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (BAP)

BAP ist ein auf der Oberfläche von Osteoblasten befindliches Glykoprotein und dient als Indikator der Osteoblastenaktivität als Marker der Skelettmineralisation. Die Konzentration von BAP im Serum wird mit Hilfe des MicroVue™ BAP Enzym-Immunoassay (EIA) der Firma Quidel® bestimmt. Es werden auf Mikrotiterstreifen fixierte monoklonale Anti-BAP-Antikörper zur Fixierung des in der Probe enthaltenen BAP verwendet. Die optische Dichte wird bei 405 nm abgelesen. Die gemessene optische Dichte ist proportional zur Konzentration des BAP in der Probe.

2.3.8 Messung von Deoxypyridinolin-(DPD)-Crosslinks

DPD-Crosslinks werden im Rahmen der Knochenresorption in den Blutkreislauf freigesetzt. Erhöhte Konzentrationen von DPD-Crosslinks im Urin sind ein Hinweis auf eine verstärkte Knochenresorption. Zur Messung der DPD-Crosslink-Konzentrationen werden Proben des zweiten Morgenurins verwendet. Das verwendete MicroVue DPD Assay der Firma Quidel® ist ein kompetitiver Enzym-Immunoassay. Hierbei konkurriert das DPD der Probe mit alkalischer DPD-

Phosphatase um die Bindung der am Teststreifen fixierten Anti-DPD-Antikörper. Die Stärke der Enzymreaktion wird nach Zugabe der Substratlösung bei 405 nm abgelesen. Je größer die Konzentration der in der Probe enthaltenen DPD-Crosslinks, desto geringer die Enzymreaktion.

Tab. 14 Bestimmung der Knochenmarkerkonzentration						
	Marker für	Material	Methode	Extinktion (nm)	Verhältnis: Extinktion/Konzentration	Firma
TRAP5b	Abbau	Serum	Immunocapture-ELISA	405	direkt proportional	Quidel®
BAP	Aufbau	Serum	Immunocapture-ELISA	405	direkt proportional	Quidel®
DPD	Abbau	Urin	Kompetitiver Enzym-Immunoassay	405	umgekehrt proportional	Quidel®
PTH	Abbau	Serum	Immunocapture-ELISA	450	direkt proportional	Biomerica

2.3.9 Messung von Parathormon

Zur Messung der PTH-Konzentration im Serum wurde das Intakt-PTH-Immunoassay der Firma Biomerica verwendet. Bei diesem Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) werden zwei Ziege-Antikörper gegen das humane PTH eingesetzt, die an zwei verschiedenen Stellen des PTH-Moleküls spezifisch binden. Einer der beiden Antikörper ist biotinyliert und bindet dadurch das PTH-Molekül an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Der zweite Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase markiert und dient zur Detektion. Bei Inkubation einer Patientenprobe und der beiden Antikörper auf der Mikrotiterplatte bildet sich ein Sandwich-Komplex aus den beiden Antikörpern und dem im Patientenserum enthaltenen PTH. Durch Hinzufügen des Substrates der Meerrettich-Peroxidase (Tetramethylbenzidin) wird ein gelber Farbumschlag hervorgerufen. Die Intensität der Gelbfärbung ist direkt proportional zur PTH-Konzentration im Patientenserum. Durch Kalibratormessungen wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, in der die Absorption gegenüber der PTH-Konzentration aufgetragen wird. Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve wird die Konzentration an intaktem PTH im Patientenserum ermittelt.

2.3.10 Messung von CRP

Die Bestimmung von CRP erfolgte durch immunologische Turbidimetrie bzw. Nephelometrie. Die Turbidimetrie beruht auf einer Veränderung der Absorption eines Licht-/Laserstrahls in einer Suspension, die Nephelometrie auf der Veränderung des Streulichtes desselben. Die Veränderung von Absorption bzw. Streulicht wird durch das Auslösen einer Antigen-Antikörper-Reaktion des in der Probe enthaltenen CRP hervorgerufen.

2.3.11 Messung von Kreatinin, Eiweiß, GOT, GPT, Hämoglobin und Eisen

Die Messung von Kreatinin, Eiweiß, GOT, GPT und Eisen im Serum erfolgte mit Roche/Hitachi cobas c Systemen an klinisch-chemischen Analyseautomaten der Firma Roche. Die Analytkonzentration der Probe wird automatisch durch die Roche/Hitachi cobas c Systeme bestimmt. Das Kreatinin wird mittels eines auf der Jaffé-Methode basierenden kinetischen Farbtests gemessen, wobei die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung proportional zur Kreatininkonzentration der Probe ist. Die Messung von Eisen und Eiweiß erfolgt auf der Grundlage eines Farbtests. Bei der Eisen- und der Eiweißmessung ist die Farbintensität direkt proportional zur Analytkonzentration der Probe. Zur Messung von GOT und GPT wird eine modifizierte Form der von der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) empfohlenen Methode verwendet. Bei der Indikatorreaktion wird NADH zu NAD⁺ oxidiert und die Abnahme der NADH-Konzentration in der Probe photometrisch gemessen. Die gemessene Abnahme der NADH-Konzentration ist proportional zur Aktivität von GOT und GPT.

Das Hämoglobin wurde mittels SYSMEX -Analysesystemen im EDTA-Plasma gemessen.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 20.0) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Median (10. – 90. Perzentile) angegeben. Die Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen ist als n (%) angegeben. Zum Vergleich der Mediane verschiedener Probandengruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Testung der Korrelation zweier Variablen erfolgte mit dem Spearman-Rho-Test. P-Werte <0,05 galten als signifikant.

3. Ergebnisse

Es wurden 87 Probanden in die Studie einbezogen (Kontrollen n=40, M. Crohn n=24, Zöliakie n=23). Da über den gesamten Beobachtungszeitraum nur 7 Patienten mit CU rekrutiert werden konnten, war eine statistische Auswertung dieser Probandengruppe nicht möglich. Die Altersverteilung war mit einem medianen Alter von 13,5 Jahren in der Kontrollgruppe, 13,0 Jahren in der M. Crohn-Gruppe und 11,0 Jahren in der Zöliakie-Gruppe ausgewogen. Die mediane Krankheitsdauer betrug 18 Monate in der M. Crohn-Gruppe und 20 Monate in der Zöliakie-Gruppe. Im Vergleich der Kontrollgruppe mit der M. Crohn-Gruppe zeigten sich signifikante Unterschiede in der GOT, wobei die GOT in der M. Crohn-Gruppe niedrigere Werte zeigte als in der Kontrollgruppe. Die GPT unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Bei den M. Crohn-Patienten lag der mediane Hb im niedrigen Bereich (12,1 g/dl; s. Tab.15) und war signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (p=0,037; s. Tab.15). Die gesamte Zöliakie-Gruppe zeigte CRP-Konzentrationen im Normbereich, wohingegen in der M. Crohn-Gruppe 39 % einen CRP-Wert > 5,0 mg/l als Zeichen eines entzündlichen Geschehens aufwiesen. In der Kontrollgruppe betrug der Anteil an erhöhten CRP-Konzentrationen (> 5,0 mg/l) 21 %. Hinsichtlich des BMI sowie der Laborwerte Kreatinin und Eiweiß zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Tabelle 15 zeigt klinische Merkmale und Laborparameter der drei Probandengruppen.

Tab.15 Klinische Merkmale und Standardlaborparameter der Probanden

	Kontrolle	M. Crohn	Zöliakie	P(Kontrolle/ M. Crohn)	P(Kontrolle/ Zöliakie)
Alter (Jahre)	13,5 (7,0-17,0)	13,0 (10,5-17,5)	11,0 (4,0-17,0)	0,456	0,226
männlich/weiblich (n,(%))	16 (18,4)/24 (27,6)	18 (20,7)/6 (6,9)	10 (11,5)/13 (14,9)	—	—
Krankheitsdauer (Monate)	—	18,0 (1,0-67,6)	20,0 (3,8-73,4)	—	—
Body mass index (kg/m ²)	19,0 (15,0-22,5)	18,2 (14,9-24,4)	17,7 (12,8-21,4)	0,896	0,205
Kreatinin (mg/dl)	0,59 (0,38-0,88)	0,59 (0,39-1,04)	0,54 (0,28-0,72)	0,615	0,107
Eiweiß (g/l)	71,5 (64,5-80,0)	70,5 (58,0-76,7)	69,0 (63,6-77,7)	0,415	0,250
GOT (U/l)	35,5 (24,5-53,1)	24,0 (19,0-32,8)	33,0 (25,0-44,5)	<0,001	0,469
GPT (U/l)	18,0 (9,3-45,6)	16,0 (6,2-25,0)	16,0 (12,0-22,7)	0,067	0,186
CRP (mg/l)*	0,7 (0,6-6,3)	2,2 (0,6-19,0)	0,6 (0,6-2,8)	0,063	0,054
Hb (g/dl)	13,5 (11,4-15,3)	12,1 (10,4-14,5)	13,0 (11,6-14,4)	0,037	0,114
Eisen (mg/dl)	—	44,0 (21,0-91,0)	76,0 (35,9-111,4)	—	—

Werte sind als Median (10.-90. Perzentile) oder prozentual bezogen auf die Studienpopulation angegeben. P-Werte nach Mann-Whitney-U-Test. * Probanden mit CRP>20mg/l wurden ausgeschlossen.

Abbildung 9 zeigt, dass die M. Crohn-Patienten eine höhere mediane CRP-Konzentration hatten als die Zöliakie-Patienten und Kontrollen. Der Unterschied zwischen M. Crohn- und Zöliakie-Gruppe war signifikant. Die höheren CRP-Werte geben einen Hinweis auf die bei M. Crohn ablaufende Entzündungsreaktion.

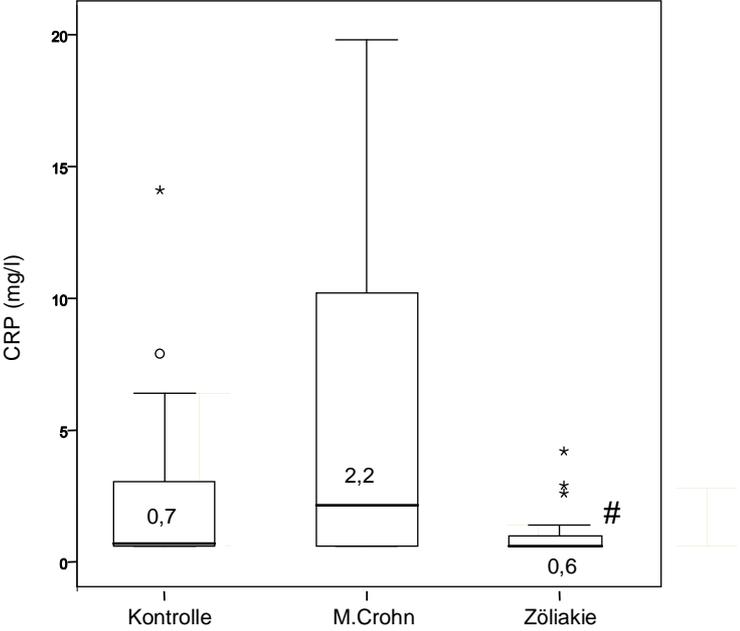


Abb.9: CRP im Vergleich zwischen Kontrolle, M.Crohn und Zöliakie; # $p < 0,05$ (zwischen M.Crohn und Zöliakie). Die angegebenen Werte stellen den Median dar.

Tabelle 16 zeigt wichtige Metabolite des C₁-Stoffwechsels und die gemessenen Vitamin D-Konzentrationen. Die Zöliakie-Gruppe zeigte im Bereich der B-Vitamine und deren Metabolite sowie bei der Vitamin D-Konzentration keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die SAH-Konzentration war in der M. Crohn-Gruppe mit einem medianen Wert von 12,0 nmol/l im Vergleich zur Konzentration in der Kontrollgruppe von 8,2 nmol/l signifikant höher ($p < 0,001$). Ebenso gab es einen signifikanten Unterschied bezüglich des SAM/SAH-Quotienten zwischen der M. Crohn- und der Kontrollgruppe ($p = 0,001$) mit einem niedrigeren medianen Quotienten bei M. Crohn. Dies gibt einen Hinweis auf eine reduzierte Methylierungskapazität in der M. Crohn-Gruppe. Die übrigen Parameter des C₁-Metabolismus zeigten keine signifikanten Unterschiede. Es wurden in der M. Crohn-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen von Vitamin D beobachtet als in der Kontrollgruppe ($p = 0,010$).

