

Kapitel 3

Methodik

Die Studie ist eine multizentrisch, kontrollierte Kohortenstudie, in der der aktuelle Ernährungsstatus von Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) in verschiedenen Erkrankungsstadien untersucht wurde. Die Rekrutierung und Untersuchung der Studienprobanden erfolgte durch Dipl. oec. troph. Susanne Hengstermann sowie die Mediziner Lennart Schaper und Thomas Koernicke. Die Studienergebnisse wurden im Rahmen von drei Dissertationen mit verschiedenen Schwerpunkten durch die genannten Personen analysiert.

3.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation setzte sich aus CED-Patienten zusammen. Des Weiteren erfolgte die Rekrutierung von gesunden Kontrollpersonen aus Berlin, die nach Geschlecht, Alter (± 5 Jahre) und Body Mass Index (BMI, $\pm 0.3 \text{ kg/m}^2$) mit den CED-Patienten in Remission aus Berlin „gematcht“ wurden.

Die Ein- und Ausschlusskriterien sind den Tabellen 3.1 und 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Einschlusskriterien

CED-Patienten	Gesunde Kontrollen
Alter: 18-70 Jahre	Alter: 18-70 Jahre
Einverständnis des Patienten	Einverständnis des Probanden
Diagnostizierte CED	Subjektive Gesundheit

Tabelle 3.2: Ausschlusskriterien

CED-Patienten	Gesunde Kontrollen
Fehlendes Einverständnis	Fehlendes Einverständnis
Schwerwiegende Zweiterkrankung	Ein oder mehr Parameter der Routineblutchemie außerhalb des Normalbereichs
Schwangerschaft	Generell akuter oder chronischer Arzneimittelkonsum
Bewusstes Einhalten einer Außenseiterdiät (Makrobiotik, Veganer)	Akute systemische oder lokale Entzündungen, inkl. viraler Infekte
Verwendung hochdosierter Vitaminpräparate, speziell Vitamin A, C, D, E, Selen, Magnesium (>2x Supplementation der empfohlenen Tagesdosierung/Tag)	Chronisch entzündliche Erkrankungen (rheumatoide Arthritis, atopische Dermatitis, Sichelzellerkrankung etc.)
Sprue	Sprue oder sonstige mit Maldigestion/Malabsorption verbundene Erkrankung
Verschluss oder Stenose der Mesenterialarterie	Akute oder chronische Organerkrankungen, Diabetes mellitus, Hypertonie
Eintritt des Todes während des Untersuchungszeitraumes	Eintritt des Todes während des Untersuchungszeitraumes

3.1.1 Rekrutierungszentren

- * *Charité - Universitätsmedizin Berlin* (Stammzentrum), Medizinische Klinik m. S. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Leitung: Prof. Dr. H. Lochs, verantwortlicher Arzt: Dr. C. Büning, Charitéplatz 1, 10117 Berlin
- * *I. Med. Abteilung, Krankenhaus Lainz*, Wien, Österreich, Leitung: Prof. Dr. H. Brunner, verantwortliche Ärzte: Dr. W. Tillinger, Dr. A. Mader, Wolkersbergenstraße 1, 1130 Wien, Österreich
- * *Ambulatorio e Day-Hospital di Nutrizione Artificiale Sezione di Gastroenterologia*. Dip. Emergenza Trapianti Organo. Università di Bari, verantwortlicher Arzt: Dr. med. F. W. Guglielmi, Piazza G. Cesare, 11, 70124 Bari, Italien

3.1.2 Studiengruppen

Die Patienten wurden nach der Erkrankungsaktivität in folgende Gruppen eingeteilt:

- * Morbus Crohn in Remission
- * Morbus Crohn im akuten Schub
- * Colitis ulcerosa in Remission

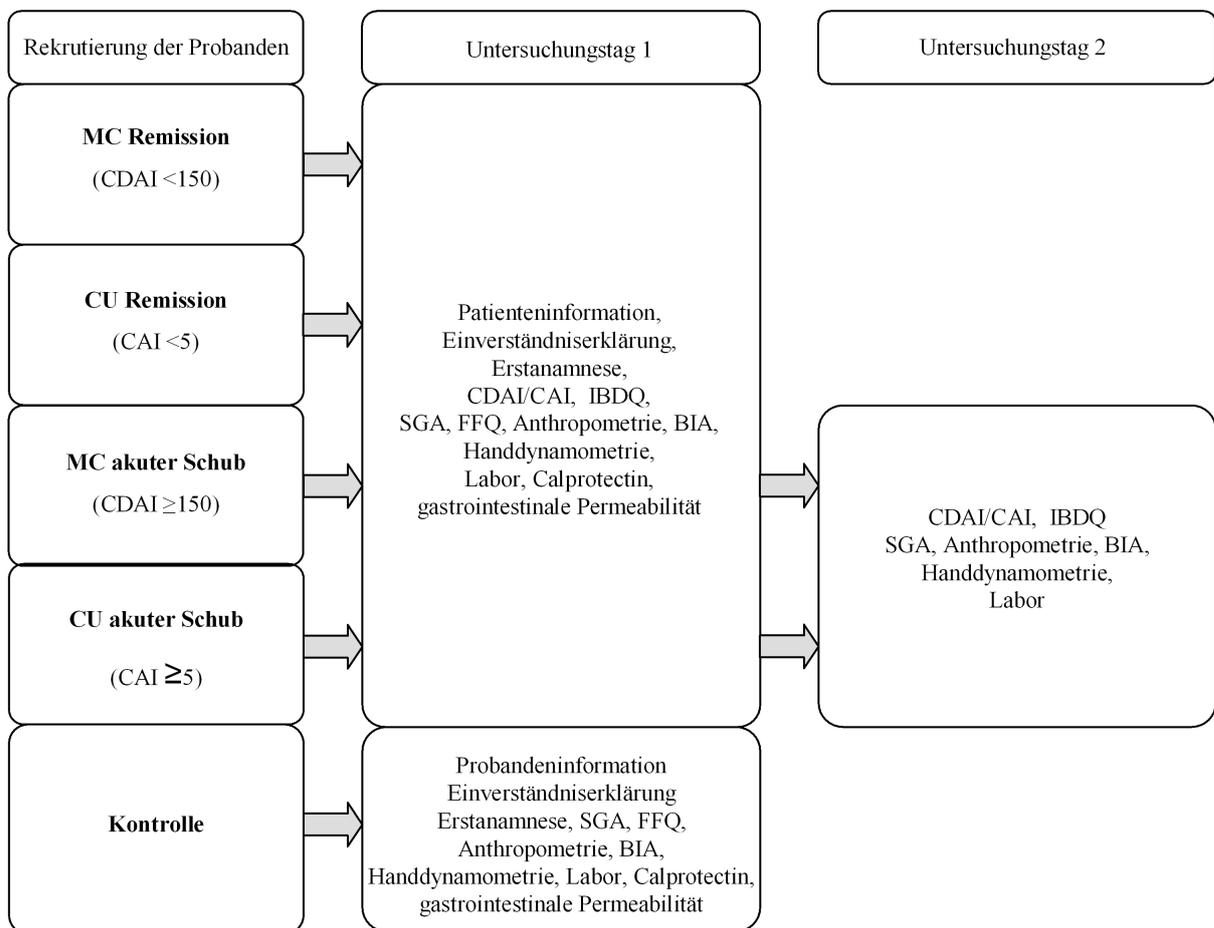
* Colitis ulcerosa im akuten Schub.

