

Aus der Klinik der Inneren Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische Intensivmedizin,
Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und Alterungsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Analyse von Biomarkern bei Reizdarmpatienten mit Nachweis von Nahrungsmittelsensitivität mittels Endomikroskopie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Marie-Jelena Möisinger

aus Bad Oldesloe

Kiel, 2019

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Annette Fritscher-Ravens, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin BUPA Cromwell Hospital
2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Schreiber, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.02.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roeder

Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

„Tue es oder tue es nicht. Es gibt kein Versuchen.“

Star Wars Episode V

gewidmet meiner Familie und Florian Christoph Gerdts

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Allgemein	9
2.2. Studienprotokoll	9
2.3. Patienten	13
2.3.1. Kontrollpatienten	14
2.4. Endoskopie	14
2.5. Biomarker	16
2.5.1. Intraepitheliale Lymphozyten	16
2.5.2. Eosinophile Granulozyten	18
2.5.3. Proteine in der Spülflüssigkeit	19
2.5.3.1. Messung des ECP in der Spülflüssigkeit	20
2.5.3.2. Messung der Tryptase in der Spülflüssigkeit	21
2.6. Statistik	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Patienten	25
3.2. Endoskopie	27
3.3. Ergebnisse der Ausschlussdiäten und Symptomscores	32
3.4. Auswertungen der Biomarker	35
3.4.1. Intraepitheliale Lymphozyten	35
3.4.2. Eosinophile Granulozyten	37
3.4.3. Proteine in der Spülflüssigkeit	39
3.4.3.1. Messung des ECP in der Spülflüssigkeit	39
3.4.3.2. Alpha-Tryptase in der Spülflüssigkeit	40
3.4.4. Anamnese: Atopie	41
3.4.5. Vergleich der IEL und EOS bei CLE+, unterteilt nach Reaktionen auf die verschiedenen Nahrungsmittelantigene	43
3.4.6. Extraintestinale Symptome	44

4. Diskussion	46
4.2. Zusammenfassung	58
5. Literaturverzeichnis	60
6. Anhang	74
6.1. IBS Kriterien	74
6.2. Patienteninformationsblatt Studie	78
6.3. Einverständniserklärung Studie	80
6.4. Danksagung	85

II. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CD	„Cluster of differentiation“ - Unterscheidungsgruppen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CLE	„confocal laser endomicroscopy“ - konfokale Laserendomikroskopie
CLE-	IBS-Patienten mit einer negativen Reaktion auf ein Nahrungsmittelallergen in der CLE
CLE +	IBS-Patienten mit einer positiven Reaktion auf ein Nahrungsmittelallergen in der CLE
CLE + 80	IBS-Patienten mit einer positiven Reaktion auf ein Nahrungsmittelallergen in der CLE, die nach mindestens 3-monatiger Ausschlussdiät des Nahrungsmittelallergens eine Besserung der IBS-Symptome von mindestens 80 % aufwiesen
CLE + 80 (M/S/E)	IBS-Patienten mit einer positiven Reaktion auf Milch und/oder Soja und/oder Ei in der CLE, die nach mindestens 3-monatiger Ausschlussdiät des Allergens eine Besserung der IBS-Symptome von mindestens 80 % aufwiesen
CLE + 80 (W/H)	IBS-Patienten mit einer positiven Reaktion auf Weizen und/oder Hefe in der CLE, die nach mindestens 3-monatiger Ausschlussdiät von Weizen und/oder Hefe eine Besserung der IBS-Symptome von mindestens 80 % aufwiesen
CT	Computertomographie
EDN	eosinophil-derived neurotoxin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay – antikörperbasiertes Nachweisverfahren
EOS	eosinophile Granulozyten
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FODMAP	fermentierbare Oligo-, Di- und Monosaccharide und Polyole
GALT	„gut associated lymphoid tissue“ – darmassoziiertes Immunsystem
HAD	„Hospital Anxiety and Depression Scale“ – klinischer Angst- und Depressionsfragebogen
HC	„healthy controls“ - gesunde Kontrollpatienten
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPF	„high power field“ - ein Bildausschnitt bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop
IBS	„irritable bowel syndrome“ – Reizdarmsyndrom

IBS-C	„constipation-predominant IBS“ - Reizdarmsyndrom mit vorherrschender Obstipation
IBS-D	„diarrhea-predominant IBS“ - Reizdarmsyndrom mit vorherrschenden Diarrhoen
IBS-M	„mixed-type IBS“ – Reizdarmsyndrom mit Obstipationen und Diarrhoen
IBSSS	„Irritable Bowel Syndrome Severity Scoring System“ – Fragebogen für die Symptomschwere des Reizdarmsyndroms
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
MBP	major basic protein
MRT	Magnetresonanztumographie
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PAS	Perjodsäure-Schiff Reaktion
PHQ12SS	„Patient Health Questionnaire 12 Somatic Symptom Scale“ – somatischer Patientenfragebogen
SCFA	„short chain fatty acids“ - kurzkettige Fettsäuren
SIBO	„small intestine overgrowth syndrome“ - Dünndarmfehlbesiedlung
TTG	„tissue transglutaminase“ – Gewebstransglutaminase
VAS	visuelle Analogskala
vs.	versus

1. Einleitung

Ein Viertel bis ein Fünftel der Weltbevölkerung leidet unter dem Reizdarmsyndrom.