Tab.16 Vitamin D und Metabolite des C₁-Stoffwechsels

	Kontrolle	M. Crohn	Zöliakie	P (Kontrolle/M.Crohn)	P (Kontrolle/Zöliakie)
tHcy (µmol/l)	9,8 (4,4-15,7)	7,6 (5,0-15,1)	8,2 (4,1-14,3)	0,059	0,257
Cys (nmol/l)	159 (90-344)	150 (87-350)	177 (97-1235)	1,000	0,141
MMA (nmol/l)	196 (106-275)	189 (131-331)	213 (111-315)	0,416	0,436
Vitamin B12 _{gesamt} (pg/ml)	446 (323-897)	447 (227-837)	494 (132-1100)	0,542	0,840
holoTC (pmol/l)	54,5 (30,0-107,0)	53,8 (33,6-91,9)	64,6 (21,4-212,7)	0,818	0,217
SAH (nmol/l)	8,2 (5,2-13,0)	12,0 (7,9-16,4)	9,2 (6,2-11,9)	<0,001	0,315
SAM (nmol/l)	80 (68-100)	91 (71-107)	85 (70-124)	0,055	0,149
SAM/SAH-Quotient	10,3 (6,5-13,9)	8,0 (5,4-11,4)	10,0 (6,9-14,0)	0,001	0,924
Vitamin D (ng/ml)*	15,7 (4,8-26,8)	26,7 (11,5-37,4)	16,1 (5,3-38,1)	0,010	0,291

Werte sind als Median (10.-90. Perzentile) angegeben. P-Werte nach Mann-Whitney-U-Test. tHcy: Gesamthomocystein; Cys: Cystathionin; MMA: Methylmalonsäure; holoTC: Holotranscobalamin; SAH: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin. * Anzahl der Probanden: Kontrolle: n=10; M.Crohn: n=16; Zöliakie: n=11; bei Ausschluss der vier M.Crohn-Patienten mit Vitamin D-Supplementation: p(Kontrolle/M.Crohn)=0,021.

Abbildung 10 stellt den Vergleich der SAH-Konzentrationen und der SAM/SAH-Quotienten zwischen den drei Probandengruppen dar. In der M. Crohn-Gruppe zeigten sich signifikant höhere SAH-Konzentrationen als in der Zöliakie-Gruppe ($p=0,001$; Tab.20) und der Kontrollgruppe ($p<0,001$; Tab.16). Die M. Crohn-Patienten hatten einen signifikant niedrigeren medianen SAM/SAH-Quotient als die Zöliakie-Patienten ($p=0,004$; Tab.20) und die Kontrollprobanden ($p=0,001$; Tab.16).

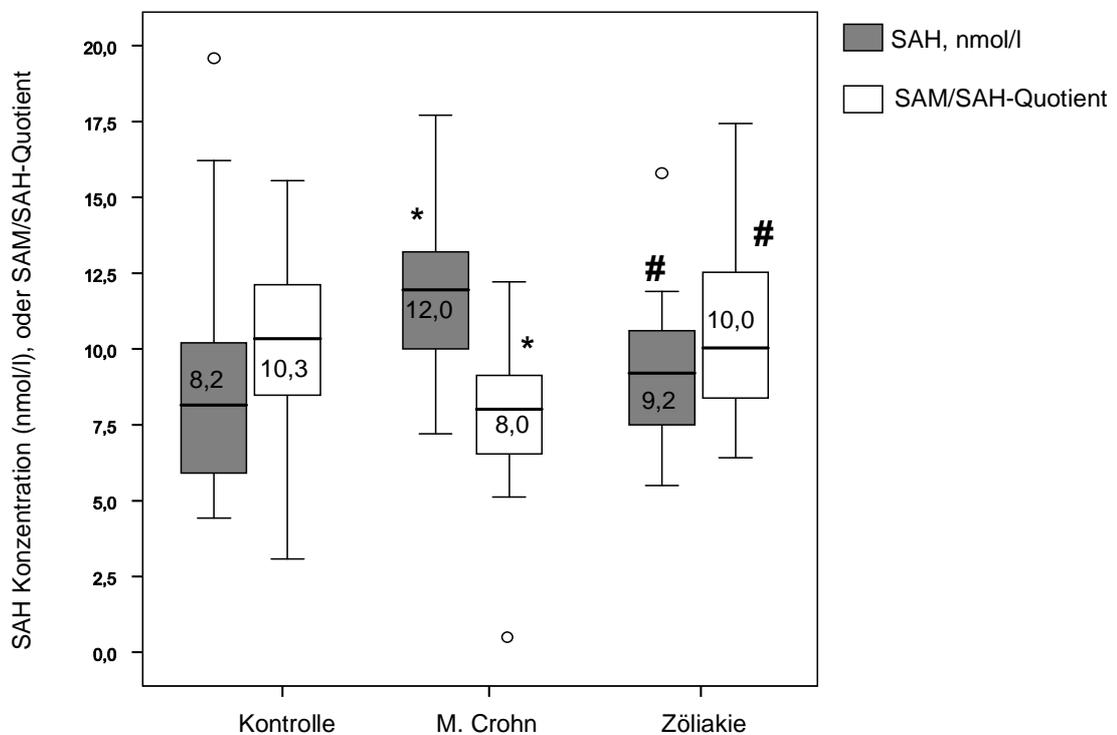


Abb.10: Vergleich der SAH-Konzentration und des SAM/SAH-Quotienten zwischen den Gruppen Kontrolle, M.Crohn und Zöliakie. * $p<0,05$ (zwischen Kontrollen und M.Crohn); # $p<0,05$ (zwischen M.Crohn und Zöliakie). Die angegebenen Werte stellen den Median dar.

Bei Betrachtung der Patientengruppen (M. Crohn und Zöliakie) zeigte sich bei M. Crohn- und Zöliakie-Patienten eine positive Korrelation zwischen dem SAM/SAH-Quotienten und der Vitamin B12-Konzentration ($r=0,455$; $p=0,007$) (Abbildung 11).

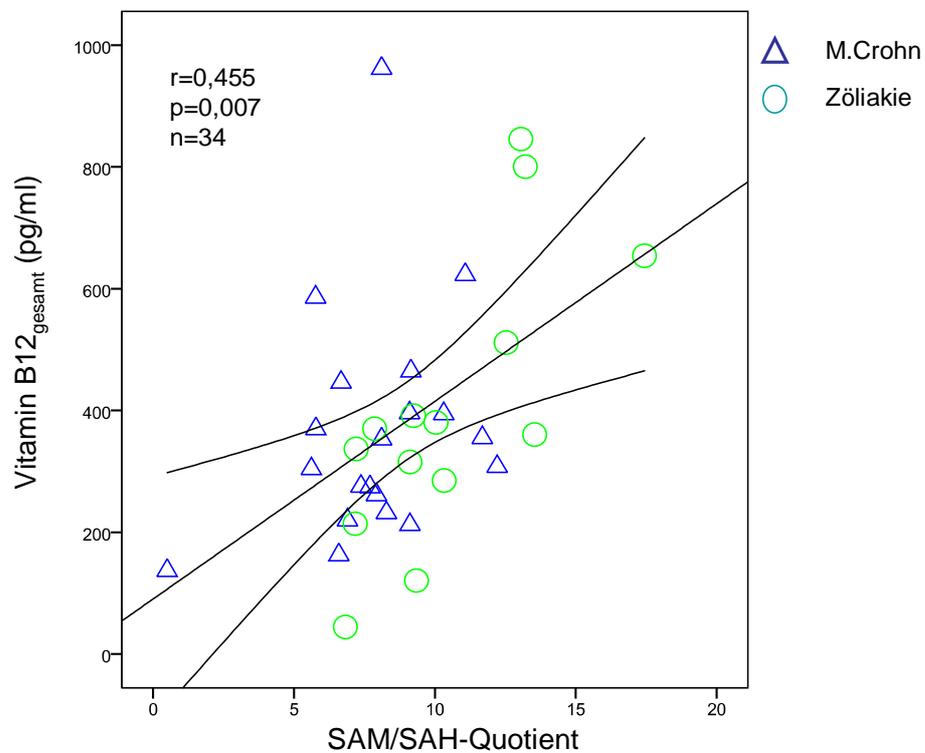


Abb.11: Korrelation zwischen dem SAM/SAH-Quotienten und Vitamin B12_{gesamt} (M.Crohn und Zöliakie). r : Korrelationskoeffizient nach Spearman Rho-Test.

Abbildung 12 zeigt die Verteilung der in den verschiedenen Probandengruppen gemessenen Vitamin D-Konzentrationen. In der Kontrollgruppe lag die Vitamin D-Konzentration bei allen Probanden unter 30 ng/ml. Bei Konzentrationen in diesem Bereich spricht man von einer unzureichenden Vitamin D-Versorgung. Von den Patienten der M. Crohn-Gruppe, bei denen die Vitamin D-Konzentration gemessen worden ist, waren vier Probanden mit Vitamin D supplementiert. Die Vitamin D-Konzentrationen der supplementierten Probanden lagen zwischen 25-40 ng/ml. Die M. Crohn-Patienten ohne Vitamin D-Supplementation zeigten Vitamin D-Konzentrationen zwischen 10-40 ng/ml. In der un-supplementierten Gruppe war kein Vitamin D-Mangel mit Werten <10 ng/ml zu beobachten. In der Zöliakie-Gruppe schwankten die Vitamin D-Konzentrationen zwischen <10 ng/ml und >30 ng/ml.

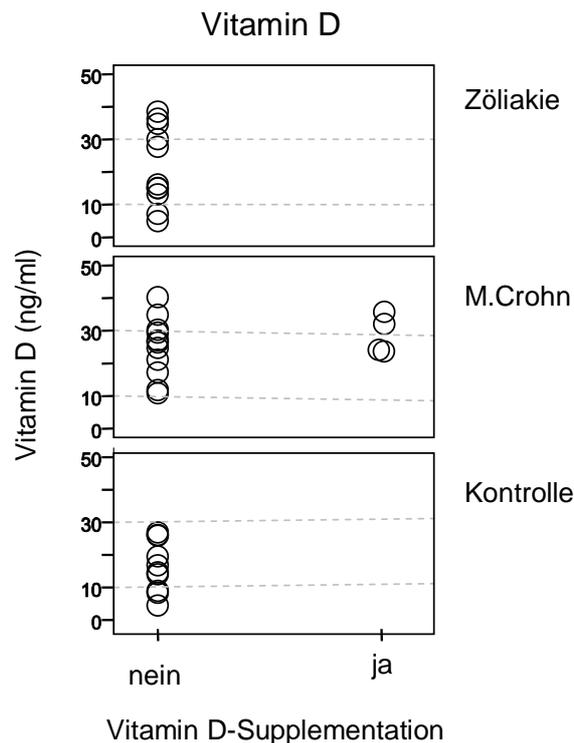


Abb.12: Verteilung der Vitamin D-Konzentrationen bei Kontrollen, M.Crohn und Zöliakie. In der M.Crohn-Gruppe sind vier Probanden mit Vitamin D supplementiert. Probandenzahl der Nicht-Supplementierten: Kontrolle: n=10; M.Crohn: n=12; Zöliakie: n=11. Linie bei 30 ng/ml: oberhalb ausreichende Vitamin D-Versorgung; Linie bei 10 ng/ml: unterhalb Vitamin D-Mangel; Bereich zwischen 10-30 ng/ml: unzureichende Vitamin D-Versorgung.

In Tabelle 17 sind Marker des Knochenstoffwechsels aufgeführt. Die Konzentrationen von BAP, einem Marker der Osteoblastenaktivität, zeigte sich in der M. Crohn-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,035$; s. Tab.17). Die Konzentrationen des durch Osteoklasten sezernierten TRAP5b wiesen in der M. Crohn-Gruppe ebenfalls einen niedrigeren Median auf als in der Kontrollgruppe (5,4 U/l vs. 8,9 U/l; s. Tab.17); der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Die Konzentration der bei der Knochenresorption freigesetzten Deoxypyridinolin (DPD)-Crosslinks des Typ-I-Kollagen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen M. Crohn und Kontrollen. In der M. Crohn-Gruppe zeigten sich niedrigere mediane DPD-Konzentrationen als in der Kontrollgruppe (17,9 vs. 23,2; s. Tab. 17). Die PTH-Konzentration unterschied sich zwischen Kontroll- und M. Crohn-Gruppe nicht signifikant. Bei den Zöliakie-Patienten waren bezüglich keinem der vier Knochenparameter signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zu beobachten.