Eine weitere Studiengruppe setzte sich aus gesunden Kontrollpersonen zusammen, die nach Geschlecht, Alter und Body Mass Index (BMI) mit den CED-Patienten in Remission aus Berlin „gematcht“ wurden.

3.1.3 Phasen der Studie

Im Zeitraum September 2004 bis Februar 2006 wurden CED-Patienten in den Zentren Berlin, Wien und Bari rekrutiert. Zusätzlich erfolgte im gleichen Zeitraum die Inkludierung gesunder Kontrollprobanden in Berlin. Der Abschluss der Studie erfolgte mit Beendigung des Follow-ups im Februar 2006.

Abbildung 3.1: Arbeitsablauf der Untersuchung



Erklärung MC Morbus Crohn, CU Colitis ulcerosa, CDAI Crohn's Disease Activity Index, CAI Colitis ulcerosa Activity Index, IBDQ Inflammatory Bowel Disease, SGA Subjective Global Assessment, FFQ Food Frequency Questionnaire, BIA Bioelektrische Impedanzanalyse

3.1.3.1 Dauer je Patient/Proband

Die Studienpatienten wurden im Rahmen der Studie einmal untersucht. Am Tag der Rekrutierung wurden alle erforderlichen Untersuchungen durchgeführt. Insgesamt 10 Patienten im akuten Schub wurden nach drei Monaten noch einmal im Studienzentrum untersucht, analog zum Rekrutierungstag. Die erforderlichen Untersuchungen der gesunden Kontrollgruppe wurden nach Aufklärung und Einverständniserklärung ebenfalls an einem Tag durchgeführt. Abbildung 3.1 stellt graphisch den Ablauf der Untersuchung dar.

3.1.3.2 Dauer der Studie

Die Rekrutierung der CED-Patienten begann im September 2004 und endete im Februar 2006. Kontrollprobanden in Berlin wurden im gleichen Zeitraum inkludiert. Die Studie endete mit Abschluss des Follow-ups im Februar 2006.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Crohn's Disease Activity Index

Der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) [16, 17] gilt als Gold-Standard zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei MC-Patienten mit primär entzündlichen oder obstruierten Komponenten [150]. Der Fragebogen setzt sich aus acht Variablen zusammen: Anzahl der flüssigen Stühle, Ausmaß abdomineller Schmerzen, allgemeines Wohlbefinden, Auftreten von extraintestinalen Symptomen, Notwendigkeit der Einnahme von Arzneimitteln gegen Diarrhoen, Vorhandensein von Resistenzen im Abdomen, Hämatokrit und der Ratio aktuelles Körpergewicht/Standard-Körpergewicht. Das jeweils zutreffende Item der acht Kategorien wird mit einem Multiplikator multipliziert. Die Summe aller multiplizierten Items ergibt den Aktivitätsindex. Das Punktesystem des CDAI reicht von 0 bis 600 Punkten mit folgenden Abstufungen:

- * ≤ 149 Punkte: in Remission
- * 150-219 Punkte: leicht aktive Erkrankung
- * 220-450 Punkte: mäßig aktive Erkrankung
- * ≥ 451 Punkte: schwere Erkrankung [150].

Der CDAI wurde bei MC-Patienten am Tag der Rekrutierung sowie nach drei bei akuten CED-Patienten erhoben.

3.2.2 Colitis ulcerosa Activity Index

Der Colitis ulcerosa Activity Index (CAI) bewertet die Krankheitsaktivität bei CU-Patienten anhand klinischer Symptome, ohne invasive Untersuchungen oder Laborparameter [114]. Der Fragebogen umfasst acht Kriterien: Allgemeinbefinden, abdomineller Druckschmerz, abdominelle Schmerzen oder Krämpfe, Anzahl der ungeformten Stühle pro Tag, Auftreten nächtlicher Diarrhoen, Stuhlinkontinenz, sichtbares Blut im Stuhl und Einnahme von Medikamenten gegen Diarrhoen. Der Score jedes Items ergibt die Gesamtpunktezahl, die zwischen 0 und 21 liegt:

* ≥ 5 : aktive Erkrankung

* > 10 : schwerer Schub.

Der CAI wurde bei CU-Patienten am Tag der Rekrutierung durchgeführt sowie nach drei Monaten bei akuten CED-Patienten erhoben.