Es verursacht in den jeweiligen Gesundheitssystemen enorme Kosten, beeinträchtigt deutlich die Lebensqualität der Betroffenen und setzt nachweislich die Produktivität in der Arbeitswelt herab (Whitehead et al. 1992; Hahn et al. 1997, Gralnek et al. 2000; Leong et al. 2003, Müller-Lissner & Pirk 2002; Le Pen et al. 2004; Spiller et al. 2007; Brun-Strang et al. 2007).

Das Reizdarmsyndrom ist ein weitgefasster Symptomenkomplex ungeklärter Ätiologie. Charakterisiert ist dieser Komplex durch chronische (mindestens über zwei Monate) wiederkehrende abdominelle Beschwerden (Blähungen, Schmerzen, Krämpfe) oder Unwohlsein mit veränderten Stuhlgewohnheiten (Diarrhoe, Obstipation, Mischformen), welche die Lebensqualität des Patienten einschränken und aufgrund dessen der Patient ärztliche Hilfe aufsucht (Mearin et al. 2000; Heizer et al. 2009; Drossman et al. 2010; Layer et al. 2011; Bennet et al. 2017).

Die vielfältigen Ausprägungen der Symptome, die ein IBS charakterisieren, sind in verschiedenen Jahren in mehreren Kriterienkatalogen unterschiedlich definiert worden (ROME I-IV, Manning, Kruis, siehe Anhang 6.1.). In 37 epidemiologischen Studien wurde 2007 bestätigt, dass trotz der unterschiedlichen Lebensweise in vielen Ländern der Welt, je nach abgefragten Kriterien, die Prävalenzen in der globalen Bevölkerung zwischen 2,5- 25% liegen (Spiller et al. 2007). Die großen Prävalenzschwankungen lassen sich zum Teil durch die Anzahl der abgefragten Kriterien erklären. Beispielsweise sind bei den Manning-Kriterien (Manning et al. 1978) je nach Anzahl der Kriterien (ein bis sechs) Schwankungen von 2,5 – 37% zu verzeichnen. Bei Verwendung von nur drei Manning Kriterien ergibt sich beispielsweise eine Prävalenz von lediglich 10%. Nach den ROME-III-Kriterien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wird ein IBS als Symptomkomplex definiert, in welchem rezidivierende abdominelle Schmerzen oder abdominelles Unwohlsein für mindestens 3 Tage pro Monat für 3 Monate in Folge, vorhanden sind (Longstreth et al. 2006). Die Symptome sind zusätzlich mit einer Besserung der Beschwerden nach der Defäkation und Beginn der Beschwerden in Assoziation mit einer Änderung der Stuhlfrequenz verbunden.

Symptome, die darüber hinaus die Diagnose Reizdarmsyndrom erhärten, sind:

- Veränderung der Stuhlfrequenz (< 3 mal Stuhlgang pro Woche oder > 3 mal Stuhlgang pro Tag)
- Veränderung der Stuhlkonsistenz (hart/klumpig oder breiig/wässrig)
- mühsame Stuhlentleerung mit starkem Pressen
- gesteigerter Stuhldrang,
- Gefühl der inkompletten Stuhlentleerung,

- per analer Schleimabgang
- Blähungen
- abdominelle Distension (Longstreth et al. 2006)

Die aktuellen ROME IV Kriterien definieren ein IBS als einen Symptomkomplex in dem wiederkehrende abdominelle Schmerzen für mindestens einen Tag in der Woche in den letzten drei Monaten bestehen (Palsson et al., 2016). Zudem sind diese Schmerzen mit zwei oder mehr der folgenden Kriterien assoziiert: Defäkation, Veränderung der Stuhlfrequenz oder assoziiert mit Veränderung der Beschaffenheit des Stuhls. Diese Kriterien müssen mindestens in drei aufeinander folgende Monate vorliegen, mit einem Symptombeginn mindestens 6 Monate vor der Diagnosestellung eines Reizdarmsyndroms (Palsson et al., 2016). Die unterschiedlichen Kriterienkataloge für die Diagnose zeigen auf, mit wie viel wissenschaftlichen Nachdruck versucht worden ist, eine finale Definition für IBS zu etablieren (siehe Anhang 6.1.). Anhand der vorherrschenden Symptome wird ein Reizdarmsyndrom in unterschiedliche Subtypen unterteilt. So unterscheidet man nach dem ROME III Kriterien anhand der Stuhlgewohnheiten den Subtyp mit vorherrschender Diarrhoe (IBS-D), mit vorherrschender Obstipation (IBS-C) und den gemischten Subtyp, bei dem sich Diarrhoe und Obstipation zu gleichen Anteilen manifestieren können (IBS-M) (Guilera, Balboa and Mearin, 2005). Die Altersstufe in der ein Reizdarmsyndrom vornehmlich diagnostiziert wird, befindet sich zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Gibson et al., 2015). Frauen erkranken mit einer Relation von zwei zu eins häufiger an IBS als Männer (Mulak & Taché 2010; Heitkemper & Jarrett 2003). In der ambulanten Erstversorgung, meist durch niedergelassene Hausärzte, wird das Reizdarmsyndrom bei über 12% der Patienten mit gastrointestinalen Beschwerden diagnostiziert, im nordamerikanischen Raum sogar bei knapp 20% der Patienten (Stamboldjiev, 2011). Bei über 25%-35% der gastroenterologischen Patienten wird bei internistisch-gastroenterologischen Fachärzten ein Reizdarmsyndrom festgestellt (Stilwell and Hamlyn, 1983; Russo, Gaynes and Drossman, 1999).