Tab.17 Marker des Knochenstoffwechsels

	Kontrolle	M.Crohn	Zöliakie	P (Kontrolle/M.Crohn)	P (Kontrolle/Zöliakie)
BAP (U/l)	92 (40-171)	72 (31-123)	123 (42-216)	0,035	0,082
TRAP5b (U/l)	8,9 (2,2-17,4)	5,4 (2,0-11,2)	10,0 (3,2-17,0)	0,057	0,195
PTH (pg/ml)	23,2 (11,3-53,9)	23,0 (9,1-42,5)	26,0 (14,1-64,0)	0,569	0,437
Urin-DPD (nmol)/ Kreatinin(mmol)	23,2 (9,4-39,8)	17,9 (8,4-30,3)	22,9 (12,7-32,7)	0,285	0,749

Werte sind als Median (10.-90. Perzentile) angegeben. P-Werte nach Mann-Whitney-U-Test. BAP: knochenspezifische alkalische Phosphatase; TRAP5b: Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b; PTH: Parathormon. DPD: Deoxypyridinolin

Abbildung 13A zeigt die BAP-Konzentrationen von Kontroll-, M. Crohn- und Zöliakie-Gruppe im Vergleich. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen M. Crohn und Kontrollen sowie zwischen M. Crohn und Zöliakie beobachtet. M. Crohn-Patienten zeigten eine niedrigere mediane BAP-Konzentration als die Zöliakie-Patienten und die Kontrollen. In Abbildung 13B ist die TRAP5b-Konzentration im Vergleich zwischen Kontrollen, M. Crohn und Zöliakie dargestellt. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen M. Crohn und Zöliakie mit niedrigeren Konzentrationen bei M. Crohn. Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten die M. Crohn-Patienten niedrigere mediane TRAP5b-Konzentrationen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

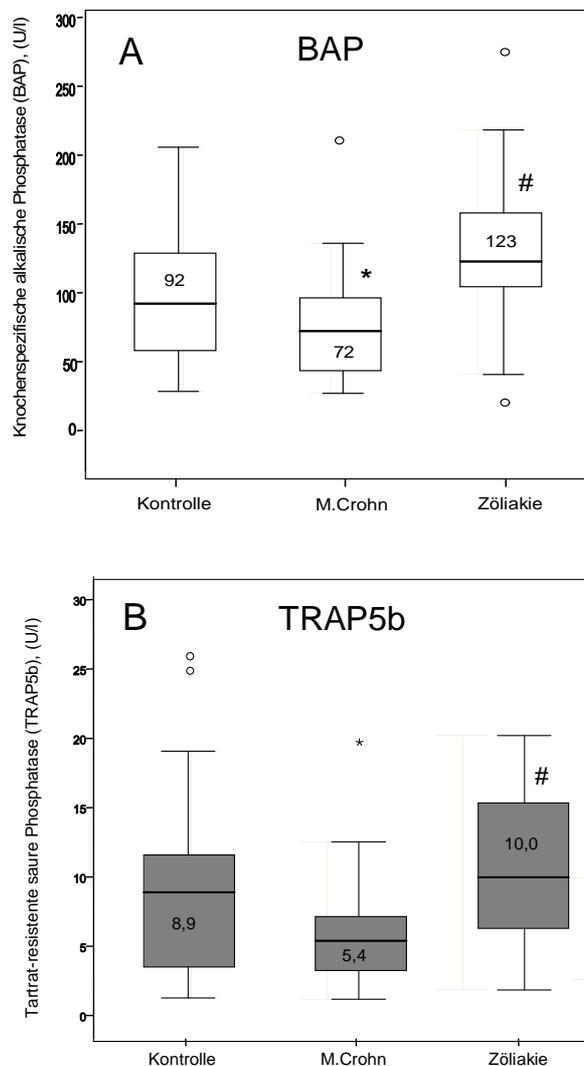


Abb.13 A: Vergleich der BAP zwischen Kontrollen, M. Crohn und Zöliakie.
 B: Vergleich der TRAP5b zwischen Kontrollen, M. Crohn und Zöliakie. * p<0,05 (zwischen Kontrollen und M.Crohn); # p<0,05 (zwischen M.Crohn und Zöliakie). Die angegebenen Werte stellen den Median dar.

In Tabelle 18 werden die beiden Patientengruppen M. Crohn und Zöliakie miteinander verglichen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich GOT- ($p < 0,001$), CRP- ($p = 0,001$) und Eisenkonzentrationen ($p = 0,006$). Bezüglich des C₁-Stoffwechsels zeigten sich signifikante Unterschiede bei den SAH-Konzentrationen ($p = 0,001$) und dem SAM/SAH-Quotient ($p = 0,004$). Zwischen M. Crohn und Zöliakie wurden signifikante Unterschiede im Bezug auf den Osteoblastenmarker BAP ($p = 0,001$) und den Osteoklastenmarker TRAP5b ($p = 0,002$) beobachtet. M. Crohn Patienten zeigten niedrigere mediane BAP- und TRAP5b-Konzentrationen. Die übrigen Knochenmarker zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Tab.18 Vergleich zwischen M.Crohn und Zöliakie

	M.Crohn	Zöliakie	P(M.Crohn/Zöliakie)
Kreatinin (mg/dl)	0,59 (0,39-1,04)	0,54 (0,28-0,72)	0,071
GOT (U/l)	24,0 (19,0-32,8)	33,0 (25,0-44,5)	<0,001
GPT (U/l)	16,0 (6,2-25,0)	16,0 (12,0-22,7)	0,399
CRP (mg/l)	2,2 (0,6-19,0)	0,6 (0,6-2,8)	0,001
Hb (g/dl)	12,1 (10,4-14,5)	13,0 (11,6-14,4)	0,270
Eisen (mg/dl)	44,0 (21,0-91,0)	76,0 (35,9-111,4)	0,006
tHcy (μ mol/l)	7,6 (5,0-15,1)	8,2 (4,1-14,3)	0,785
Cys (nmol/l)	150 (87-350)	177 (97-1235)	0,220
MMA (nmol/l)	189 (131-331)	213 (111-315)	0,980
Vitamin B12 _{gesamt} (pg/ml)	447 (227-837)	494 (132-1100)	0,556
holoTC (pmol/l)	53,8 (33,6-91,9)	64,6 (21,4-212,7)	0,146
SAH (nmol/l)	12,0 (7,9-16,4)	9,2 (6,2-11,9)	0,001
SAM (nmol/l)	91 (71-107)	85 (70-124)	0,709
SAM/SAH-Quotient	8,0 (5,4-11,4)	10,0 (6,9-14,0)	0,004
Vitamin D (ng/ml)*	26,7 (11,5-37,4); (n=16)	16,1 (5,3-38,1); (n=11)	0,348
BAP (U/l)	72 (31-123)	123 (42-216)	0,001
TRAP5b ((U/l)	5,4 (2,0-11,2)	10,0 (3,2-17,0)	0,002
Urin-DPD(nmol)/Kreatinin(mmol)	17,9 (8,4-30,3)	22,9 (12,7-32,7)	0,129
PTH (pg/ml)	23,0 (9,1-42,5)	26,0 (14,1-64,0)	0,239

Werte sind als Median (10.-90. Perzentile) angegeben. P-Werte nach Mann-Whitney-U-Test. *Anzahl der Probanden für die Messung der Vitamin D-Konzentration: M.Crohn: n=16; Zöliakie: n=11

Bei den Probanden mit M. Crohn und den Probanden mit Zöliakie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen hohem Methylierungsindex (großer SAM/SAH-Quotient) und den BAP-Konzentrationen ($r=0,381$; $p=0,012$) (Abbildung 14).

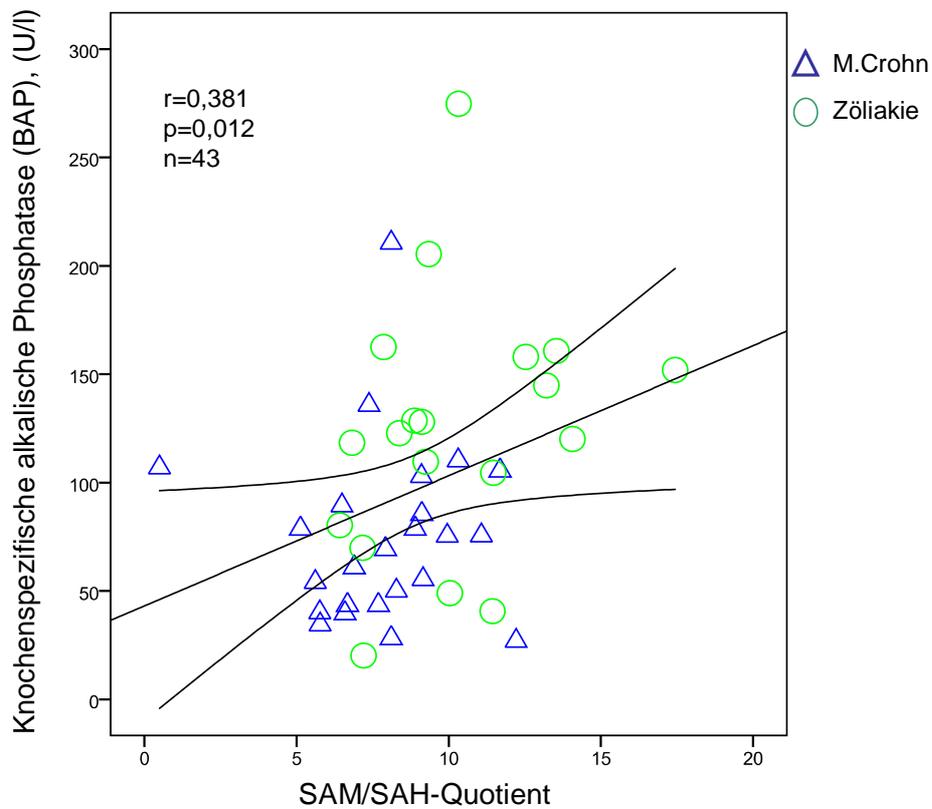


Abb.14: Korrelation zwischen dem SAM/SAH-Quotienten und BAP (M.Crohn und Zöliakie). r: Korrelationskoeffizient nach Spearman Rho-Test.

Neben dem Methylierungsindex stand auch der CRP-Wert mit der BAP-Konzentration in Zusammenhang. Bei Betrachtung der Patientengruppen (M. Crohn, Zöliakie) beobachtete man eine negative Korrelation zwischen der CRP-Konzentration und der BAP-Konzentration (Abbildung 15).

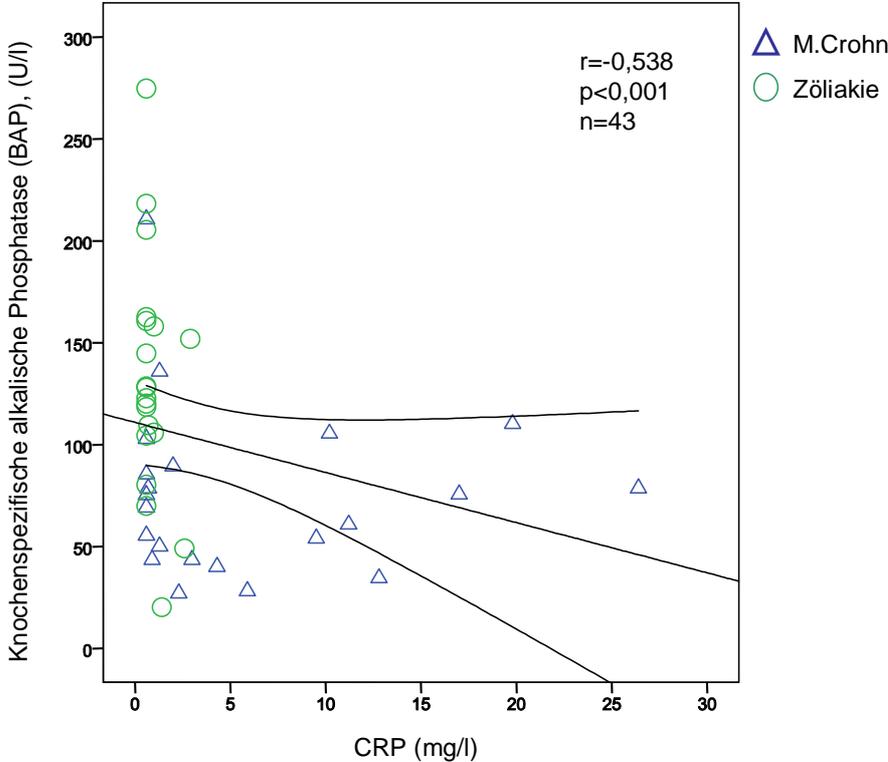


Abb.15: Korrelation zwischen CRP und BAP (M.Crohn und Zöliakie).
r: Korrelationskoeffizient nach Spearman Rho-Test.

Tabelle 19 stellt Parameter des Vitamin- und des Knochenstoffwechsels von männlichen und weiblichen Probanden der Kontrollgruppe gegenüber. Wie zu erwarten, unterschieden sich die Hb-Konzentrationen von männlichen und weiblichen Kontrollen signifikant ($p < 0,001$). Die männlichen Probanden hatten signifikant höhere SAH-Konzentrationen als die weiblichen Probanden (9,6 nmol/l vs. 6,8 nmol/l; $p = 0,003$). Der SAM/SAH-Quotient war bei den männlichen Kontrollen signifikant niedriger als bei den weiblichen ($p = 0,009$). Die Konzentrationen der Metabolite tHcy, Cys und MMA zeigten ebenso wie die Konzentrationen von Vitamin B12 und holoTC keinen signifikanten geschlechterspezifischen Unterschied. Die Parameter des Knochenstoffwechsels (BAP, TRAP5b, PTH) unterschieden sich nicht signifikant zwischen der männlichen und der weiblichen Kontrollgruppe.