3.2.3 Inflammatory Bowel Disease Questionnaire

Der Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBDQ) [84] gilt als Gold-Standard zur Erfassung der Lebensqualität von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen [150]. Der Fragebogen wird vom Patienten selbst ausgefüllt [85] und umfasst 32 Punkte in vier Kategorien (Darmfunktion, Gefühlsstatus, systemische Symptome, soziale Funktionen). Die Gesamtpunktzahl variiert zwischen 32 und 224, je höher die Punktzahl, desto höher die Lebensqualität. Die Ergebnisse von Patienten in Remission betragen üblicherweise 170-190 Punkte. Es existiert eine relativ gute Korrelation zwischen IBDQ und CDAI ($r = - .67$; $P < .001$). Eine individuelle Veränderung ab 16 Punkten gilt als signifikante Veränderung der Lebensqualität [84]. In diesem Projekt wurde die Übersetzung des Deutschen Netzwerkes für entzündliche Darmerkrankungen, IBDQ-D, verwendet [31]. Der IBDQ wurde von allen Patienten am Tag der Rekrutierung sowie von Patienten im akuten Schub nach drei Monaten selbstständig ausgefüllt. Zusätzlich wurden 12 allgemeine Fragen des IBDQ von der gesunden Kontrollgruppe selbstständig bearbeitet. Die 12 Fragen der Subpopulation der „gematchten“ CED-Patienten wurden aus dem Gesamt-IBDQ entnommen. Der Summenscore der 12 ausgewählten Fragen beträgt 12-84 Punkte.

3.2.4 Subjective Global Assessment

Das Subjective Global Assessment (SGA) wurde für Erwachsene entwickelt und gilt als eine einfach durchzuführende klinische Methode, um den Ernährungszustand von Patienten anhand von Anamnese und Untersuchung festzustellen. Mediziner setzen diese Methode zur systematischen Dokumentation und Erkennung ernährungsbezogener Probleme bei hospitalisierten Patienten ein [40].

Es erfolgt die Erfassung des Gewichtsverlustes, dessen Verlauf (Stagnation, Zu- oder Abnahme), Veränderungen der Nahrungsaufnahme, gastrointestinale Symptome (Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe), funktioneller Status sowie die Einschätzung der Leistungsfähigkeit. Die erhobenen anamnestischen Daten werden durch die körperliche Untersuchung in Bezug auf Ödeme, Aszites, Verlust von Muskelmasse und Fettgewebe ergänzt. Aus dem Gesamteindruck des Untersuchers erfolgt die subjektive Einordnung des Patienten in die Gruppe gut ernährt (A), mäßig mangelernährt oder mit Verdacht auf Mangelernährung (B) oder schwer mangelernährt (C). Liegt ein Gewichtsverlust von mindestens 5% in den letzten zwei Wochen vor Untersuchung ohne Gewichtsstabilisierung oder Gewichtszunahme mit gleichzeitiger Reduzierung der Nahrungsaufnahme und geringem Verlust des subkutanen Fettgewebes vor, erfolgt die Einteilung des Patienten in die Gruppe B. Deutliche Anzeichen einer Mangelernährung im Sinne eines anhaltenden Gewichtsverlustes mit einer Gewichtsabnahme von mindestens 10% des Körpergewichts und einer Veränderung anderer Parameter des SGA führt zur Klassifizierung in die Gruppe C [152].

Die Vorteile des SGA liegen in der einfachen und schnellen Durchführung. Die Ergebnisse sind sofort verfügbar. Nachteilig sind die subjektive Betrachtung sowie das Hinzuziehen eines Arztes, wenn der SGA von diesem nicht selbst erhoben wird. Eine Schulung des Durchzuführenden ist zwingend erforderlich. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Untersucher ist mäßig gut, daher ist das Screeningtool nicht für Verlaufsuntersuchungen geeignet [153]. Dennoch ist es ein starker Faktor zur Erkennung eines Risikos [40]. Das SGA erscheint als eine sichere Methode zur Erkennung der Mangelernährung am Krankenbett [136].

Das SGA wurde am Tag der Rekrutierung beim Patienten und Probanden durchgeführt. Bei Patienten, die nach CDAI bzw. CAI einen Schub aufwiesen, wurde nach drei Monaten im Rahmen des Follow-ups nochmals das SGA erhoben.

3.2.5 Anthropometrie

Die Körpergröße wurde auf den Millimeter genau am Stadiometer bestimmt, das Körpergewicht auf einer kalibrierten, elektronischen Waage (Seca, Deutschland) auf 0.1 kg genau gemessen. Beide Parameter wurden am Tag der Rekrutierung von allen Studienteilnehmern bestimmt. Das Gewicht wurde nach drei Monaten nochmals erhoben.

3.2.5.1 Body Mass Index

Der Body Mass Index (BMI) wurde aus Körpergewicht (w) und Körpergröße (h) nach der Formel $w[\text{kg}]/h[\text{m}]^2$ berechnet.

3.2.5.2 Oberarmumfang, Tricepshautfaltendicke

Der Oberarmumfang (AU) wurde am nicht-dominanten entspannten Arm in der Mitte zwischen Acromion und Olecranon mit einem handelsüblichen Maßband drei Mal hintereinander gemessen und der Mittelwert dokumentiert. Die für die Berechnung der Arm-Muskelfläche (arm muscle

area, AMA) und Arm-Fettfläche (arm fat area, AFA) benötigte Tricepshautfaltendicke (THF) wurde mit Hilfe eines Kalipers (Holtain) zwischen Acromion und Olecranon am entspannten, nicht-dominanten Arm gemessen. Aus dem Oberarmumfang und der THF ließ sich die AMA bzw. die AFA errechnen, aus denen Rückschlüsse auf die Fettmasse bzw. Muskelmasse möglich waren. Nach Heymsfield [76] gelten folgende Formeln:

$$\text{AMA (cm}^2\text{): } [AU - \pi * THF]^2 / 4 * \pi - 10 \text{ (Männer), } [AU - \pi * THF]^2 / 4 * \pi - 6.5 \text{ (Frauen)}$$

$$\text{AFA (cm}^2\text{): } (AU^2 / 4 * \pi) [AU - \pi * THF]^2 / 4 * \pi$$

AMA und AFA wurden am Tag der Rekrutierung bei allen Studienteilnehmern und bei Patienten, die nach CDAI bzw. CAI einen Schub aufwiesen nach drei Monaten im Rahmen des Follow-ups nochmals bestimmt.