Die hohen Prävalenzen des IBS spiegeln sich auch in der wirtschaftlichen Dimension wider. Die subjektiv verminderte Produktivität und Funktionalität des einzelnen Patienten nimmt großen Einfluss auf die Ökonomie der Länder. Insbesondere Hahn et al. konnten 1997 in ihrer Studie zeigen, dass die empfundene Schwere der IBS Symptomatik einen starken Zusammenhang mit einer verminderten Produktivität und der Funktionalität im Alltag aufweist (Hahn et al., 1997).

Dadurch können sowohl direkte (Arztbesuche, Krankenhausaufenthalte, erweiterte Diagnostik wie Blutteste, Sonographie, CT, Diätberatungen, Medikamente) und indirekte (Arbeitsausfall, verminderte Produktivität in der Arbeit) Kosten im Gesundheitssystem durch IBS Patienten entstehen.

Besonders hohe Kosten können von älteren, hoch symptomatischen IBS Patienten verursacht werden. Die vermehrten Kosten haben erhebliche sozioökonomische Ausmaße (Le Pen et al., 2004; Brun-Strang et al., 2007). In Deutschland zeigte sich eine hohe finanzielle Belastung der

Krankenkassen durch Patienten, die an IBS leiden (Müller-Lissner & Pirk 2002).

Aus dem großen Symptomkomplex ein IBS und den entsprechenden Subtyp diagnostisch zu erfassen und von anerkannten somatischen Erkrankungen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Tumoren des Gastrointestinaltrakts, Infektionen und klassischen Nahrungsmittelallergien und -unverträglichkeiten abzugrenzen, ist im klinischen Alltag eine komplexe diagnostische und klinische Herausforderung und gelingt häufig nicht. Es ist eine breite labordiagnostische und auch eine erfahrungsbasierte, klinische Diagnostik notwendig, um andere Erkrankungen als Genese eines IBS auszuschließen. Bei allen Patienten mit IBS ist zum Ausschluss anderer Erkrankungen initial eine ausführliche Anamnese zu erheben, eine orientierende körperliche Untersuchung, sowie Blut- und Urinuntersuchungen, Atemteste auf Fructose, Lactose, Sorbitol und Glukose, eine Stuhluntersuchung auf pathogene Keime und fäkales Calprotectin A, sowie eine Endoskopie des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts durchzuführen.

Wichtige Differentialdiagnosen, wie eine CED, ein Tumorleiden, eine Fruktose-/Laktose/Sorbitol - Unverträglichkeit, eine Dünndarmfehlbesiedlung (SIBO), Stoffwechselerkrankungen und chronische Infektionen können so ausgeschlossen werden. Insbesondere ist bei der Anamnese auf sogenannte Alarmsymptome zu achten, die eine zeitnahe Diagnostik erfordern, wie Schmerzen abseits des Bauchnabels, Ausstrahlung der Schmerzen, schwere Diarrhoe, sichtbares Blut im Stuhl, Fieber, ungewollte Gewichtsabnahme, Wachstumsstörung, Menstruationsstörungen, Leistungsknick oder tastbare Resistenzen (Layer et al., 2011).

Um die Symptome exakt zu erfassen, sind unter anderem Fragebögen, Ernährung- und Schmerztagebücher sinnvoll (Whitehead et al., 1992; Kajander et al., 2005). Ebenso können Apps, in denen der Patient täglich seine Symptomschwere dokumentieren oder/und seine Ernährung einpflegen kann, wichtige Hilfestellungen für die Beurteilung durch den behandelnden Mediziner sein (Con and De Cruz, 2016).

Sind wichtige Differentialdiagnosen durch die Basisdiagnostik (Anamnese, körperliche Untersuchung, Blutuntersuchungen) nicht auszuschließen, sollten bei Erwachsenen individuell endoskopische, bildgebende, funktionsdiagnostische und ggf. weitere Verfahren eingesetzt werden, um die Symptomatik abzuklären. Bei vorherrschender Diarrhoe wird eine eingehende bildgebende Diagnostik, eine Erregerdiagnostik im Stuhl und eine endoskopische (inklusive Stufenbiopsien) und funktionsdiagnostische Untersuchung empfohlen (Layer et al., 2009).