Tab.19 Geschlechtervergleich klinischer Merkmale und der Vitamin- und Knochenmarker in der Kontrollgruppe

	männlich	weiblich	P(männlich/weiblich)
Alter (Jahre)	14,0 (6,7-17,3)	12,5 (5,5-16,5)	0,318
Body mass index	18,7 (13,0-20,7)	19,5 (16,0-33,0)	0,121
Kreatinin (mg/dl)	0,56 (0,25-0,97)	0,59 (0,38-0,78)	0,547
Hb (g/dl)	13,8 (13,3-16,0)	13,2 (10,9-14,3)	<0,001
tHcy ($\mu\text{mol/l}$)	9,8 (4,0-18,0)	9,3 (4,4-16,2)	0,935
Cys (nmol/l)	159 (84-396)	147 (89-288)	0,502
MMA (nmol/l)	201 (109-267)	184 (93-355)	0,700
Vitamin B12 _{gesamt} (pg/ml)	409 (309-967)	449 (329-894)	0,544
holoTC (pmol/l)	57,8 (32,2-107,6)	46,5 (22,4-113,4)	0,237
SAH (nmol/l)	9,6 (7,0-20,4)	6,8 (5,1-12,0)	0,003
SAM (nmol/l)	83,7 (68,9-104,9)	80,0 (63,6-99,9)	0,183
SAM/SAH-Quotient	9,4 (3,4-12,4)	11,4 (8,0-15,1)	0,009
BAP (U/l)	114 (57-165)	78 (31-187)	0,183
TRAP5b (U/l)	9,6 (2,4-21,1)	6,3 (1,7-14,3)	0,321
PTH (pg/ml)	22,8 (11,3-52,1)	23,4 (10,4-54,8)	0,677

Werte sind als Median (10.-90. Perzentile) angegeben. P-Werte nach Mann-Whitney-U-Test. tHcy: Gesamthomocystein; Cys: Cystathion; MMA: Methylmalonsäure; holoTC: holo Transcobalamin; SAH: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin; BAP: knochenspezifische alkalische Phosphatase; TRAP5b: Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b; PTH: Parathormon.

4. Diskussion

Pubertät und Adoleszenz stellen einen wichtigen Zeitraum für die Knochenentwicklung dar. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen können bei Kindern und Jugendlichen als Störfaktoren in diesem Zeitraum einen negativen Einfluss auf den Knochen haben. Die Rolle der D- und B-Vitamine ist in diesem Zusammenhang noch nicht eindeutig geklärt.

In der aktuellen Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Vitamin D, dem C₁-Stoffwechsel und dem Knochenstoffwechsel bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 3-18 Jahren untersucht. Obwohl bei keinem der Probanden ein Vitamin B12-Mangel festgestellt wurde, waren höhere Vitamin B12-Konzentrationen mit einem höheren Methylierungsindex (SAM/SAH-Quotient) assoziiert. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Methylierungsindex und dem Osteoblastenmarker BAP und eine negative Korrelation zwischen CRP und BAP. Wir haben einen geschlechterspezifischen Unterschied in Bezug auf den Methylierungsindex mit höheren SAM/SAH-Quotienten in der Gruppe der weiblichen Probanden beobachtet.

In der aktuellen Studie beobachteten wir höhere SAH-Konzentrationen und SAM/SAH-Quotienten in der M. Crohn-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Zöliakie-Gruppe sowie eine positive Korrelation zwischen dem SAM/SAH-Quotienten und der BAP-Konzentration im Serum. SAH inhibiert die Methylierungskapazität des SAM. Hohe SAH-Konzentrationen und ein daraus resultierender niedriger SAM/SAH-Quotient zeigen eine reduzierte Methylierungskapazität an. Frühere Studien haben gezeigt, dass DNA-Methylierung und -Demethylierung wichtige Regulatoren der Genexpression im Rahmen der Osteoblastendifferenzierung sind. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Delgado-Calle *et al.*, die zeigte, dass eine Abnahme der DNA-Methylierung zu einer erhöhten Osteoblastenaktivität mit vermehrter Expression von alkalischer Phosphatase in Osteoblasten führte (41). Diese Ergebnisse scheinen zunächst im Gegensatz zu unseren Beobachtungen zu stehen, dass ein niedriger Methylierungsindex mit niedrigen BAP-Konzentrationen assoziiert ist. Eine Studie von Vaes *et al.* (126) zeigte Ergebnisse, die mit unseren Beobachtungen vereinbar sind. Sie haben gezeigt, dass die Hemmung der SAM-vermittelten Methylierung zur Aktivitätsminderung des für die Osteoblastendifferenzierung essentiellen Transkriptionsfaktors Runx2 führt und dadurch die Osteoblastendifferenzierung

hemmt (126). Die Aktivitätsminderung des Runx2 wird nicht durch Hemmung der Runx2-Genexpression über DNA-Hypomethylierung erreicht, sondern posttranskriptionell über Beeinflussung der Proteinmethylierung (126). In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen kann vermutet werden, dass ein Mangel an SAM als Methylgruppendonor nicht nur zur osteoblastenstimulierenden DNA-Hypomethylierung sondern auch zur osteoblastenhemmenden Proteinhypomethylierung führt und damit negative Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel haben kann. In weiteren Studien sollte diese Hypothese und die Frage, ob durch Erhöhen des Methylierungsindex eine Verbesserung der Osteoblastenfunktion erreicht werden kann, weiter untersucht werden.

SAH und SAM sind Bestandteile des C₁-Stoffwechsels (Abb. 11) und stehen in Zusammenhang mit tHcy. Störungen der Methylierungskapazität stehen möglicherweise in Zusammenhang mit Veränderungen der tHcy-Konzentration. Eine HHcy, infolge derer der Reaktionsweg zwischen Hcy und SAH verstärkt zugunsten von SAH abläuft, kann verschiedene Ursachen haben. Das für die Reaktion von Hcy zu Methionin benötigte Enzym Methioninsynthase ist Vitamin B12-abhängig (Abb.11), so dass ein Mangel an Vitamin B12 zu einer verminderten Aktivität der Methioninsynthase und damit einer Akkumulation von tHcy führen kann. In der aktuellen Studie wurden bei einer Erhöhung des SAH normale Vitamin B12- und tHcy-Konzentrationen gemessen. In früheren Studien hat man auch erhöhte SAH-Konzentrationen bei normalen tHcy-Konzentrationen beobachtet. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Kerins *et al.* mit kardiovaskulären Patienten (64). Es zeigte sich in unserer Studie jedoch in der Patientengruppe (M. Crohn, Zöliakie) eine positive Korrelation zwischen dem SAM/SAH-Quotienten und der Vitamin B12-Konzentration im Serum (Abb. 15), was einen Hinweis darauf geben könnte, dass höhere Vitamin B12-Konzentrationen die Lieferung von Methylgruppen unterstützen, auch wenn Vitamin B12 und tHcy im Normalbereich lagen. Das sollte in weiteren Studien untersucht werden.

In einer Studie von Green *et al.* mit 276 älteren gesunden Probanden (>= 65 Jahre) ohne Vitamin B12-Mangel führte die tägliche Gabe von Folat (1 mg), Vitamin B12 (500 µg) und Vitamin B6 (10 mg) zu einer Senkung der tHcy-Konzentration, jedoch nicht zu einer Veränderung der SAM-, SAH-Konzentrationen und des SAM/SAH-Quotienten (46). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Gabe von B-Vitaminen möglicherweise keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die

Methylierungskapazität hat. Im Rahmen der „Singapore Chinese Health Study“ wurden Zusammenhänge zwischen verschiedenen Bestandteilen des C₁-Stoffwechsels untersucht und es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Betain und SAM (59). Möglicherweise sind Betain und seine Vorstufe Cholin alternative Ansatzpunkte im C₁-Stoffwechsel, über die eine Beeinflussung von SAM und SAH möglich ist. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Möglicherweise gibt es andere Faktoren, die die Methylierungskapazität beeinflussen. In unserer Studie zeigte sich im Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden ein signifikanter Unterschied für SAH und den SAM/SAH-Quotienten mit höheren SAH-Konzentrationen und niedrigeren SAM/SAH-Quotienten der männlichen Probanden. In einer Studie von King *et al.* mit 581 gesunden Probanden zwischen 20 und 50 Jahren korrelierten sowohl hohe SAH-Konzentrationen als auch niedrige SAM/SAH-Quotienten mit höheren Kreatininkonzentrationen und männlichem Geschlecht, es zeigte sich aber keine Korrelation zwischen SAH und Vitamin B12 und Folat (65). Die übereinstimmenden Ergebnisse der beiden Studien lassen vermuten, dass sich die Methylierungskapazität zwischen den Geschlechtern unterscheidet und Frauen im Vergleich zu Männern möglicherweise eine höhere Methylierungskapazität aufweisen.

De Laet *et al.* fanden in einer Studienpopulation von 647 gesunden Kindern zwischen fünf und 19 Jahren eine mittlere tHcy-Konzentration von 7,4 µmol/l und beobachteten bei den postpubertären Jugendlichen höhere tHcy-Konzentrationen bei den Jungen als bei den Mädchen, jedoch keinen geschlechterspezifischen Unterschied bei den unter 15 Jährigen (25). In unserer Studie lagen die tHcy-Konzentrationen in einem ähnlichen Bereich mit 7,6 µmol/l in der M. Crohn-Gruppe und 9,8 µmol/l in der Kontrollgruppe. Das mediane Alter lag in der aktuellen Studie bei 13,5 Jahren. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der tHcy-Konzentration zwischen den Geschlechtern. Geht man davon aus, dass die Sexualhormone eine Rolle in der geschlechterspezifischen Differenz der tHcy-Werte spielen, so ist es wahrscheinlich, dass dieser Unterschied erst im Pubertätsalter zum Tragen kommt, wenn der Einfluss der Sexualhormone zunimmt. Bei weiterer Beobachtung könnte möglicherweise mit zunehmendem Alter und pubertärem Entwicklungsstand der Probanden auch in unserer Studienpopulation ein Unterschied der tHcy-Konzentrationen zwischen Jungen und Mädchen auftreten.

Wir beobachteten in unserer Studie das parallele Auftreten von niedrigeren BAP-Konzentrationen im Serum und niedrigen TRAP5b-Konzentrationen in der Gruppe der M. Crohn-Patienten gegenüber der Vergleichsgruppe. Die niedrigen Konzentrationen von Osteoblasten- und Osteoklastenmarkern sprechen dafür, dass der Knochenstoffwechsel insgesamt, also Knochenaufbau und -resorption, gegenüber der Vergleichsgruppe vermindert ist. Sylvester *et al.* haben bei Untersuchungen mit neu diagnostizierten pädiatrischen M. Crohn-Patienten ebenfalls eine gleichförmige Entwicklung von Markern für Knochenaufbau und -resorption beobachtet, mit niedrigeren Konzentrationen von Knochenaufbau- und Knochenresorptionsmarkern bei M. Crohn-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (122). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Knochen-Turnover bei M. Crohn-Patienten, zumindest zum Zeitpunkt der Diagnose, gehemmt ist. Zur morphologischen Anpassung des Knochens an die gegebenen mechanischen Anforderungen findet ständig Remodelling statt. Beim Remodelling sind Osteoblasten und Osteoklasten gleichermaßen beteiligt. Es besteht ein komplexes Zusammenspiel der beiden Zelltypen. Durch die gegenseitige Beeinflussung von Osteoblasten und Osteoklasten wirken sich Veränderungen in der Funktionsfähigkeit des einen Zelltyps möglicherweise auch auf die Funktion des anderen Zelltyps aus. Durch das verminderte Remodelling wird die Fähigkeit des Knochens, sich an unterschiedliche Belastungen anzupassen, eingeschränkt und es kommt zu einer Beeinträchtigung der Knochenqualität und möglicherweise zu einer Erhöhung der Frakturgefährdung.

Im weiteren Verlauf des M. Crohn entwickelt sich möglicherweise ein Ungleichgewicht von Knochenresorption und -formation zu Gunsten der Knochenresorption, was einen verstärkten Knochenabbau und eine Abnahme der Knochenmasse zur Folge hätte. Bischoff *et al.* beobachteten bei erwachsenen M. Crohn-Patienten niedrige Knochenaufbaumarker bei gleichzeitig erhöhten Markern der Knochenresorption (10). In über einen längeren Zeitraum angelegten Studien sollte die längerfristige Entwicklung des Knochenstoffwechsels bei Jugendlichen und Erwachsenen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet werden, um längerfristig Osteoporoserisiko und Frakturgefährdung beurteilen zu können.

Der Knochenstoffwechsel ist ein komplexes Geschehen, auf das viele verschiedene Faktoren Einfluss nehmen können. Neben Störungen des C₁-Stoffwechsels gibt es weitere mögliche Ursachen eines gestörten

Knochenstoffwechsels bei Patienten mit M. Crohn. In unserem Kollektiv zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der CRP-Konzentration im Serum und der BAP-Konzentration bei höheren CRP-Konzentrationen der M. Crohn-Patienten gegenüber der Vergleichsgruppe. In früheren Studien wurde bereits eine hohe Krankheitsaktivität als mögliche Ursache eines gestörten Knochenstoffwechsels bei M. Crohn untersucht. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Thayu *et al.*, die bei pädiatrischen M. Crohn-Patienten eine negative Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und dem Osteoblastenmarker BAP sowie einen Anstieg der BAP-Konzentrationen nach Therapie mit dem TNF- α -Antagonisten Infliximab zeigte (123). Das lässt vermuten, dass TNF- α einen negativen Einfluss auf die Osteoblastenaktivität hat, der durch Infliximab abgemildert wird. In einer Studie von Sánchez *et al.* zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der CRP-Konzentration im Serum und TRAP, einem Marker der Knochenresorption (111). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das entzündliche Geschehen bei M. Crohn die Knochenresorption fördert und dadurch zu einer Verschlechterung der Knochenqualität führt. Die Hemmung der Entzündungsaktivität, zum Beispiel durch Substanzen wie Infliximab, ist möglicherweise ein wichtiger Schritt, um die Osteoblastenaktivität und damit auch die Knochenqualität bei M. Crohn-Patienten zu verbessern.