3.2.6 Bioelektrische Impedanzanalyse

Die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) wurde in den letzten Jahren durch die hohe Praktikabilität und Kosteneffizienz sehr populär [11, 12]. Es handelt sich um eine nicht-invasive indirekte Messung der Körperzusammensetzung [11, 12, 107, 108]. Die BIA basiert auf der elektrischen Widerstandsmessung im menschlichen Körper [106], bei der über zwei Elektrodenpaare, die auf dem Hand- und Fußrücken der dominanten Körperhälfte befestigt werden, in der Messperson ein homogenes elektrisches Feld mit 800 μ Amp Stromstärke und, beim vorliegenden Gerätetypus, Frequenzen von 5, 50 und 100 kHz erzeugt werden. Nach den Empfehlungen einer Expertenkonferenz des National Institute of Health (NIH, 1994) wird die Anwendung der BIA - außer bei Patienten mit implantierten Defibrillatoren - prinzipiell als unbedenklich eingestuft.

Der gemessene Gesamtwiderstand = Impedanz (Z) setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: der Resistanz und der Reaktanz. Die Differenzierung der Teilkomponenten der Impedanz wird durch die Messung des Phasenwinkels (Zeitverschiebung des Strommaximums vom Spannungsmaximum) ermöglicht.

Resistanz Die Resistanz (R) ist der reine Widerstand eines Leiters gegen Wechselstrom und ist umgekehrt proportional zum Gesamtkörperwasser. Die Resistanz ist ein gutes Maß für die Berechnung des Körperwassers bei gesunden, normalgewichtigen Personen. Sie entsteht zu 95% an den Extremitäten und wird durch Veränderungen im Wassergehalt an den Extremitäten entsprechend beeinflusst. Normwerte der Resistanz: bei Frauen 480-580 Ohm, bei Männern 380-480 Ohm.

Reaktanz Die Reaktanz (Xc) ist der Widerstand, dem ein Kondensator Wechselstrom entgegen setzt. Jede Zellmembran des Körpers wirkt durch ihre Protein-Lipid-Schichten als Minikondensator. Die Reaktanz ist damit ein Maß für die Körperzellmasse. Normalwerte der Reaktanz: 10-12% der Resistanz.

Phasenwinkel Jede stoffwechselaktive Zelle des Körpers hat an der Zellmembran eine elektrische Potentialdifferenz von ca. 50-100 mV. Dieses Membranpotential lässt die Zelle in einem Wechselstromfeld als Kugelkondensator wirken. Da Wechselstrom eine Sinusform hat, wird diese Verschiebung in $^{\circ}$ (Grad) gemessen und als Phasenwinkel bezeichnet. Dieser ist als direkter

Messparameter weniger von messtechnischen Problemen oder anderen Fehlerquellen abhängig als andere Messgrößen der BIA. Er ist ein generelles Maß für die Membranintegrität der Zellen und lässt Aussagen über den Zustand der Zelle und den Gesundheitszustand des Organismus zu. Zur Berechnung: $Phasenwinkel = \arctan(Reaktanz/Resistanz) * 180^\circ/\pi$ [12].

Ganzkörperwasser (total body water, TBW) Bei der BIA wird das in den Geweben enthaltene Elektrolytwasser genau erfasst. Das TBW wird aus dem gemessenen ohmschen Widerstand (R) nach der Formel von Kushner [106] berechnet:

$$TBW = 0.396 * (h^2/R) + 0.143 * w + 8.399 \text{ (Männer)},$$

$$TBW = 0.382 * (h^2/R) + 0.105 * w + 8.315 \text{ (Frauen)}^1$$

Magermasse (lean body mass, LBM) Die LBM wird aus dem berechneten Körperwasser abgeleitet, wobei eine Hydratisierung von 73.2% vorausgesetzt wird. Die LBM wird in die Kompartimente Körperzellmasse und Extrazellulärmasse unterteilt. Es gilt: $LBM = TBW/0.732$.

Körperzellmasse (body cell mass, BCM) Die Körperzellmasse ist die Summe der sauerstoffverbrauchenden, kaliumreichen, glucoseoxidierenden Zellen. Die BCM umfasst Zellen der Skelettmuskulatur, des Herzmuskels, der glatten Muskulatur, der inneren Organe, des Gastrointestinaltraktes, des Blutes, der Drüsen und des Nervensystems. Da sämtliche Stoffwechsellarbeiten innerhalb der Zellen der BCM gewährleistet werden, ist die BCM die zentrale Größe zur Beurteilung des Ernährungsstatus. Die BCM ist auch die Regelgröße des Energieverbrauchs und bestimmt den Kalorienbedarf des Organismus. Für die individuell vorhandene BCM spielen genetische Faktoren, Lebensalter und Trainingszustand eine Rolle. Normalwerte für die BCM lassen sich über den Anteil der Zellmasse in der Magermasse definieren. Im Altersbereich von 18-75 Jahren sollten Frauen ca. 51-58% und Männer 53-60% BCM in der LBM haben. Die Körperzellmasse wird aus der LBM abgeleitet auf der Grundlage: $BCM = LBM[kg] * 0,29 \ln(Phasenwinkel \text{ bei } 50kHz)$ [110].

Körperfett Körperfett hat eine Dichte von 0.9 g/cm^3 und wirkt als Isolator für Wechselstrom. Fettzellen besitzen nicht die typischen Eigenschaften der Zellen der BCM und haben kaum kapazitären Widerstand. Es wurde daher indirekt als Differenzbetrag zwischen Körpergewicht und Magermasse bestimmt.