Da auch nach Durchführung der oben genannten Untersuchungen und Befragungen meist die Symptomatik ungeklärt bestehen bleibt, kommen meist auch andere aufwendigere bildgebende und/oder funktionsdiagnostische Verfahren (MRT, CT, Endosonographien) zum Einsatz (van der Voort et al., 2005; El-Salhy et al., 2015). Aber selbst, wenn diese umfassende Diagnostik ohne Ergebnis verbleibt, die Symptomatik jedoch weiterhin besteht, ist dies nicht beweisend für ein IBS.

So umfasst das Reizdarmsyndrom diesen weitgefassten Symptomkomplex mit abdominellen Schmerzen, Blähungen und Stuhlveränderungen, ohne dass bisher eine detektierbare Pathologie bei der Endoskopie, spezifische serologische oder histologische Biomarker oder andere wegweisende diagnostische Möglichkeiten gefunden worden sind, die das Vorliegen einer klar definierten Krankheit bestätigen können (Longstreth et al., 2006; Lovell and Ford, 2012; Soares, 2014; Camilleri, 2015). In Ermangelung einer eindeutigen Diagnostik bei der Routineuntersuchung wurde diese Erkrankung bisher als vor allem „funktional“ mit psychischer Komponente eingestuft (Drossman et al., 1988; Drossman, 1999; Thompson et al., 1999). Patienten, die auch nach umfassender Diagnostik ohne Diagnose und entsprechend ohne Therapie dauerhaft unter ihren Beschwerden leiden, werden so häufig als psychisch überlagert angesehen. Da in einem solchen Fall auch der behandelnde Arzt keine gezielte Diagnostik oder Therapie anbieten kann, sind die Patienten zunehmend verunsichert und hilflos, und wenden sich häufig (50,9 %) komplementär-alternativmedizinischen Methoden zu, da die Beschwerden weiterhin persistieren, meist auch chronifizieren (Kong et al., 2005).

Auf der Suche nach einer möglichen Genese der Erkrankung zeigte sich in unterschiedlichen Studien, dass 60-80% IBS Patienten beklagen, dass Ihre Beschwerden nach der Nahrungsmittelaufnahme entstehen oder sie sich verschlimmern (Ragnarsson and Bodemar, 1998; Simrén et al., 2001; Böhn et al., 2013). Auch in der allgemeinen westlichen Bevölkerung glauben 25%, dass sie auf bestimmte Nahrungsmittel reagieren.

Ein Drittel dieser Gruppe gibt IBS ähnliche, gastrointestinale Symptome wie Zungenbrennen, Jucken, Übelkeit und Erbrechen, krampfartige Bauchschmerzen, abdominelle Überblähung und Diarrhoe oder Obstipation an (Arslan et al., 2002).

In Doppelblindstudien wurde nachgewiesen, dass Individualdiäten mit Ausschluss bestimmter Nahrungsmittel bei IBS Patienten zu einer deutlichen Symptomverbesserung führen können (May and Bock, 1978; Haddad, 1982; Serafin and Austen, 1987). In neueren Studien zeigte der Ausschluss von fermentierbaren Oligo-, Di- und Monosacchariden, sowie Polyolen (FODMAPs) eine deutliche Symptombesserung bei einigen Reizdarmpatienten (Böhn et al., 2013; Halmos et al., 2014). Jedoch zeigt sich diese FODMAP-Diät nicht überlegen gegenüber den generellen Empfehlungen bei IBS, wie einem ausbalancierten Lebensstil, regelmäßigen Mahlzeiten und der Vermeidung von Kaffee und fettigen Speisen (Böhn et al., 2015).

Auch der alleinige Ausschluss von bestimmten Nahrungsmitteln wie Weizen oder Milch zeigte einen deutlichen Rückgang der Symptome bei einzelnen IBS Patienten (Carroccio et al., 2010). Ebenfalls konnte eine glutenfreie Diät bei einigen IBS-D Patienten einen Rückgang der Symptome sowie der leichtgradigen intestinalen mukosalen Entzündung erreichen (Vazquez–Roque et al., 2013).

Viele der erwähnten Diätstudien konnten zwar die Symptomatik eines IBS Patienten verbessern, sie machten sie allerdings nicht beschwerdefrei. Auch bleibt in den Studien die Frage nach der ursprünglichen Pathophysiologie des IBS der einzelnen Patienten ungeklärt.