Das PTH ist ebenfalls ein wichtiger Einflussfaktor auf den Knochenstoffwechsel. In einer Studie zeigte ein Vergleich von Patienten mit Hyperparathyreoidismus und Patienten mit Hypoparathyreoidismus und gesunden Kontrollen höhere Knochendichte-Werte bei niedrigem PTH (Hypoparathyreoidismus und gesunden Kontrollen) als bei Patienten mit hohem PTH (20). Diese Ergebnisse weisen auf einen katabolen Einfluss des PTH auf den Knochen hin. In der aktuellen Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der PTH-Werte zwischen M. Crohn- und Kontrollgruppe und die PTH-Konzentration lag bei allen Probanden im Normalbereich. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das PTH bei M. Crohn-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen keine hervorgehobene Bedeutung für den Knochenstoffwechsel hat.

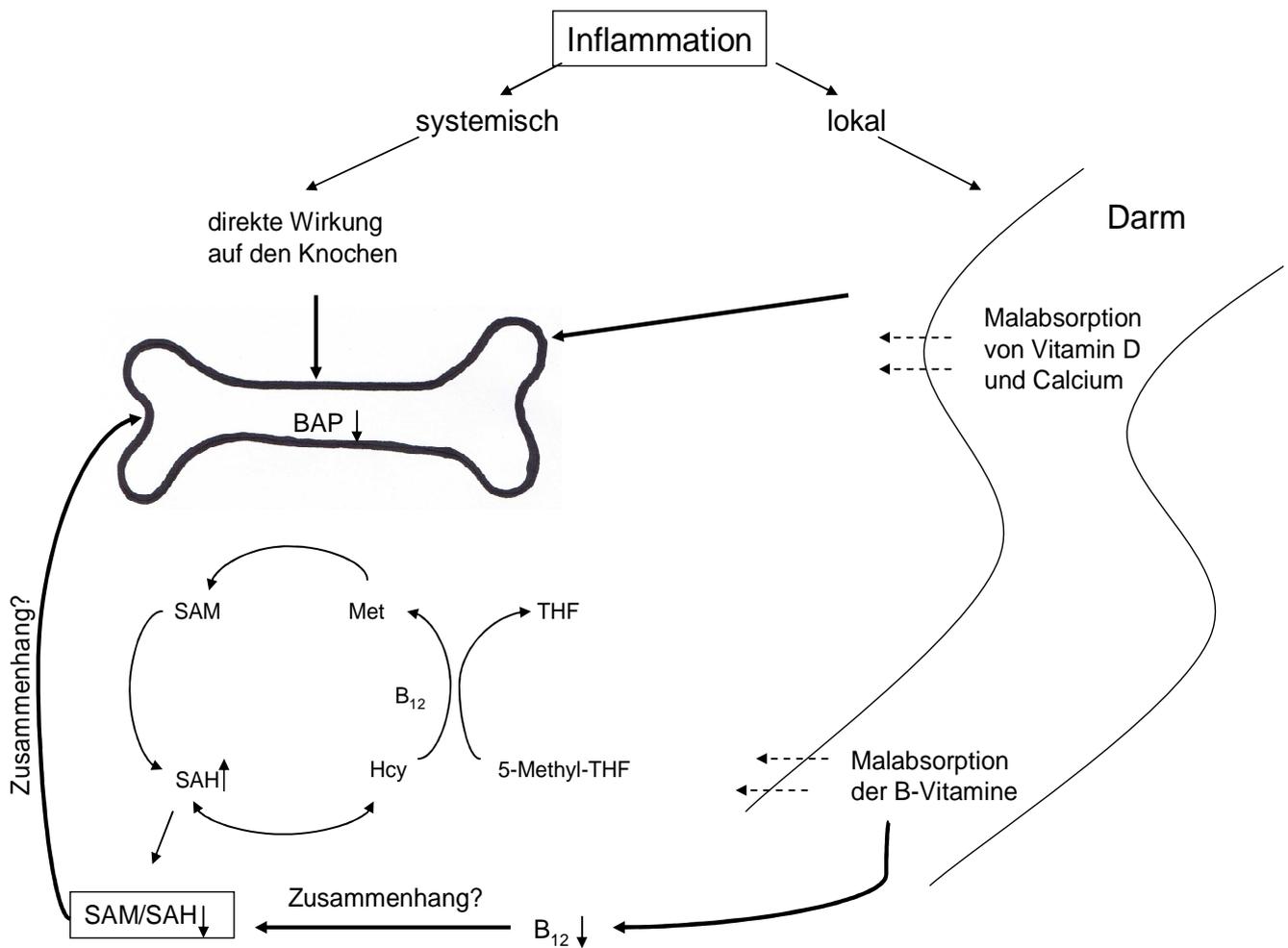


Abb.16 Einflüsse auf die Osteoblastenaktivität bei M. Crohn

Die negative Korrelation zwischen CRP und BAP in unserem M. Crohn-Kollektiv sowie die Studien von Sánchez *et al* (111) und Tayu *et al* (123) lassen eine direkte Wirkung der systemischen Inflammation auf den Knochen bei M. Crohn vermuten. Durch die lokale Inflammation im Darm kommt es zur Malabsorption von Calcium, Vitamin D und den B-Vitaminen. Ein Mangel an Calcium und Vitamin D hat einen negativen Einfluss auf den Knochen. In der aktuellen Studie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen B12 und dem SAM/SAH-Quotienten, die möglichen Zusammenhänge sind noch offen. In der aktuellen Studie wurde eine positive Korrelation zwischen niedrigem Methylierungsindex und BAP beobachtet. Untersuchungen von Vaes *et al* (126) lassen vermuten, dass es möglicherweise einen kausalen Zusammenhang zwischen der Methylierungskapazität und der Osteoblastenaktivität gibt. BAP: knochenspezifische alkalische Phosphatase; Hcy: Homocystein; SAH: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin; Met: Methionin; THF: Tetrahydrofolat; B₁₂: Vitamin B12

In unserer Studie fanden wir signifikant höhere Vitamin D-Konzentrationen in der Gruppe der M. Crohn-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe und alle in der Kontrollgruppe ohne Supplementation gemessenen Vitamin D-Konzentrationen lagen unterhalb 30 ng/ml, im Bereich einer unzureichenden Vitamin D-Versorgung. Auch unter Ausschluss der vier supplementierten M. Crohn-Patienten blieb die Signifikanz erhalten. Frühere Studien haben gezeigt, dass es bei Kindern mit CED häufig zu einem Mangel an Vitamin D kommt. Ein Beispiel dafür ist eine Studie von Pappa *et al.*, die bei pädiatrischen CED-Patienten eine Vitamin D-Mangelprävalenz von 34,6 % zeigte, mit höheren Vitamin D-Konzentrationen bei den Patienten mit Vitamin D-Supplementation (99). Möglicherweise lassen sich die von uns beobachteten höheren Vitamin D-Konzentrationen in der M. Crohn-Gruppe zum Teil durch Vitamin D-Supplementation und eine regelmäßige Überwachung der Vitamin D-Konzentration bei diesem Kollektiv der M. Crohn-Patienten erklären.

Eine mangelhafte Vitamin D-Versorgung der gesunden Kontrollgruppe ist eine weitere mögliche Ursache für die signifikanten Unterschiede in der Vitamin D-Versorgung zwischen M. Crohn-Patienten und Kontrollen. Ein Vitamin D-Mangel ist in unseren Breiten unter gesunden Adoleszenten weit verbreitet. Dies zeigte zum Beispiel eine europaweite Studie mit Jugendlichen, bei der über 40 % der untersuchten Jugendlichen Vitamin D-Konzentrationen < 20 ng/ml und damit einen Vitamin D-Mangel aufwiesen (44). Ursache für die hohe Vitamin D-Mangelprävalenz ist, neben der (für die Vitamin D-Bildung in der Haut notwendige) zu geringen Sonneneinstrahlung in unseren Breiten, die zu geringe Aufnahme von Vitamin D mit der Nahrung. Die vom Robert Koch-Institut und der Universität Paderborn durchgeführte EsKiMo-Studie hat gezeigt, dass die Vitamin D-Zufuhr durch die Nahrung bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 6-17 Jahren unterhalb den Empfehlungen der „Deutschen Gesellschaft für Ernährung“ lag (82). Im Hinblick auf die möglichen negativen Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel sollte sowohl bei gesunden Kindern als auch bei Kindern mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D geachtet werden.

Im Hinblick auf den Vitamin D-Status beobachtet man jahreszeitliche Schwankungen mit höheren Werten im Sommer als im Winter. In einer Studie mit 125 Probanden zwischen 20-60 Jahren zeigten sich die höchsten Vitamin D-Werte im September (28,4 ng/ml) und die niedrigsten Werte im Februar (18,3 ng/ml) (139). Bei der Betrachtung der Vitamin D-Werte wurde in der aktuellen Studie nicht unterschieden, ob die Werte im Sommer oder Winter erhoben wurden. Die Rekrutierung von Patienten und Kontrollen erfolgte jedoch parallel und in einem gleichmäßig über die Jahreszeiten verteilten Zeitraum, so dass der signifikante Unterschied der Vitamin D-Konzentration zwischen M. Crohn-Patienten und Kontrollgruppe nicht durch unterschiedliche Rekrutierungszeiträume erklärt werden kann.

In der Gruppe der Zöliakie-Patienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe bezüglich der gemessenen Vitamine und des C₁-Stoffwechsels. In der aktuellen Studie hielten alle beteiligten Zöliakie-Patienten eine GFD ein. In früheren Studien hat man beobachtet, dass die Durchführung einer GFD zu einer Normalisierung des C₁-Stoffwechsels führt. Ein Beispiel dafür ist die Studie von Dickey *et al.*, die im Vergleich zwischen unbehandelten Zöliakie-Patienten und solchen unter GFD niedrigere tHcy-Konzentrationen und höhere Folatkonzentrationen bei Zöliakie-Patienten unter GFD als bei unbehandelten Zöliakie-Patienten zeigte (29). Bei den Patienten unter GFD mit erholter Dünndarmvillistruktur zeigten sich die Konzentrationen von tHcy und Folat im Normbereich (29). Diese Ergebnisse unterstreichen, wie wichtig die Einhaltung der GFD für Zöliakie-Patienten ist. Die GFD führt zu einer Verbesserung und bei manchen Patienten zu einer Normalisierung der Darmschleimhautstruktur, wodurch eine ausreichende Resorption von Nährstoffen und Vitaminen möglich ist.

In der aktuellen Studie wurden alle Zöliakie-Patienten unter strikter GFD geführt und zeigten keine signifikant niedrigere Knochenaufbaumarker (BAP) und keine erhöhten Marker der Knochenresorption (TRAP5b, DPD) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Frühere Studien zeigten bereits, dass das strikte Einhalten der GFD ein wichtiger Einflussfaktor auf den Knochenstoffwechsel von Zöliakie-Patienten ist. Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Blazina *et al.* mit pädiatrischen Zöliakie-Patienten, in der die Kinder und Jugendlichen unter strikter GFD eine höhere Knochendichte aufwiesen als die Probanden ohne strikte GFD (12). Unter der Einhaltung einer GFD scheint der Knochenstoffwechsel von Zöliakie-Patienten im

Vergleich zu altersentsprechenden gesunden Kontrollprobanden nicht durch die Zöliakie beeinträchtigt zu sein. Diese Ergebnisse unterstreichen wiederum, wie wichtig die Einhaltung der GFD für Zöliakie-Patienten ist.

Die wichtigsten Ergebnisse im Überblick:

1. Obwohl bei keinem der Probanden ein Vitamin B12-Mangel beobachtet wurde, waren in der Patientengruppe (M.Crohn, Zöliakie) höhere Vitamin B12-Konzentrationen mit einem höheren Methylierungsindex (SAM/SAH-Quotient) assoziiert.
2. Es bestand eine positive Korrelation zwischen dem Methylierungsindex (SAM/SAH-Quotient) und BAP in der Patientengruppe (M.Crohn, Zöliakie).
3. Es bestand eine positive Korrelation zwischen CRP und BAP in der Patientengruppe (M.Crohn, Zöliakie).
4. Es zeigte sich ein geschlechterspezifischer Unterschied im Methylierungsindex mit höheren SAM/SAH-Quotienten in der Gruppe der weiblichen Kontrollprobanden im Vergleich zu den männlichen Kontrollprobanden.

Limitationen der Studie/ weitere Studien:

1. Alle Probanden befanden sich in der Pubertät. Möglicherweise beeinflusst die Pubertät durch starkes Wachstum und hormonelle Umstellungen den Knochenstoffwechsel in einem Maß, das zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hat. Eine Studie mit Erwachsenen Probanden schließt den Einflussfaktor Pubertät aus.
2. Die Patienten mit Zöliakie und M. Crohn hatten eine kurze Krankheitsdauer unter 10 Jahre, im Median unter 2 Jahre. Nach dieser Krankheitsdauer waren die Auswirkungen der Erkrankung auf den Vitamin- und Knochenstoffwechsel evtl. noch nicht vollständig abzuschätzen. Es sollte eine Follow-up-Studie zur längerfristigen Entwicklung der Probanden mit M. Crohn und Zöliakie durchgeführt werden.
3. In diesem Patientenkollektiv (M. Crohn, Zöliakie) wurden engmaschige Kontrollen des Vitaminstatus durchgeführt und die Patienten bei Bedarf supplementiert, was möglicherweise die Ergebnisse der Vitaminkonzentrationen verfälscht hat. Bei folgenden Studien sollten nur Patienten ohne Supplementation eingeschlossen werden.