Die Messung erfolgte mit dem Gerät Nutriguard-M (Fa. Data Input, Darmstadt) nüchtern, nach Blasenentleerung, in horizontaler Position nach einer standardisierten Liegedauer von 15 min. Im 45° -Winkel waren die Beine und im 30° -Winkel waren die Arme vom Körper gespreizt, so dass der Kontakt zwischen Gliedmaßen und Körper vermieden wurde. Die Haut wurde mit einem Desinfektionstupfer (Softasept, Braun Melsungen AG) gereinigt. An der dominanten Körperseite wurde eine Elektrode an den proximalen Rand einer fiktiven Linie, durch den höchsten Punkt des Ulnaköpfchens gehend, geklebt. Die Fingerelektrode wurde unterhalb der Knöchel platziert zwischen Zeige- und Mittelfinger. Zwischen Außen- und Innenknöchel des Sprunggelenks wurde die Sprunggelenkelektrode und zwischen dem 2. und 3. Zeh in der Mitte des Zehengrundgelenks distal die Zehenelektrode platziert. Im Anschluss wurden die Messkabel angeschlossen und die

¹h Größe in cm, w Gewicht in kg

Messung erfolgte bei den Frequenzen 5, 50 und 100 kHz. Die gewonnenen Rohdaten wurden in die oben beschriebenen Formeln eingesetzt und bewertet.

Die Körperzusammensetzung wurde am Tag der Rekrutierung bei allen Studienteilnehmern und bei Patienten, die nach CDAI bzw. CAI einen Schub aufwiesen, nach drei Monaten im Rahmen des Follow-ups nochmals bestimmt.

3.2.7 Handkraftmessung

Die Handkraftmessung dient als eine eigenständige Technik zur Risikoidentifikation der Mangelernährung [120, 170, 182]. Die Messung der Muskelfunktion erfolgte mittels Vigorimetrie (Jamar Hand Dynamometer; Preston, Jackson, MI 49204, USA). Mit der dominanten Hand wurde aufrecht sitzend im 90°-Armwinkel die Handkraft dreimal hintereinander im Zeitabstand von 45 sec bestimmt. Der höchste Wert wurde dokumentiert. Die Messung erfolgte am Tag der Rekrutierung bei allen Studienteilnehmern. Bei Patienten, die nach CDAI bzw. CAI am Rekrutierungstag einen Schub aufwiesen, wurde nach drei Monaten die Handkraft im Rahmen des Follow-ups nochmals bestimmt.

3.2.8 Labor

Die Analyse der in Tabelle 3.3 aufgeführten Routineparameter erfolgte nach standardisierter Methodik im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin bzw. in den zur Klinik gehörenden Laboren in Wien und Bari. Die Bestimmung des Redoxstatus, der Fettsäuren sowie des Malondialdehyds erfolgte von allen drei Zentren durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Winklhofer-Roob, Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center (HNMRC) Graz, Österreich. Die Versendung der bei -80 °C gelagerten Plasmaproben erfolgte innerhalb eines 24-stündigen Transportes auf Trockeneis.

- * Routineblutwerte: Albumin, C-reaktives Protein, saures- α -1-Glycoprotein, Kupfer, Selen, Zink, Blutbild, Differential-Blutbild
- * Analyse des Redox-Status: Lutein/Zeaxanthin, Retinol, β -Cryptoxanthin, α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Lycopene, α -Carotin, all-trans- β -Carotin, cis- β -Carotin, β -Carotin
- * Analyse des Malondialdehyds
- * Analyse des Fettsäurenprofils

3.2.8.1 Analyse des Redoxstatus

Für die Bestimmung von Parametern des oxidativen Stress ist es unumgänglich, das Vollblut sofort nach der Blutentnahme im gleichen Raum zu zentrifugieren, zu verarbeiten, eventuell mit speziellen Chemikalien zu vermengen und die Plasma- und Serum-Proben auf -80 °C bis zur Analyse zu lagern.

Für die Bestimmung von Tocopherolen, Carotinoiden und Retinol werden 200 μl EDTA-Plasma mit 400 μl Ethanol zur Proteindenaturierung vermennt und die lipophilen Substanzen mittels 800 μl n-Hexan extrahiert und abgedampft. Der Rückstand wird in Methanol und Dioxan (1:1) verdünnt mit Acetonitril gelöst. Die Trennung der lipophilen Vitamine und Carotinoide erfolgt auf einer Reversed-Phase-HPLC mit einem Fluoreszenz Detektor zur Quantifizierung von Retinol (330 nm Extinktion, 470 nm Emission), α - und γ -Tocopherol (298 nm Extinktion, 328 nm Emission) und einem UV-Detektor zur Quantifizierung von α -, β -Carotin, Lutein/Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin (450 nm) und Lycopin (472 nm) [3]. Die Summe der Carotinoide wurde berechnet aus:

$$\text{Carotinoide} = \text{Lutein/Zeaxanthin} + \text{Lycopin} + \beta\text{-Cryptoxanthin} + \alpha\text{-Carotin} + \beta\text{-Carotin}$$