Eine allergisch-entzündliche intestinale Reaktion auf bestimmte Nahrungsmittel bei IBS Patienten wurde bereits seit Langem von mehreren Autoren vermutet (Bentley, Pearson and Rix, 1983; Simrén et al., 2001). Monsbakken et al. wies 2005 darauf hin, dass die echte Nahrungsmittelallergie als eine determiniert IgE-vermittelte Reaktion bei negativen IgE- und Pricktesten eher nicht die Ursache eines nahrungsmittelassozierten IBS ist (Monsbakken et al. 2005). Jedoch wurde in der Literatur mehrfach durch unterschiedliche Autoren diskutiert, ob eine allergische Grundveranlagung (Atopie) als eine komplexe, immunvermittelte Reaktion, die sich bei den Patienten sehr unterschiedlich in der Symptomatik äußern kann, in Verbindung zum nahrungsmittelassozierten Reizdarmsyndrom stehen kann (Petitpierre, Gumowski and Girard, 1985; Arslan et al., 2004; Park and Camilleri, 2006; Tobin et al., 2008).

Die Atopie als komplexe pathophysiologische Prädisposition kann über gemeinsame biomolekulare Teil- oder Endstrecken mit dem nahrungsmittelassozierten IBS verbunden sein (Tobin et al., 2008). So ist die Nahrungsmittelsensitivität als Ausdruck eines nahrungsmittelassozierten IBS ein zentraler Gegenstand dieser Arbeit. Nach der „revised nomenclature for allergy“ umfasst eine Nahrungsmittelsensitivität sowohl die klassische Nahrungsmittelallergie als auch eine nicht-allergische Nahrungsmittelsensitivität (Johansson et al., 2004).

Wenn sich eine IgE vermittelte Reaktion nachweisen lässt, wird dieses entsprechend als „Allergie“ bezeichnet. Nicht IgE vermittelte sowie nicht immunologisch nachweisbare Reaktionen auf Nahrungsmittel können als nicht-allergische Nahrungsmittelhypersensitivität oder auch Nahrungsmittelsensitivität bezeichnet werden (Ortolani et al., 1999; Bindslev-Jensen et al., 2004).

Da es bisher weder möglich war, eine direkte pathologische intestinale Reaktion auf Nahrungsmittelallergene, noch die direkten pathophysiologischen zellulären Veränderungen aufzuzeigen, die zu den nahrungsmittelinduzierten Beschwerden bei IBS führen könnten, lag es nahe, IBS Patienten mit einer objektiven Diagnostik auf pathologische intestinale, nahrungsmittelinduzierte Reaktionen hin zu untersuchen. Nur so ist die valide Aussage möglich, welcher IBS Patient auf welche Nahrungsmittelallergene reagiert und welche Nahrungsmittelallergene für eine evidenzbasierte Ausschlussdiät zu beachten sind.

Allerdings war dieses bisher nicht möglich gewesen, denn konventionelle Endoskopien waren bei IBS Patienten bisher in der Regel als makroskopisch unauffällig eingestuft worden (Chadwick et al., 2002).

Erstmals ist es bei einem Teil der IBS Patienten gelungen, Reaktion auf Nahrungsmittel als Auslöser der IBS Symptomatik mithilfe einer endoskopischen Methode, der konfokalen Endomikroskopie (CLE) zu detektieren (Fritscher-Ravens et al., 2014). Die CLE ermöglicht es, die Darmschleimhaut

in einer 1000-fachen Vergrößerung darzustellen und kleinste, mikroskopische Veränderungen zu sehen.

Bringt man bestimmte Nahrungsmittelallergene auf die Oberfläche des Duodenums, so kann man mittels CLE sehen, ob auf mikroskopischer Ebene Veränderungen stattfinden – es findet also eine dynamische, in-vivo Reaktion statt. So kann man beispielsweise anhand der Erhöhung der Anzahl der Lymphozyten, der Erweiterung des intervillösen Raums und dem Austreten von intravasaler Flüssigkeit über Epithelaufbrüche eine intestinale in-vivo Reaktion auf Nahrungsmittel ermitteln.

In einer ersten Pilotstudie konnte eine solche Reaktion bei 61% der untersuchten IBS Patienten nachgewiesen werden (22 von 36 Patienten; CLE+), bei 39% Patienten zeigte sich keine Reaktion in der CLE (12 von 36 Patienten; CLE-). Nach der Reaktion in der CLE konnte bei 74% der IBS Patienten nach einer nachfolgenden einjährigen Ausschlussdiät eine Beschwerdefreiheit oder zumindest >80% Besserung innerhalb kurzer Zeit (meist innerhalb von 2 Wochen) erzielt werden (16 von 22 CLE+ Patienten) (Fritscher-Ravens et al., 2014). Obwohl die pathophysiologischen Reaktionen in der CLE bereits nach wenigen Minuten auftraten, zeigten sich die klinischen Symptome individuell deutlich zeitverzögert.

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, wie schwer es ist, allein anhand von diätetischen Interventionsstudien eine valide und objektive Diagnostik beziehungsweise Therapie bei IBS Patienten vorzunehmen.