4. Die Korrelationen bezüglich SAM und dem SAM/SAH-Quotient konnten nicht durch einen Vitamin B12-Mangel oder eine HHcy erklärt werden. Folat-Konzentrationen sowie Betain/Cholin-Konzentrationen wurden in der aktuellen Studie nicht untersucht und damit wurden Teile des C₁-Stoffwechsels nicht berücksichtigt. Möglicherweise bieten Folat und Betain/Cholin Ansatzpunkte zur Beeinflussung des C₁-Stoffwechsels. Diesbezüglich sollten weitere Studien durchgeführt werden.
5. Es gibt Hinweise darauf, dass ein Mangel an Methylgruppen über die Beeinflussung epigenetischer Mechanismen möglicherweise die Osteoblastendifferenzierung beeinflusst. Diese Hypothese sollte in weiteren Studien überprüft werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Arnott,I.D., Landers,C.J., Nimmo,E.J., Drummond,H.E., Smith,B.K., Targan,S.R., & Satsangi,J. (2004) Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am.J Gastroenterol.*, **99**, 2376-2384.
2. Bandarian,V. & Matthews,R.G. (2001) Quantitation of rate enhancements attained by the binding of cobalamin to methionine synthase. *Biochemistry*, **40**, 5056-5064.
3. Baptista,M.L., Koda,Y.K., Mitsunori,R., Nisihara, & Ioshii,S.O. (2005) Prevalence of celiac disease in Brazilian children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, **41**, 621-624.
4. Bar-Meir,S., Chowers,Y., Lavy,A., Abramovitch,D., Sternberg,A., Leichtmann,G., Reshef,R., Odes,S., Moshkovitz,M., Bruck,R., Eliakim,R., Maoz,E., & Mittmann,U. (1998) Budesonide versus prednisone in the treatment of active Crohn's disease. The Israeli Budesonide Study Group. *Gastroenterology*, **115**, 835-840.
5. Bardella,M.T., Elli,L., De,M.S., Floriani,I., Torri,V., & Piodi,L. (2009) Autoimmune disorders in patients affected by celiac sprue and inflammatory bowel disease. *Ann.Med*, **41**, 139-143.
6. Bardella,M.T., Fredella,C., Saladino,V., Trovato,C., Cesana,B.M., Quatrini,M., & Prampolini,L. (2005) Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms. *Scand J Gastroenterol.*, **40**, 15-19.
7. Bernstein,C.N., Blanchard,J.F., Kliewer,E., & Wajda,A. (2001) Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, **91**, 854-862.
8. Bethune,M.T., Siegel,M., Howles-Banerji,S., & Khosla,C. (2009) Interferon-gamma released by gluten-stimulated celiac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **329**, 657-668.
9. Biagi,F., Luinetti,O., Campanella,J., Klersy,C., Zambelli,C., Villanacci,V., Lanzini,A., & Corazza,G.R. (2004) Intraepithelial lymphocytes in the villous tip: do they indicate potential coeliac disease? *J Clin Pathol.*, **57**, 835-839.
10. Bischoff,S.C., Herrmann,A., Goke,M., Manns,M.P., von zur,M.A., & Brabant,G. (1997) Altered bone metabolism in inflammatory bowel disease. *Am.J Gastroenterol.*, **92**, 1157-1163.
11. Bjorkegren,K. & Svardsudd,K. (2003) Reported symptoms and clinical findings in relation to serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine among elderly Swedes: a population-based study. *J Intern.Med*, **254**, 343-352.
12. Blazina,S., Bratanic,N., Campa,A.S., Blagus,R., & Orel,R. (2010) Bone mineral density and importance of strict gluten-free diet in children and adolescents with celiac disease. *Bone*, **47**, 598-603.

13. Blumer,M.J., Longato,S., Richter,E., Perez,M.T., Konakci,K.Z., & Fritsch,H. (2005) The role of cartilage canals in endochondral and perichondral bone formation: are there similarities between these two processes? *J Anat.*, **206**, 359-372.
14. Bousvaros,A., Antonioli,D.A., Colletti,R.B., Dubinsky,M.C., Glickman,J.N., Gold,B.D., Griffiths,A.M., Jevon,G.P., Higuchi,L.M., Hyams,J.S., Kirschner,B.S., Kugathasan,S., Baldassano,R.N., & Russo,P.A. (2007) Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, **44**, 653-674.
15. Brady,J., Wilson,L., McGregor,L., Valente,E., & Orning,L. (2008) Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem*, **54**, 567-573.
16. Bridger,S., Lee,J.C., Bjarnason,I., Jones,J.E., & Macpherson,A.J. (2002) In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut*, **51**, 21-25.
17. Brophy,K., Ryan,A.W., Thornton,J.M., Abuzakouk,M., Fitzgerald,A.P., McLoughlin,R.M., O'Morain,C., Kennedy,N.P., Stevens,F.M., Feighery,C., Kelleher,D., & McManus,R. (2006) Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes Immun.*, **7**, 19-26.
18. Cazzato,I.A., Cammarota,G., Nista,E.C., Cesaro,P., Sparano,L., Bonomo,V., Gasbarrini,G.B., & Gasbarrini,A. (2007) Diagnostic and therapeutic impact of double-balloon enteroscopy (DBE) in a series of 100 patients with suspected small bowel diseases. *Dig.Liver Dis.*, **39**, 483-487.
19. Cellier,C., Delabesse,E., Helmer,C., Patey,N., Matuchansky,C., Jabri,B., Macintyre,E., Cerf-Bensussan,N., & Brousse,N. (2000) Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet*, **356**, 203-208.
20. Chen,Q., Kaji,H., Iu,M.F., Nomura,R., Sowa,H., Yamauchi,M., Tsukamoto,T., Sugimoto,T., & Chihara,K. (2003) Effects of an excess and a deficiency of endogenous parathyroid hormone on volumetric bone mineral density and bone geometry determined by peripheral quantitative computed tomography in female subjects. *J Clin Endocrinol.Metab*, **88**, 4655-4658.
21. Chin,M.W., Mallon,D.F., Cullen,D.J., Olynyk,J.K., Mollison,L.C., & Pearce,C.B. (2009) Screening for coeliac disease using anti-tissue transglutaminase antibody assays, and prevalence of the disease in an Australian community. *Med J Aust.*, **190**, 429-432.
22. Colpaert,S., Vastraelen,K., Liu,Z., Maerten,P., Shen,C., Penninckx,F., Geboes,K., Rutgeerts,P., & Ceuppens,J.L. (2002) In vitro analysis of interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin-12 (IL-12) production and their effects in ileal Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw.*, **13**, 431-437.
23. Cuskelly,G.J., Stacpoole,P.W., Williamson,J., Baumgartner,T.G., & Gregory,J.F., III (2001) Deficiencies of folate and vitamin B(6) exert distinct effects on homocysteine, serine, and methionine kinetics. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab*, **281**, E1182-E1190.

24. Dambacher,J., Beigel,F., Zitzmann,K., De Toni,E.N., Goke,B., Diepolder,H.M., Auernhammer,C.J., & Brand,S. (2009) The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut*, **58**, 1207-1217.
25. De Laet,C., Wautrecht,J.C., Brasseur,D., Dramaix,M., Boeynaems,J.M., Decuyper,J., & Kahn,A. (1999) Plasma homocysteine concentration in a Belgian school-age population. *Am.J Clin Nutr.*, **69**, 968-972.
26. De,W.P., Tairou,F., Van Allen,M.I., Uh,S.H., Lowry,R.B., Sibbald,B., Evans,J.A., Van den Hof,M.C., Zimmer,P., Crowley,M., Fernandez,B., Lee,N.S., & Niyonsenga,T. (2007) Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N.Engl.J Med*, **357**, 135-142.
27. den Elzen,W.P., Westendorp,R.G., Frolich,M., de,R.W., Assendelft,W.J., & Gussekloo,J. (2008) Vitamin B12 and folate and the risk of anemia in old age: the Leiden 85-Plus Study. *Arch.Intern.Med*, **168**, 2238-2244.
28. Dickey,W., Hughes,D.F., & McMillan,S.A. (2000) Reliance on serum endomysial antibody testing underestimates the true prevalence of coeliac disease by one fifth. *Scand J Gastroenterol.*, **35**, 181-183.
29. Dickey,W., Ward,M., Whittle,C.R., Kelly,M.T., Pentieva,K., Horigan,G., Patton,S., & McNulty,H. (2008) Homocysteine and related B-vitamin status in coeliac disease: Effects of gluten exclusion and histological recovery. *Scand J Gastroenterol.*, **43**, 682-688.
30. Dieterich,W., Laag,E., Schopper,H., Volta,U., Ferguson,A., Gillett,H., Riecken,E.O., & Schuppan,D. (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, **115**, 1317-1321.
31. Dubinsky,M.C., Kugathasan,S., Mei,L., Picornell,Y., Nebel,J., Wrobel,I., Quiros,A., Silber,G., Wahbeh,G., Katzir,L., Vasiliauskas,E., Bahar,R., Otley,A., Mack,D., Evans,J., Rosh,J., Hemker,M.O., Leleiko,N., Crandall,W., Langton,C., Landers,C., Taylor,K.D., Targan,S.R., Rotter,J.I., Markowitz,J., & Hyams,J. (2008) Increased immune reactivity predicts aggressive complicating Crohn's disease in children. *Clin Gastroenterol.Hepatol.*, **6**, 1105-1111.
32. Dubner,S.E., Shults,J., Baldassano,R.N., Zemel,B.S., Thayu,M., Burnham,J.M., Herskovitz,R.M., Howard,K.M., & Leonard,M.B. (2009) Longitudinal assessment of bone density and structure in an incident cohort of children with Crohn's disease. *Gastroenterology*, **136**, 123-130.
33. Duchmann,R., May,E., Heike,M., Knolle,P., Neurath,M., & Meyer zum Buschenfelde,K.H. (1999) T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*, **44**, 812-818.
34. Duthie,S.J., Narayanan,S., Blum,S., Pirie,L., & Brand,G.M. (2000) Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr.Cancer*, **37**, 245-251.

35. Ezzat, Y. & Hamdy, K. (2010) The frequency of low bone mineral density and its associated risk factors in patients with inflammatory bowel diseases. *Int J Rheum. Dis.*, **13**, 259-265.
36. Falchuk, Z.M. & Strober, W. (1974) Gluten-sensitive enteropathy: synthesis of antigliadin antibody in vitro. *Gut*, **15**, 947-952.
37. Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R.B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P.H., Guandalini, S., Hill, I.D., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, S.S., Murray, J.A., & Horvath, K. (2003) Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch. Intern. Med.*, **163**, 286-292.
38. Foo, L.H., Zhang, Q., Zhu, K., Ma, G., Hu, X., Greenfield, H., & Fraser, D.R. (2009) Low vitamin D status has an adverse influence on bone mass, bone turnover, and muscle strength in Chinese adolescent girls. *J Nutr.*, **139**, 1002-1007.
39. Forwood, M.R., Baxter-Jones, A.D., Beck, T.J., Mirwald, R.L., Howard, A., & Bailey, D.A. (2006) Physical activity and strength of the femoral neck during the adolescent growth spurt: a longitudinal analysis. *Bone*, **38**, 576-583.
40. Fuss, I.J., Becker, C., Yang, Z., Groden, C., Hornung, R.L., Heller, F., Neurath, M.F., Strober, W., & Mannon, P.J. (2006) Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm. Bowel Dis.*, **12**, 9-15.
41. gado-Calle, J., Sanudo, C., Sanchez-Verde, L., Garcia-Renedo, R.J., Arozamena, J., & Riancho, J.A. (2011) Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*, **49**, 830-838.
42. Ge, Z.Z., Hu, Y.B., & Xiao, S.D. (2004) Capsule endoscopy in diagnosis of small bowel Crohn's disease. *World J Gastroenterol.*, **10**, 1349-1352.
43. Goerres, M.S., Meijer, J.W., Wahab, P.J., Kerckhaert, J.A., Groenen, P.J., Van Krieken, J.H., & Mulder, C.J. (2003) Azathioprine and prednisone combination therapy in refractory coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **18**, 487-494.
44. Gonzalez-Gross, M., Valtuena, J., Breidenassel, C., Moreno, L.A., Ferrari, M., Kersting, M., De, H.S., Gottrand, F., Azzini, E., Widhalm, K., Kafatos, A., Manios, Y., & Stehle, P. (2011) Vitamin D status among adolescents in Europe: the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence study. *Br J Nutr.*, 1-10.
45. goston-Coldea, L., Mocan, T., Seicean, A., Gatfosse, M., & Rosenstingl, S. (2010) The plasma homocysteine concentrations and prior myocardial infarction. *Rom. J Intern. Med.*, **48**, 65-72.
46. Green, T.J., Skeaff, C.M., McMahon, J.A., Venn, B.J., Williams, S.M., Devlin, A.M., & Innis, S.M. (2010) Homocysteine-lowering vitamins do not lower plasma S-adenosylhomocysteine in older people with elevated homocysteine concentrations. *Br J Nutr.*, **103**, 1629-1634.