Tabelle 3.3: Darstellung der zu bestimmenden Routineparameter

Parameter	Material	Methode	Referenzbereich
Albumin	Heparin-Plasma	Photometrie (Bromkresolgrün)	2.6-4.3 g/dl
CRP	Heparin-Plasma	Immunturbidimetrie	<0.5 mg/dl
Erythrozyten	EDTA-Blut	Durchflusszytometrie (zytometrisch)	4.5-5.8 /pl
Kupfer	Heparin-Plasma	Atomabsorptionsspektrometrie, Flamme	11.6-19.2 $\mu\text{mol/l}$ (M), 12.4-20.6 $\mu\text{mol/l}$ (F)
Leukozyten	EDTA-Blut	Durchflusszytometrie (zytometrisch/zytochemisch)	4.5-11 /nl
Lymphozyten	EDTA-Blut	Durchflusszytometrie	1.4-3.7 /nl
Monozyten	EDTA-Blut	Durchflusszytometrie (Berechnung)	0.2-1 /nl
Neutrophile	EDTA-Blut	Durchflusszytometrie (Berechnung)	1.8-7.7 /nl
saures alpha-1-Glykoprotein	Serum	Immunturbidimetrie	50-120 mg/dl
Selen	Heparin-Plasma	Atomabsorptionsspetrophotometrie mit Graphitrohr-Technik	0.67-1.33 $\mu\text{mol/l}$
Thrombozyten	EDTA-Blut	Durchflusszytometrie (Streulicht + Fluoreszenz von DNA + RNA mit Fluoreszenzfarbstoff)	150-400 /nl
Cholesterin	Heparin-Plasma	Enzymatischer Farbstest (CHOD/POD)	<200 mg/dl
Zink	Heparin-Plasma	Atomabsorptionsspektrometrie	10.1-18 $\mu\text{mol/l}$

Erklärung M Mann, F Frau

Die Bestimmung von Vitamin C wird durchgeführt wie von Levine et al. und Lykkesfeld et al. beschrieben [112, 122]. Innerhalb von 30 min nach der Blutentnahme wird EDTA-Plasma mit Metaphosphorsäure (1:1) versetzt, gut vermischt und auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht. Für die Analyse wird das Plasma-Metaphosphorsäure-Gemisch langsam aufgetaut und bei 12000 x g über 3 min zentrifugiert. Der klare Überstand dient zur Separation mittels HPLC auf einer Reversed-Phase Säule (Zorbax SB C18 Stable Bond $4.6\text{ x }250.5\text{ }\mu\text{m}$) und einem elektrochemischen Detektor und einer analytischen Zelle (200 mV, E1 upstream, +150 mV, E2 downstream).

3.2.8.2 Analyse des Malondialdehyds

Die Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) wird durchgeführt wie von Khoschorur et al. und Wong et al. beschrieben [93, 185]. Nach der Formation eines fluoreszierenden 1:2 Adducts zwischen MDA und 2-Tiobarbituric Acid (TBA) wird dieses mittels HPLC und fluoremetrischer Detektion (527 nm Extinktion, 551 nm Emission) quantifiziert. Der Referenzbereich für Malondialdehyd: $850\text{-}1200\text{ }\mu\text{mol/l}$.

3.2.8.3 Analyse des Fettsäurenmusters

Die Bestimmung der Plasma-Fettsäuren (Tabelle 3.4) basiert auf einer Veresterung mit anschließender Gas-Chromatographie für Fettsäurenmethylester nach der Methode von Sattler et al. [151].

Das EDTA-Plasma wurde langsam 10 min bei Raumtemperatur im Thermomixer aufgetaut und bei 12000 x g über 3 min zentrifugiert. In ein Teflonröhrchen werden $100\text{ }\mu\text{l}$ innerer Standard (10 mg Heptadecansäure plus 100 mg BHT in 10 ml Methanol) sowie $450\text{ }\mu\text{ml}$ EDTA-Plasma gegeben. Das Röhrchen wird mit Parafilm verschlossen, mit einer Nadel werden drei winzige Löcher hinein gestochen und für 10 sec wirbelnden Bewegungen ausgesetzt. Anschließend wird die Probe bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mindestens 30 min gelagert.

Die stark gefrorene Suspension trocknet über 15 min im Lyophilisator. Nach der Gefriertrocknung und Entfernung des Parafilms werden 1 ml Bor-Trifluorid-Methanol-Komplex und $500\text{ }\mu\text{l}$ Toluol hinzugefügt, die Röhrchen werden mit Teflondeckeln verschlossen und für 20 sec gewirbelt.

Die Transveresterung erfolgt bei $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 90 min. Anschließend werden 2 ml destilliertes Wasser hinzugegeben und die Fettsäurenmethylester werden drei Mal mit n-Hexan extrahiert. Die entstandenen Extrakte trocknen im „Speed Vac“ bei Raumtemperatur über 30 min, werden in $450\text{ }\mu\text{ml}$ Dichlormethan wieder aufgelöst und für die Gaschromatographie bereit gestellt.

Die Separation der Fettsäurenmethylester erfolgt an einer DB-23-Säule mit einer Länge von 30 m und einer Diameter von 0.250 mm. Die mobile Phase ist eine Mischung aus Helium und Wasserstoff. Die Heiztemperatur bei Injektion beträgt $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ und wird auf $222\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) erhöht, die Temperatur wird für 3 min konstant gehalten und weiter auf $238\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht, die Temperatur ist wiederum für 3 min konstant und wird abschließend auf $255\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$) erhöht. Die Fläche unter den Gaschromatographenpeaks wird für die Einbindung und der innere Standard für die

Berechnung der Menge der Fettsäuren (modifiziert nach Sattler et al.) herangezogen [151].

Der Begriff der essenziellen Fettsäuren wird in dieser Untersuchung für alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren verwendet, obwohl nur Linol- und α -Linolensäure nicht vom menschlichen Organismus synthetisiert werden können.

Neben der Analyse der einzelnen Fettsäuren wurde die Summe der gesättigten Fettsäuren, der einfach und mehrfach ungesättigten, der n-3- und n-6-Fettsäuren bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Berechnung des essenziellen Fettsäuren (EFS)-Index mit der Formel:

$$\text{EFS-Index} = \text{Summe (n-3-Fettsäuren + n-6-Fettsäuren)} / \text{Summe (n-7-Fettsäuren + n-9-Fettsäuren)}$$

Tabelle 3.4: Analyisierte Fettsäuren

C14:0	Myristinsäure	C16:1n-7	Palmitoleinsäure	C20:4n-6	Arachidonsäure
C15:0	Pentadecansäure	C18:1n-9	Ölsäure	C22:4n-6	Docosatetraensäure
C16:0	Palmitinsäure	C18:1n-7	Vaccensäure	C18:3n-3	α -Linolensäure
C18:0	Stearinsäure	C22:1n-9	Erucasäure	C18:4n-3	
C20:0	Arachinsäure	C18:2n-6	Linolsäure	C20:5n-3	Eicosapentaensäure
C22:0	Behensäure	C18:3n-6	γ -Linolensäure	C22:5n-3	Docosapentaensäure
C24:0	Lignocerinsäure	C20:3n-6	Dihomo- γ -Linolensäure	C22:6n-3	Docosahexaensäure

3.2.9 Gastrointestinale Permeabilität

Die Bestimmung der gastrointestinalen Permeabilität erfolgt durch die Arbeitsgruppe „Mukosafunktion“, Leitung Dr. S. Bühner, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, Med. Klinik m. S. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Charitéplatz 1, 10117 Berlin.