Allerdings ist die Methode der CLE sehr komplex, die Endoskope sind sehr teuer und es wird eine ausgesprochene Untersucherexpertise benötigt, um diese Endoskopie durchzuführen. Sie ist deshalb als allgemeine Screeningmethode im ambulanten und klinischen Alltag momentan noch nicht geeignet. Die CLE könnte aber durchaus als möglicher Goldstandard zur Bestimmung dieser vermutlich immunvermittelten, nicht- IgE-assoziierten Nahrungsmittelsensitivität eingesetzt werden. Die so gewonnenen Daten könnten dann als Grundlage für weitere Erkenntnisse und weiterführende Untersuchungen dienen. Fand in der Studie in der CLE eine Reaktion auf ein Nahrungsmittel statt, und führte die darauffolgende Ausschlussdiät dieses Nahrungsmittels zur deutlichen Symptombesserung, war eine Nahrungsmittelsensitivität nachgewiesen (Fritscher-Ravens et al., 2014).

Bisher gibt es weder ein pathophysiologisches oder psychopathologisches Erklärungsmodell noch eindeutig bestimmbare Biomarker für den Nachweis von IBS (Spiller, 2011; Camilleri, 2015; Kim, Lin and Pimentel, 2016). Daher war es innerhalb dieser Arbeit das vorrangige Ziel zu eruieren, ob es möglich ist, Biomarker von einem mittels CLE und Ausschlussdiät evaluierten und nachweislich auf Nahrungsmittel reagierenden Patientenkollektiv zu gewinnen und auszuwerten. Diese würden dann möglicherweise in der ambulanten hausärztlichen Situation für die Diagnostik einer Nahrungsmittelsensitivität bei IBS Patienten herangezogen werden können.

In der Literatur wurden bereits unterschiedliche Biomarker für ein IBS untersucht. Hier wurden unter anderem sowohl Entzündungsmarker, Auto- Immunreaktionen und exogene Stressoren wie

Bakterien in Betracht gezogen, die eine Pathologie im Darm mit mikroskopischen und molekularen Veränderungen bei IBS Patienten vermuten lassen (Sinagra et al., 2016).

Es stellte sich allein die Messung der gastrointestinalen Transitzeit mit Radioisotopenmarkern eine reproduzierbare und etablierte Methode dar, um eine Unterform des IBS mit einer gewissen Sicherheit zu diagnostizieren. Diese ist jedoch immer noch mit einem hohen Kosten- und komplexen Arbeitsaufwand verbunden und bedarf einer weiteren Standardisierung (Spiller, 2011).

Daher lag unser Fokus insbesondere auf solchen Biomarkern, die auch ohne hochaufwendige Labordiagnostik von einem eventuell prognostischen Nutzen für die ambulante Betreuung von IBS Patienten sein könnten.

Bisher war es nicht möglich, IBS Patienten mit Reaktion auf Nahrungsmittel mit Sicherheit zu definieren, ein Umstand, der jetzt durch die diagnostische CLE Methode in die Realität umgesetzt werden konnte. Somit konnte in dieser Arbeit auch der Versuch unternommen werden entsprechende Biomarker auszuwerten. Zusätzlich wurde hinterfragt, ob pathophysiologische Veränderungen an der Mukosa der Duodenalschleimhaut bei Patienten mit Nahrungsmittelsensitivität vorliegen, die für künftige diagnostische und therapeutische Schritte für die Behandlung des IBS nutzbar sind.

1.1. Zielsetzung

Das Ziel meiner Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich bestimmte Parameter, die bisher nicht als „Routineparameter“ angesehen werden, wohl aber auf das Vorliegen einer Nahrungsmittelsensitivität bei IBS hindeuten können, als diagnostisch und prognostisch relevant herausstellen.

Ausgewertet wurden dafür Biomarker aus zwei größeren klinisch-experimentellen, prospektiven Studien, in der mittels CLE IBS Patienten auf Nahrungsmittelsensitivitäten getestet wurden. Die CLE wurde hier als Goldstandard gewählt, da sie sich in der vorausgehenden Studie als wertvolles diagnostisches Instrumentarium bei IBS Patienten auszeichnete (Fritscher-Ravens et al., 2014). Durch die CLE war es durch objektiv messbare Kriterien möglich geworden, eine Positivreaktion auf Nahrungsmittel bei IBS Patienten zu detektieren. Bei Vorliegen einer endoskopisch nachgewiesenen Reaktion auf ein oder mehrere Nahrungsmittelallergen(e) konnte bei den positiv reagierenden Patienten durch anschließende Ausschlussdiät des in der CLE nachgewiesenen Antigens eine deutliche klinische Besserung nachgewiesen werden. Die individuellen Ausschlussdiäten hatten somit zu einer Besserung der IBS Symptomatik geführt und waren so nicht nur eine diagnostisch-klinische Bestätigung der CLE, sondern repräsentierten gleichzeitig die Therapie. Die von diesen CLE+ Patienten gewonnenen Proben und Informationen lieferten die Grundlage für diese Arbeit.