47. Haapalahti,M., Kulmala,P., Karttunen,T.J., Paajanen,L., Laurila,K., Maki,M., Mykkanen,H., & Kokkonen,J. (2005) Nutritional status in adolescents and young adults with screen-detected celiac disease. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, **40**, 566-570.
48. Headstrom,P.D., Rulyak,S.J., & Lee,S.D. (2008) Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **14**, 217-223.
49. Herrmann,M., Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni G, Al-Marrawi F, Widmann T, Zallone A, Wildemann B, & Herrmann W (2007) Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone*, **41**, 584-591.
50. Herrmann,M., Widmann,T., Colaianni,G., Colucci,S., Zallone,A., & Herrmann,W. (2005) Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem*, **51**, 2348-2353.
51. Herrmann,W., Obeid R, Schorr H, Hübner U, Geisel,J., Sand-Hill,M., Nayyar A, & Herrmann M (2009) Enhanced bone metabolism in vegetarians - the role of vitamin B12 deficiency. *Clin.Chem.Lab.Med.*, **47**, 1381-1387.
52. Herrmann,W., Obeid,R., Schorr,H., & Geisel,J. (2003) Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med*, **41**, 1478-1488.
53. Herrmann,W., Schorr,H., Geisel,J., & Riegel,W. (2001) Homocysteine, cystathionine, methylmalonic acid and B-vitamins in patients with renal disease. *Clin Chem Lab Med*, **39**, 739-746.
54. Hjelt,K. & Krasilnikoff,P.A. (1990) The impact of gluten on haematological status, dietary intakes of haemopoietic nutrients and vitamin B12 and folic acid absorption in children with coeliac disease. *Acta Paediatr.Scand*, **79**, 911-919.
55. Holstein,J.H., Herrmann,M., Splett,C., Herrmann,W., Garcia,P., Histing,T., Graeber,S., Ong,M.F., Kurz,K., Siebel,T., Menger,M.D., & Pohlemann,T. (2009) Low serum folate and vitamin B-6 are associated with an altered cancellous bone structure in humans. *Am.J Clin Nutr.*, **90**, 1440-1445.
56. Holstein,J.H., Herrmann,M., Splett,C., Herrmann,W., Garcia,P., Histing,T., Klein,M., Kurz,K., Siebel,T., Pohlemann,T., & Menger,M.D. (2011) High bone concentrations of homocysteine are associated with altered bone morphology in humans. *Br J Nutr.*, **106**, 378-382.
57. Holstein,J.H., Herrmann,M., Splett,C., Herrmann,W., Garcia,P., Histing,T., Klein,M., Kurz,K., Siebel,T., Pohlemann,T., & Menger,M.D. (2011) High bone concentrations of homocysteine are associated with altered bone morphology in humans. *Br J Nutr.*, 1-5.
58. Hutchinson,J.M., West,N.P., Robins,G.G., & Howdle,P.D. (2010) Long-term histological follow-up of people with coeliac disease in a UK teaching hospital. *QJM.*, **103**, 511-517.
59. Inoue-Choi,M., Nelson,H.H., Robien,K., Arning,E., Bottiglieri,T., Koh,W.P., & Yuan,J.M. (2012) One-carbon metabolism nutrient status and plasma S-

- adenosylmethionine concentrations in middle-aged and older Chinese in Singapore. *Int J Mol Epidemiol.Genet.*, **3**, 160-173.
60. Iqbal,S.P., Kakepoto,G.N., & Iqbal,S.P. (2009) Vitamin B12 deficiency--a major cause of megaloblastic anaemia in patients attending a tertiary care hospital. *J Ayub.Med Coll.Abbottabad.*, **21**, 92-94.
 61. Jamma,S., Leffler,D.A., Dennis,M., Najarian,R.M., Schuppan,D.B., Sheth,S., & Kelly,C.P. (2011) Small intestinal release mesalamine for the treatment of refractory celiac disease type I. *J Clin Gastroenterol.*, **45**, 30-33.
 62. Jones,S., D'Souza,C., & Haboubi,N.Y. (2006) Patterns of clinical presentation of adult coeliac disease in a rural setting. *Nutr.J*, **5**, 24.
 63. Kaukinen,K., Collin,P., Laurila,K., Kaartinen,T., Partanen,J., & Maki,M. (2007) Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. *Scand J Gastroenterol.*, **42**, 1428-1433.
 64. Kerins,D.M., Koury,M.J., Capdevila,A., Rana,S., & Wagner,C. (2001) Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am.J Clin Nutr.*, **74**, 723-729.
 65. King,W.D., Ho,V., Dodds,L., Perkins,S.L., Casson,R.I., & Massey,T.E. (2012) Relationships among biomarkers of one-carbon metabolism. *Mol Biol.Rep.*, **39**, 7805-7812.
 66. Kirsch,S.H., Knapp,J.P., Geisel,J., Herrmann,W., & Obeid,R. (2009) Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci*, **877**, 3865-3870.
 67. Kroger,H., Kotaniemi,A., Kroger,L., & Alhava,E. (1993) Development of bone mass and bone density of the spine and femoral neck--a prospective study of 65 children and adolescents. *Bone Miner.*, **23**, 171-182.
 68. Kugathasan,S., Saubermann,L.J., Smith,L., Kou,D., Itoh,J., Binion,D.G., Levine,A.D., Blumberg,R.S., & Fiocchi,C. (2007) Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut*, **56**, 1696-1705.
 69. Kuloglu,Z., Kirsaciloglu,C.T., Kansu,A., Ensari,A., & Girgin,N. (2009) Celiac disease: presentation of 109 children. *Yonsei Med J*, **50**, 617-623.
 70. Kuwahara,E., Asakura,K., Nishiwaki,Y., Inoue,N., Watanabe,M., Hibi,T., & Takebayashi,T. (2012) Effects of family history on inflammatory bowel disease characteristics in Japanese patients. *J Gastroenterol*.
 71. Langhorst,J., Elsenbruch,S., Koelzer,J., Rueffer,A., Michalsen,A., & Dobos,G.J. (2008) Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am.J Gastroenterol.*, **103**, 162-169.

72. Le,B.N., Heresbach,D., Kerbaol,M., Caulet,S., Bretagne,J.F., Chaperon,J., Gosselin,M., & Ramee,M.P. (1995) Histological discrimination of idiopathic inflammatory bowel disease from other types of colitis. *J Clin Pathol.*, **48**, 749-753.
73. Lidums,I., Cummins,A.G., & Teo,E. (2011) The role of capsule endoscopy in suspected celiac disease patients with positive celiac serology. *Dig.Dis.Sci*, **56**, 499-505.
74. Lodes,M.J., Cong,Y., Elson,C.O., Mohamath,R., Landers,C.J., Targan,S.R., Fort,M., & Hershberg,R.M. (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest*, **113**, 1296-1306.
75. Loftus,C.G., Loftus,E.V., Jr., Harmsen,W.S., Zinsmeister,A.R., Tremaine,W.J., Melton,L.J., III, & Sandborn,W.J. (2007) Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **13**, 254-261.
76. Lowe,A.M., Roy,P.O., Poulin,M., Michel,P., Bitton,A., St-Onge,L., & Brassard,P. (2009) Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **15**, 429-435.
77. Maamar,M., Tazi-Mezalek,Z., Harmouche,H., Ammouri,W., Zahlane,M., Adnaoui,M., Aouni,M., Mohattane,A., & Maaouni,A. (2006) [Neurological manifestations of vitamin B12 deficiency: a retrospective study of 26 cases]. *Rev.Med Interne*, **27**, 442-447.
78. Manninen,P., Karvonen,A.L., Huhtala,H., Rasmussen,M., & Collin,P. (2010) The epidemiology of inflammatory bowel diseases in Finland. *Scand J Gastroenterol.*, **45**, 1063-1067.
79. Mantzaris,G.J., Christidou,A., Sfakianakis,M., Roussos,A., Koilakou,S., Petraki,K., & Polyzou,P. (2009) Azathioprine is superior to budesonide in achieving and maintaining mucosal healing and histologic remission in steroid-dependent Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **15**, 375-382.
80. Martinez,M.J., Ripolles,T., Paredes,J.M., Blanc,E., & Marti-Bonmati,L. (2009) Assessment of the extension and the inflammatory activity in Crohn's disease: comparison of ultrasound and MRI. *Abdom.Imaging*, **34**, 141-148.
81. Maurino,E., Capizzano,H., Niveloni,S., Kogan,Z., Valero,J., Boerr,L., & Bai,J.C. (1993) Value of endoscopic markers in celiac disease. *Dig.Dis.Sci*, **38**, 2028-2033.
82. Mensink,G.B., Bauch,A., Vohmann,C., Stahl,A., Six,J., Kohler,S., Fischer,J., & Hesecker,H. (2007) [EsKiMo - the nutrition module in the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt.Gesundheitsforschung.Gesundheitsschutz.*, **50**, 902-908.
83. Mora,S., Cafarelli,L., Erba,P., Puzzovio,M., Zamproni,I., Giacomet,V., & Vigano,A. (2009) Differential effect of age, gender and puberty on bone formation rate assessed by measurement of bone-specific alkaline phosphatase in healthy Italian children and adolescents. *J Bone Miner.Metab*, **27**, 721-726.

84. Morris,M.S., Jacques,P.F., Rosenberg,I.H., & Selhub,J. (2007) Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am.J Clin Nutr.*, **85**, 193-200.
85. Murch,S.H., Braegger,C.P., Walker-Smith,J.A., & MacDonald,T.T. (1993) Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*, **34**, 1705-1709.
86. Murray,J.A., Moore,S.B., Van Dyke,C.T., Lahr,B.D., Dierkhising,R.A., Zinsmeister,A.R., Melton,L.J., III, Kroning,C.M., El-Yousseff,M., & Czaja,A.J. (2007) HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease. *Clin Gastroenterol.Hepatol.*, **5**, 1406-1412.
87. Mustalahti,K., Catassi,C., Reunanen,A., Fabiani,E., Heier,M., McMillan,S., Murray,L., Metzger,M.H., Gasparin,M., Bravi,E., & Maki,M. (2010) The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann.Med*, **42**, 587-595.
88. Nilsson,O., Mitchum,R.D., Jr., Schrier,L., Ferns,S.P., Barnes,K.M., Troendle,J.F., & Baron,J. (2005) Growth plate senescence is associated with loss of DNA methylation. *J Endocrinol.*, **186**, 241-249.
89. Noguchi,E., Homma,Y., Kang,X., Netea,M.G., & Ma,X. (2009) A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat.Immunol.*, **10**, 471-479.
90. Norris,J.M., Barriga,K., Hoffenberg,E.J., Taki,I., Miao,D., Haas,J.E., Emery,L.M., Sokol,R.J., Erlich,H.A., Eisenbarth,G.S., & Rewers,M. (2005) Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA*, **293**, 2343-2351.
91. O'Sullivan,M., Nic,S.T., Cox,G., Healy,M., & O'Morain,C. (2008) High prevalence of vitamin D insufficiency in healthy Irish adults. *Ir.J Med Sci*, **177**, 131-134.
92. Obeid,R., Kasoha,M., Knapp,J.P., Kostopoulos,P., Becker,G., Fassbender,K., & Herrmann,W. (2007) Folate and methylation status in relation to phosphorylated tau protein(181P) and beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, **53**, 1129-1136.
93. Ogura,Y., Bonen,D.K., Inohara,N., Nicolae,D.L., Chen,F.F., Ramos,R., Britton,H., Moran,T., Karaliuskas,R., Duerr,R.H., Achkar,J.P., Brant,S.R., Bayless,T.M., Kirschner,B.S., Hanauer,S.B., Nunez,G., & Cho,J.H. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **411**, 603-606.
94. Orholm,M., Munkholm,P., Langholz,E., Nielsen,O.H., Sorensen,T.I., & Binder,V. (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N.Engl.J Med*, **324**, 84-88.
95. Osimani,A., Berger,A., Friedman,J., Porat-Katz,B.S., & Abarbanel,J.M. (2005) Neuropsychology of vitamin B12 deficiency in elderly dementia patients and control subjects. *J Geriatr.Psychiatry Neurol.*, **18**, 33-38.