Der sogenannte 4-Zucker-Test beruht auf dem quantitativen Nachweis von oral aufgenommenen Zuckermolekülen im Urin [19]. Die verwendeten Zuckervarianten Lactulose (Disaccharid; MG: 342.30 g), Mannit (Zuckeralkohol; MG: 182.17 g) und Sucralose (artifizielles Disaccharid) erfüllen die Anforderungen, die an ein „Markermolekül“ gestellt werden: Sie sind wasserlöslich, fettunlöslich, werden weder aktiv transportiert noch metabolisiert und relativ rasch im Harn ausgeschieden. Das Disaccharid Saccharose, der normale Haushaltszucker, wird unaufgespalten nur im Magen und Duodenum resorbiert und dient daher als Marker für die Permeabilität dieser intestinalen Kompartimente (Normwert: Menge im Urin <43 mg oder <0.23% der verabreichten Substanz). Mannit wird zu 30% über die Magenschleimhaut resorbiert, der restliche Anteil über den Dünndarm (Normwert: Menge im Urin <27.8% der verabreichten Substanz). Lactulose gilt als Marker für die Permeabilität der Dünndarmschleimhaut (Normwert: <0.44% der verabreichten Substanz). Sucralose, ein artifizielles Disaccharid, hat sich als Marker der Colonpermeabilität bewährt, da es im Gegensatz zu anderen Zuckern von Colonbakterien nicht metabolisiert wird. Sehr häufig wird ein Index, der „Permeabilitätsindex“ ($\% \text{Lactulose} / \% \text{Mannit}$, Normwert: < .030) zusätzlich

angegeben [186]. Hierdurch wird eine unterschiedliche intestinale Transportrate relativiert.

Die Testlösung wird in der Apotheke der Charité hergestellt und die Analysen in der Arbeitsgruppe „Mukosafunktion“ durchgeführt. Die Methodik ist etabliert, die Gerätschaften sind vorhanden. Aliquote der Urinproben werden mit Sulfosalicylsäure deproteiniert, mit Amberlite MB-3 Harz in Actetatform entsalzt, nach einer HPLC-Auftrennung elektrochemisch detektiert (gepulste Amperometrie, Dionex, Idstein, Germany), qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Werte werden in Prozent der in der Testlösung befindlichen Menge angegeben. Eventuell bereits vor Testdurchführung im Urin vorhandene Zucker werden im Vorharn (Nullwert) bestimmt und bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt.

Ernste Nebenwirkungen der Testlösung sind bisher nicht bekannt. Da speziell Lactose ein gewisses laxierendes Potential hat, können jedoch eine vorübergehende Stuhlerweichung, Stuhlfrequenzerhöhung und vereinzelte Blähungen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

1. Morgens nüchtern, Abnahme einer Urinprobe für den Vortest.
2. Eine Lösung von 20 g Saccharose, 10 g Lactulose, 5 g Mannitol in 100 ml Wasser und 2 g Sucralose in Kapselform werden von der Testperson eingenommen.
3. Sammlung des Urins über 5 Stunden (Natrium-Azid als Konservierungsmittel); während dieser Zeit: nil per os, Ausnahme: Wasser ab 2h nach Versuchsbeginn.
4. Weitere Sammlung des Urins bis zur Stunde 26; Nahrungsaufnahme erlaubt.
5. 10 ml Aliquote der Sammelharn bei 20 °C aufbewahrt.

Die Durchführung des Permeabilitätstestes erfolgte innerhalb von 10 Tagen nach der Rekrutierung. Der Sammelurin wurde von einer Subpopulation aus Berlin zur Analyse in die Charité zurück gebracht.

3.2.10 Calprotektin

Die Bestimmung des Calprotektins erfolgte durch die Arbeitsgruppe „Mukosafunktion“, Leitung Dr. S. Bühner, Charité - Universitätsklinikum Berlin, Campus Mitte, Med. Klinik m. S. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Charitéplatz 1, 10117 Berlin. Die Bestimmung des Calprotektins ist eine einfache Methodik zur Evaluierung der intestinalen Entzündungsreaktion. Calprotektin wurde mittels ELISA-Methodik (Calprest ®) aus einer Stuhlprobe von 80-120 mg entnommen, die bei -20°C tiefgekühlt über einen Zeitraum von maximal 6 Monate gelagert wurde, bestimmt. Konzentrationen von >15 mg/l geben Hinweis auf eine erhöhte lokale Entzündung im Darm. Eine Subpopulation von Patienten/Kontrollen erhielt am Tag der Rekrutierung ein Stuhlröhrchen, welches mit Stuhlprobe innerhalb von 10 Tagen zum Studienzentrum zurückgesandt wurde.

3.2.11 Food Frequency Questionnaire

Das von der Diätschule der Charité entwickelte Food Frequency Questionnaire (FFQ) erfasste 45 herkömmliche Lebensmittel, die im Rahmen der Auswertung in Lebensmittelgruppen aufgeteilt wurden: Fleisch, Fisch, Milchprodukte, Obst/Gemüse, Kohlenhydrate, Süßigkeiten, Snacks, Fast Food, Alkohol. Des Weiteren erfolgte eine detaillierte Auflistung verschiedener Fette und Öle: n-6-Fette, Olivenöl, Rapsöl, sonstige Öle, tierische Fette, Margarine.