Mit der Evaluierung von Biomarkern für eine Nahrungsmittelsensitivität bei IBS wurde versucht, weitere Hinweise für das pathophysiologische Verständnis und die Genese dieser Erkrankung zu finden, aber auch die klinische Diagnostik zu erleichtern. Daher war es wichtig, solche Biomarker zu wählen, die auch im ambulanten Klinikalltag zur Untersuchung herangezogen werden können, um eine Praktikabilität in der möglichen Anwendung zu schaffen. So wurden insbesondere die histologische Zellzählung intraepithelialer Lymphozyten (IEL) und eosinophiler Granulozyten (EOS), die laborchemische Auswertung des eosinophilen kationischen Proteins (ECP) und der Tryptase aus der Spülflüssigkeit nach der Endoskopie, sowie die Anamneseerfragung bezüglich einer atopischen Vorgeschichte untersucht.

Zusammenfassend ist das Ziel der Arbeit, anhand von Informationen und Daten von IBS Patienten, die in der CLE positiv auf ein Nahrungsmittelallergen getestet und unter Ausschlussdiät des positiv getesteten Antigens beschwerdefrei wurden, zu eruieren, ob ausgewählte Biomarker zur Diagnostik geeignet und richtungsweisend für eine Nahrungsmittelsensitivität bei IBS sind. Diese Untersuchungen sollten auch zum tieferen Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen bei IBS Patienten mit Nahrungsmittelsensitivität beitragen und potentielle Ansätze für die Entwicklung zukünftiger diagnostischer und therapeutischer Strategien liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemein

Diese Arbeit beinhaltet Daten aus zwei Studien, die von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität, Kiel, genehmigt (A 139/12; V 604/14) und bei clinicaltrials.gov registriert wurden (Registrationsnummer: NCT01139424; Registrationsnummer: NCT01692613).

Im Vorfeld der eigentlichen endomikroskopischen Untersuchung zur Studie wurden die Patienten ausführlich über den Sinn einer Studie und über die Studie selbst aufgeklärt und hatten sich schriftlich zur Teilnahme einverstanden erklärt.

2.2. Studienprotokoll

In dem Zeitraum von 2014 – 2018 bewarben sich über 950 Patienten initial in der experimentellen Endoskopie für die beiden durchgeführten Studien. Auf diese Anfragen wurden der Informationsbogen 6.2. ausgegeben und Fragen bezüglich der Studie telefonisch oder persönlich vor Ort beantwortet. Von diesen wurden anschließend 170 Patienten für die Studie ausgewählt, die teilweise über die Hausärzte, die Ambulanz der Inneren Medizin oder durch Selbstdiagnose ein Verdacht auf ein IBS aufgrund einer Nahrungsmittelsensitivität angaben.

Es erfolgte eine ausführliche Anamneseerhebung. Erschien der Patient mit seinem Beschwerdebild geeignet, wurde die Studie erläutert und die Einverständniserklärung (siehe Anlage 6.3.) mit dem Patienten besprochen.

Bei diesem ersten Termin wurde eine primäre (baseline) Erhebung der Symptomschwere mittels Fragebögen/Symptomscore (Symptomscore 1) durchgeführt. Hier bestand der einzige Unterschied zwischen den beiden Studien.

In der früheren Studie bestand die Erhebung des Symptomscores aus einer klinischen Befragung der Patienten mittels eines einzigen Fragebogens, der zur Erfassung der Symptomschwere diente. Die Patienten wurden aufgefordert ihre Symptome zu klassifizieren. Zur Bewertung wurden die grundlegenden Elemente der visuellen Analogskala (VAS-IBS) benutzt (Bengtsson, Ohlsson and Ulander, 2007), sowie eine numerische Skalierung von 100% (schwere Symptomatik, keine Besserung) bis 0% (vollkommene Remission der anfänglichen IBS Beschwerden). Es wurden IBS Symptome wie abdomineller Schmerz, abdominelle Distension und Flatulenz, Stuhlgangfrequenz und Stuhlgangbeschaffenheit (Diarrhoe, Obstipation) bewertet.

Auch psychische Veränderungen und Auffälligkeiten (Ängstlichkeit und depressive Verstimmungen) während der Studie sind nach der VAS bewertet worden. Diese dienten aber als Grundlage zur Bewertung der Symptombesserung nach Ausschlussdiät.

In der Folgestudie wurde die Erhebung mittels Fragebögen intensiviert. Hier bestand die Auswertung der Symptomschwere aus 4 verschiedenen Fragebögen. Die vier Fragebögen setzten sich wie folgt zusammen:

1. Irritable Bowel Syndrome Severity Scoring System (IBSSS) (Francis, Morris and Whorwell, 1997)
2. Patient Health Questionnaire 12 Somatic Symptom Scale (PHQ12SS) (Spiller et al., 2010)
3. Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD) (Zigmond and Snaith, 1983)
4. Bristol Stool Scale (Lewis and Heaton, 1997).