96. Oyen,J., Brudvik,C., Gjesdal,C.G., Tell,G.S., Lie,S.A., & Hove,L.M. (2011) Osteoporosis as a risk factor for distal radial fractures: a case-control study. *J Bone Joint Surg.Am.*, **93**, 348-356.
97. Paganelli,M., Albanese,C., Borrelli,O., Civitelli,F., Canitano,N., Viola,F., Passariello,R., & Cucchiara,S. (2007) Inflammation is the main determinant of low bone mineral density in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **13**, 416-423.
98. Palder,S.B., Shandling,B., Bilik,R., Griffiths,A.M., & Sherman,P. (1991) Perianal complications of pediatric Crohn's disease. *J Pediatr.Surg.*, **26**, 513-515.
99. Pappa,H.M., Gordon,C.M., Saslowsky,T.M., Zholudev,A., Horr,B., Shih,M.C., & Grand,R.J. (2006) Vitamin D status in children and young adults with inflammatory bowel disease. *Pediatrics*, **118**, 1950-1961.
100. Perminow,G., Frigessi,A., Rydning,A., Nakstad,B., & Vatn,M.H. (2006) Incidence and clinical presentation of IBD in children: comparison between prospective and retrospective data in a selected Norwegian population. *Scand J Gastroenterol.*, **41**, 1433-1439.
101. Pytrus,T., Mowszet,K., Krzesiek,E., Rzeszutko,M., & Iwanczak,B. (2008) [Diagnostic role of upper gastrointestinal endoscopy in pediatric inflammatory bowel diseases]. *Pol.Merkur Lekarski.*, **25**, 460-464.
102. Qiu,A., Jansen,M., Sakaris,A., Min,S.H., Chattopadhyay,S., Tsai,E., Sandoval,C., Zhao,R., Akabas,M.H., & Goldman,I.D. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, **127**, 917-928.
103. Rajani,S., Huynh,H.Q., & Turner,J. (2010) The changing frequency of celiac disease diagnosed at the Stollery Children's Hospital. *Can.J Gastroenterol.*, **24**, 109-112.
104. Rashid,M. & MacDonald,A. (2009) Importance of duodenal bulb biopsies in children for diagnosis of celiac disease in clinical practice. *BMC.Gastroenterol.*, **9**, 78.
105. Rassoul,F., Richter,V., Hentschel,B., Geisel,J., Herrmann,W., & Kuntze,T. (2008) Plasma homocysteine levels & 677C-->T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res*, **127**, 154-158.
106. Ravelli,A., Villanacci,V., Monfredini,C., Martinazzi,S., Grassi,V., & Manenti,S. (2010) How patchy is patchy villous atrophy?: distribution pattern of histological lesions in the duodenum of children with celiac disease. *Am.J Gastroenterol.*, **105**, 2103-2110.
107. Rikkonen,T., Tuppurainen,M., Kroger,H., Jurvelin,J., & Honkanen,R. (2006) Distance of walking in childhood and femoral bone density in perimenopausal women. *Eur J Appl.Physiol*, **97**, 509-515.
108. Rivas,R. & Shapiro,F. (2002) Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg.Am.*, **84-A**, 85-100.

109. Romanos,J., Barisani,D., Trynka,G., Zhernakova,A., Bardella,M.T., & Wijmenga,C. (2009) Six new coeliac disease loci replicated in an Italian population confirm association with coeliac disease. *J Med Genet.*, **46**, 60-63.
110. Rutgeerts,P., Goboos,K., Peeters,M., Hiele,M., Penninckx,F., Aerts,R., Kerremans,R., & Vantrappen,G. (1991) Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*, **338**, 771-774.
111. Sanchez,C.D., Ruiz-Villaverde,R., Olvera Porcel,M.C., Callejas Rubio,J.L., Perez,C.C., Garcia,M.G., Calvin,J.G., & Ortego,C.N. (2011) [Evaluation of bone mineral density, bone turnover markers, the OPG/RANKL system and sTNF-RI in Crohn's disease]. *Gastroenterol.Hepatol.*, **34**, 3-9.
112. Savilahti,E., Kolho,K.L., Westerholm-Ormio,M., & Verkasalo,M. (2010) Clinics of coeliac disease in children in the 2000s. *Acta Paediatr.*, **99**, 1026-1030.
113. Schmidt,S., Mellstrom,D., Norjavaara,E., Sundh,S.V., & Saalman,R. (2009) Low bone mineral density in children and adolescents with inflammatory bowel disease: a population-based study from Western Sweden. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **15**, 1844-1850.
114. Shafran,I. & Burgunder,P. (2010) Adjunctive antibiotic therapy with rifaximin may help reduce Crohn's disease activity. *Dig.Dis.Sci*, **55**, 1079-1084.
115. Sincic,B.M., Vucelic,B., Persic,M., Brncic,N., Erzen,D.J., Radakovic,B., Micovic,V., & Stimac,D. (2006) Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol.*, **41**, 437-444.
116. Sipponen,P., Laxen,F., Huotari,K., & Harkonen,M. (2003) Prevalence of low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population: association with atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection. *Scand J Gastroenterol.*, **38**, 1209-1216.
117. Solberg,I.C., Vatn,M.H., Hoie,O., Stray,N., Sauar,J., Jahnsen,J., Moum,B., & Lygren,I. (2007) Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin Gastroenterol.Hepatol.*, **5**, 1430-1438.
118. Souto,J.C., Martinez,E., Roca,M., Mateo,J., Pujol,J., Gonzalez,D., & Fontcuberta,J. (1995) Prothrombotic state and signs of endothelial lesion in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci*, **40**, 1883-1889.
119. Spehlmann,M.E., Begun,A.Z., Burghardt,J., Lepage,P., Raedler,A., & Schreiber,S. (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **14**, 968-976.
120. Stabler,S.P., Lindenbaum,J., Savage,D.G., & Allen,R.H. (1993) Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood*, **81**, 3404-3413.
121. Stawarski,A., Iwanczak,B., Krzesiek,E., & Iwanczak,F. (2006) [Intestinal complications and extraintestinal manifestations in children with inflammatory bowel disease]. *Pol.Merkur Lekarski.*, **20**, 22-25.

122. Sylvester,F.A., Davis,P.M., Wyzga,N., Hyams,J.S., & Lerer,T. (2006) Are activated T cells regulators of bone metabolism in children with Crohn disease? *J Pediatr.*, **148**, 461-466.
123. Thayu,M., Leonard,M.B., Hyams,J.S., Crandall,W.V., Kugathasan,S., Otley,A.R., Olson,A., Johanns,J., Marano,C.W., Heuschkel,R.B., Veereman-Wauters,G., Griffiths,A.M., & Baldassano,R.N. (2008) Improvement in biomarkers of bone formation during infliximab therapy in pediatric Crohn's disease: results of the REACH study. *Clin Gastroenterol.Hepatol.*, **6**, 1378-1384.
124. Thia,K.T., Sandborn,W.J., Harmsen,W.S., Zinsmeister,A.R., & Loftus,E.V., Jr. (2010) Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology*, **139**, 1147-1155.
125. Tursi,A., Elisei,W., Giorgetti,G.M., Gaspardone,A., Lecca,P.G., Di,C.L., & Brandimarte,G. (2010) Prevalence of celiac disease and symptoms in relatives of patients with celiac disease. *Eur Rev.Med Pharmacol.Sci*, **14**, 567-572.
126. Vaes,B.L., Lute,C., van der Woning,S.P., Piek,E., Vermeer,J., Blom,H.J., Mathers,J.C., Muller,M., de Groot,L.C., & Steegenga,W.T. (2010) Inhibition of methylation decreases osteoblast differentiation via a non-DNA-dependent methylation mechanism. *Bone*, **46**, 514-523.
127. van den Brande,J.M., Braat,H., Van Den Brink,G.R., Versteeg,H.H., Bauer,C.A., Hoedemaeker,I., van,M.C., Hommes,D.W., Peppelenbosch,M.P., & van Deventer,S.J. (2003) Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, **124**, 1774-1785.
128. Varela-Moreiras,G., Avila,J.M., Cuadrado,C., del,P.S., Ruiz,E., & Moreiras,O. (2010) Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr.*, **64 Suppl 3**, S37-S43.
129. Vernier-Massouille,G., Balde,M., Salleron,J., Turck,D., Dupas,J.L., Mouterde,O., Merle,V., Salomez,J.L., Branche,J., Marti,R., Lerebours,E., Cortot,A., Gower-Rousseau,C., & Colombel,J.F. (2008) Natural history of pediatric Crohn's disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, **135**, 1106-1113.
130. Victoria,C.R., Sassak,L.Y., & Nunes,H.R. (2009) Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol.*, **46**, 20-25.
131. Volgyi,E., Tylavsky,F.A., Xu,L., Lu,J., Wang,Q., Alen,M., & Cheng,S. (2010) Bone and body segment lengthening and widening: a 7-year follow-up study in pubertal girls. *Bone*, **47**, 773-782.
132. von,S.E., Gordon,C.M., Wypij,D., Wertz,M., Gallagher,K.T., & Bachrach,L. (2006) Variable deficits of bone mineral despite chronic glucocorticoid therapy in pediatric patients with inflammatory diseases: a Glaser Pediatric Research Network study. *J Pediatr.Endocrinol.Metab*, **19**, 821-830.
133. Wahed,M., Louis-Auguste,J.R., Baxter,L.M., Limdi,J.K., McCartney,S.A., Lindsay,J.O., & Bloom,S.L. (2009) Efficacy of methotrexate in Crohn's disease and ulcerative

- colitis patients unresponsive or intolerant to azathioprine /mercaptopurine. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, **30**, 614-620.
134. Walkowiak,J., Blask-Osipa,A., Lisowska,A., Oralewska,B., Pogorzelski,A., Cichy,W., Sapiejka,E., Kowalska,M., Korzon,M., & Szaflarska-Poplawska,A. (2010) Cystic fibrosis is a risk factor for celiac disease. *Acta Biochim.Pol.*, **57**, 115-118.
 135. Walther,F., Fusch,C., Radke,M., Beckert,S., & Findeisen,A. (2006) Osteoporosis in pediatric patients suffering from chronic inflammatory bowel disease with and without steroid treatment. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, **43**, 42-51.
 136. Wang,Y.H., Yan,F., Zhang,W.B., Ye,G., Zheng,Y.Y., Zhang,X.H., & Shao,F.Y. (2009) An investigation of vitamin B12 deficiency in elderly inpatients in neurology department. *Neurosci.Bull.*, **25**, 209-215.
 137. Ward,L.M., Gaboury,I., Ladhani,M., & Zlotkin,S. (2007) Vitamin D-deficiency rickets among children in Canada. *CMAJ.*, **177**, 161-166.
 138. Wasson,G.R., McGlynn,A.P., McNulty,H., O'Reilly,S.L., Kelvey-Martin,V.J., McKerr,G., Strain,J.J., Scott,J., & Downes,C.S. (2006) Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *J Nutr.*, **136**, 2748-2753.
 139. Webb,A.R., Kift,R., Durkin,M.T., O'Brien,S.J., Vail,A., Berry,J.L., & Rhodes,L.E. (2010) The role of sunlight exposure in determining the vitamin D status of the U.K. white adult population. *Br J Dermatol.*, **163**, 1050-1055.
 140. Wehkamp,J., Harder,J., Weichenthal,M., Schwab,M., Schaffeler,E., Schlee,M., Herrlinger,K.R., Stallmach,A., Noack,F., Fritz,P., Schroder,J.M., Bevins,C.L., Fellermann,K., & Stange,E.F. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, **53**, 1658-1664.
 141. Wehkamp,J., Salzman,N.H., Porter,E., Nuding,S., Weichenthal,M., Petras,R.E., Shen,B., Schaeffeler,E., Schwab,M., Linzmeier,R., Feathers,R.W., Chu,H., Lima,H., Jr., Fellermann,K., Ganz,T., Stange,E.F., & Bevins,C.L. (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*, **102**, 18129-18134.
 142. Wilson,J., Hair,C., Knight,R., Catto-Smith,A., Bell,S., Kamm,M., Desmond,P., McNeil,J., & Connell,W. (2010) High incidence of inflammatory bowel disease in Australia: a prospective population-based Australian incidence study. *Inflamm.Bowel.Dis.*, **16**, 1550-1556.
 143. Yilmaz,D., Ersoy,B., Bilgin,E., Gumuser,G., Onur,E., & Pinar,E.D. (2005) Bone mineral density in girls and boys at different pubertal stages: relation with gonadal steroids, bone formation markers, and growth parameters. *J Bone Miner.Metab*, **23**, 476-482.
 144. Zachor,D.A., Mroczek-Musulman,E., & Brown,P. (2000) Prevalence of celiac disease in Down syndrome in the United States. *J Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, **31**, 275-279.
 145. Zhang,X. & Zanello,L.P. (2008) Vitamin D receptor-dependent 1 alpha,25(OH)₂ vitamin D₃-induced anti-apoptotic PI3K/AKT signaling in osteoblasts. *J Bone Miner.Res*, **23**, 1238-1248.

146. Zheng,J.J., Zhu,X.S., Huangfu,Z., Shi,X.H., & Guo,Z.R. (2010) Prevalence and incidence rates of Crohn's disease in mainland China: a meta-analysis of 55 years of research. *J Dig.Dis.*, **11**, 161-166.

6. Danksagung

An erster Stelle möchte ich besonders meiner Betreuerin Prof. Dr. Rima Obeid danken. Sie hat mich mit ihrer großen Erfahrung, Motivation, konstruktiven Kritik und großem Engagement durch dieses Projekt geführt und stand mir jederzeit beratend zur Seite.

Außerdem danken möchte ich Prof. Gerd Dockter für die Mitbetreuung im klinischen Bereich.

Dank auch an Prof. Herrmann für die Bereitstellung des Themas, seine Motivation und Unterstützung.

Mein weiterer Dank geht an Susanne Kirsch, die für alle meine Fragen offen und jederzeit sehr geduldig und hilfsbereit war. Danke auch an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Zentrallabors, die mich unterstützt haben und mir helfend zur Seite standen.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Pirro und die Ärztinnen und Ärzte der allgemeinpädiatrischen Station sowie an alle pflegerischen Mitarbeiterinnen der gastroenterologischen Abteilung der Kinderklinik Homburg für ihre engagierte Unterstützung bei der Patientenrekrutierung. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Bärbel Palm für die Einarbeitung in Durchführung und Auswertung von Ernährungsprotokollen und ihre engagierte Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und ermutigt haben und die mir zusammen mit meinem Freund die Kraft gegeben haben, die letzten Jahre zu meistern.