Zusammengefasst wurde die Häufigkeit des Verzehrs in die Kategorien 1) „fast täglich oder mehrmals pro Woche“, 2) „einmal pro Woche oder 14-tägig“, 3) „einmal pro Monat oder selten“ sowie 4) „niemals“. Die Häufigkeiten der Kategorie 1 wurden mit dem Faktor 3, Kategorie 2 mit Faktor 2, Kategorie 3 mit Faktor 1 und die Kategorie 4 mit dem Faktor 0 multipliziert. Im Vergleich zum Maximalscore wurde ein möglicher Unterschied der Häufigkeiten hinsichtlich Nahrungsaufnahme sichtbar.

Das FFQ wurde am Tag der Rekrutierung vom Patienten/Kontrollprobanden selbstständig ausgefüllt.

3.3 Statistik

Die Zielgrößen (Antioxidanzien und Fettsäuren) werden im Folgenden in der Terminologie der statistischen Analyse als abhängige Variablen bezeichnet. Im Gegensatz zu den übrigen Faktoren ist ein Einfluss der Größen "Zentrum" auszuschließen, um die Patienten als eine Grundgesamtheit gemeinsam auswerten zu können. Ebenfalls kann angenommen werden, dass das Verhalten der abhängigen Variablen unabhängig von den hier untersuchten Erkrankungen ist, da diese einen ähnlichen Einfluss auf die Zielgrößen haben. Der erste Schritt der Analyse überprüft diese Annahmen.

3.3.1 Analyse der Zentren- und Erkrankungseffekte

Mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) wird geprüft, ob die Faktoren „Zentrum“ und „Erkrankung“ jeweils einen Effekt auf die abhängigen Variablen aufweisen. Werden auf den durch die einzelnen Ausprägungen der Faktoren induzierten Teilgesamtheiten signifikant unterschiedliche Verteilungen der abhängigen Variablen nachgewiesen, erfolgen im Anschluss paarweise Vergleiche der Teilgesamtheiten. Das Signifikanzniveau wird als $\alpha < 0.05$ gewählt und mittels Bonferroni für das multiple Testverfahren justiert.

3.3.2 Multizentrische Stichprobe

Sind keine Zentrumseffekte nachweisbar, werden die Daten als einer Gesamtpopulation entstammend betrachtet und die Analyse multizentrisch durchgeführt. Mittels ANOVA wird zunächst überprüft, ob die oben genannten Faktoren einen Einfluss auf die abhängigen Variablen der Gesamtpopulation haben.

pulation haben. Bei der Analyse der Antioxidanzien wird zusätzlich die Supplementeneinnahme als weiterer Faktor in das Modell aufgenommen, um den Einfluss von Vitaminsupplementen zu evaluieren. Sollten mehrere Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die abhängigen Variablen zeigen, wird im Anschluss eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (MANOVA) durchgeführt. Diese liefert Hinweise darauf, welche Teilgesamtheiten in einer weiteren statistischen Analyse näher betrachtet werden müssen. Mittels dieser Analyse kann sichergestellt werden, dass auch solche Einflüsse erkannt werden, die sich nur ergeben, wenn eine Kombination von Merkmalsausprägungen unterschiedlicher Faktoren vorliegt. Auf den "homogenen Gruppen", d.h. Teilmengen der Stichprobe, die die gleichen Merkmalsausprägungen der signifikanten Faktoren besitzen, werden die Analysen wie für den Fall eines signifikanten Faktors durchgeführt.

Liegt genau ein Faktor mit einem signifikanten Effekt auf die abhängigen Variablen vor, wird im Anschluss ein paarweiser Vergleich der durch die Ausprägungen des Faktors definierten Teilgesamtheiten durchgeführt. Explorativ wird zunächst überprüft, ob die abhängigen Variablen normalverteilt sind. Hierzu wird der Kolmogoroff-Smirnoff-Test verwendet. Das Signifikanzniveau α liegt auch hier bei 0.05. Liegt Normalverteilung vor, wird für den paarweisen Vergleich der Teilgesamtheiten der t-Test verwendet; im anderen Fall der Kolmogoroff-Smirnoff-Test. Besitzt der Faktor mehr als zwei Ausprägungen liegt ein multiples Testproblem vor. Das Signifikanzniveau der Einzeltests wird mittels Bonferroni gesetzt. Bemerkung: Zur Prüfung der Unterschiede bei kategorialen Variablen werden die ANOVA sowie der Posthoc-Test verwendet. Die Berechnung von Korrelationen erfolgt nach Spearman. Der Korrelationskoeffizient r wird auf dem Signifikanzniveau $P < 0.05$ angegeben.

3.3.3 Kontrolluntersuchung

Die Grundgesamtheit wird um eine Kontrollgruppe gesunder Patienten erweitert. Auf dieser Population wird mittels univariater Varianzanalyse geprüft, ob die Faktoren Alter, Geschlecht und Erkrankung (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) einen Effekt auf die abhängigen Variablen haben. Hierbei werden die Kontrollen einmal allen Patienten, einmal Morbus Crohn und Colitis ulcerosa getrennt gegenübergestellt. Zur Prüfung signifikanter Effekte wird der Wilcoxon-Test verwendet.

3.3.4 Follow-up

Die Grundgesamtheit der Patienten mit CDAI >150 bzw. CAI > 5 wird um eine Follow-up-Untersuchung erweitert. Auf dieser Population wird mittels univariater Varianzanalyse geprüft, ob die Faktoren Alter, Geschlecht und Erkrankung (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) einen Effekt auf die abhängigen Variablen haben. Hierbei werden die Daten des Follow-ups mit den Daten der Erstuntersuchung gegenübergestellt. Zur Prüfung signifikanter Effekte wird der Wilcoxon-Test verwendet.