Die Patienten wurden dazu aufgefordert 7 Tage die Stuhlgangfrequenz, die Beschaffenheit des Stuhls, sowie zusätzliche Symptome zu dokumentieren. Mithilfe der Bristol Stool Scale konnte der Patient seine Stuhlbeschaffenheit einem Punktsystem zuordnen (Lewis and Heaton, 1997). Durch diesen Fragebogen lassen sich Rückschlüsse auf die Darmpassagezeit ziehen und dem Patienten ist dadurch eine sehr genaue Dokumentation der Stuhlgangfrequenz über mehrere Tage möglich, was eine Durchschnittsberechnung sehr viel exakter werden lässt. Diese Fragebögen mussten jeweils als „baseline“ und nach jeder der Diäten ausgefüllt werden. Die Symptomscores wurden eingeführt, um das Ausmaß der klinischen Besserung objektiv und so genau wie möglich bestimmen zu können. Diese Ergebnisse wurden in dieser Doktorarbeit miteingebracht (die Erhebung und Analyse der Fragebögen sind Teil einer weiteren Doktorarbeit). Nach Einschluss in die Studie, erhielten die Patienten zunächst eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD), in der eine makroskopische Befundung des Ösophagus, des Magens und des Duodenums stattfand, sowie Biopsien und Flüssigkeitsentnahme aus dem tiefen Duodenum (n=8) zur weiteren Aufarbeitung, zum Beispiel wurden hier IEL in der Histologie ausgezählt.

Nach mindestens 2 Wochen wurde die CLE mit Austestung der Nahrungsmittelallergene durchgeführt. Eine 2-wöchige Interimsperiode war notwendig, um die Biopsieläsionen, die durch die Probenentnahme im tiefen Duodenum bei der ÖGD entstanden war, heilen zu lassen, um Artefakte bei der endomikroskopischen Untersuchung zu vermeiden. Nach der Austestung der Nahrungsmittelallergene wurden zum Ende der endomikroskopischen Untersuchung Proben zur histopathologischen und biochemischen Analyse (IEL, EOS, ECP und Tryptase) entnommen, um sie mit den baseline Proben, die während der ÖGD entnommen worden waren, vergleichen zu können.

Um die Patienten mit einer fraglichen Nahrungsmittelsensitivität nach positiver CLE auf die Richtigkeit der dargestellten Reaktion klinisch zu testen, wurde zunächst eine jeweils zwei -wöchige randomisierte, placebo-kontrollierte, verblindete Cross-over-Diät (mit und ohne Ausschluss der in der CLE positiv getesteten Nahrungsmittelallergene) durchgeführt. Zwischen diesen Diäten wurde eine Interims-/"Washout"-phase von mindestens zwei Wochen eingehalten, in der keine Diät durchgeführt wurde.

Durch den verblindeten Ausschluss des die Reaktion auslösenden Agens und einer „Sham“ Diät (Placebo-Diät) konnte die Wahrscheinlichkeit eines Placebo/Nocebo-Effekts beim Patienten reduziert werden. Eine Symptombesserung nach diätetischem Ausschluss des vorher geblindeten, während der CLE reagierenden Antigens bewies die Reaktion auf ein Nahrungsmittel.

Nach Abschluss dieser insgesamt 6-wöchigen Cross-over-Diätphase wurde mit den Patienten das CLE Ergebnis, sowie das Diätergebnis besprochen. Lag eine Symptomverbesserung nach Verum-Diät aufgrund eines positiven CLE Ergebnisses vor, führten diese CLE+ Patienten ab diesem Zeitpunkt eine langfristige, individuelle Ausschlussdiät durch. Hier wurde das in der CLE und durch die Cross-over-Diäten bestätigte Nahrungsmittelallergen aus der täglichen Nahrungsaufnahme dauerhaft und von den Patienten bewusst ausgeschlossen. Die Nachkontrolle dieser Patienten erfolgte mit Follow-up Gesprächen zu festgelegten Zeitpunkten. Ein initiales Follow-up Gespräch war nach den ersten 2 Wochen der Individualdiäten und Aufklärung der Ergebnisse erfolgt. Nach 3 Monaten wurde ein weiteres Follow-up Gespräch geführt, in dem der Symptomscore 2 erhoben wurde. Abschließend erfolgte nach 6 Monaten ein drittes Follow-up Gespräch mit Erhebung des Symptomscore 3.

Zusätzlich wurden die Patienten bei jedem Follow-up Termin nach der Durchführung der Ausschlussdiäten befragt, aber besonders intensiv und ausführlich beim initialen Follow-up Termin. Zeichneten sich Probleme mit der Durchführung der Diät ab, wurde eine intensivierete Diätberatung durchgeführt. Den Patienten war es nicht erlaubt ihre Ausschlussdiät zu verändern oder eine Medikation für die gastrointestinale Symptomatik einzunehmen. Bei unerwarteten Symptomverschlechterungen wurde für aktuelle und ehemalige Studienteilnehmer Wiedervorstellungen vereinbart und, wenn erforderlich, weiterführende Diagnostik initiiert.

Bei Patienten mit deutlich erhöhten IEL Werten in der histologischen Begutachtung (über 30/100 IEL) (Normwerte < 25/100 IEL) wurden Kontrollgastroskopien nach spätestens einem Jahr durchgeführt, um zu eruieren, ob die IEL Erhöhung durch Allergenentzug rückläufig war (Walker et al., 2009).

Das Studienprotokoll

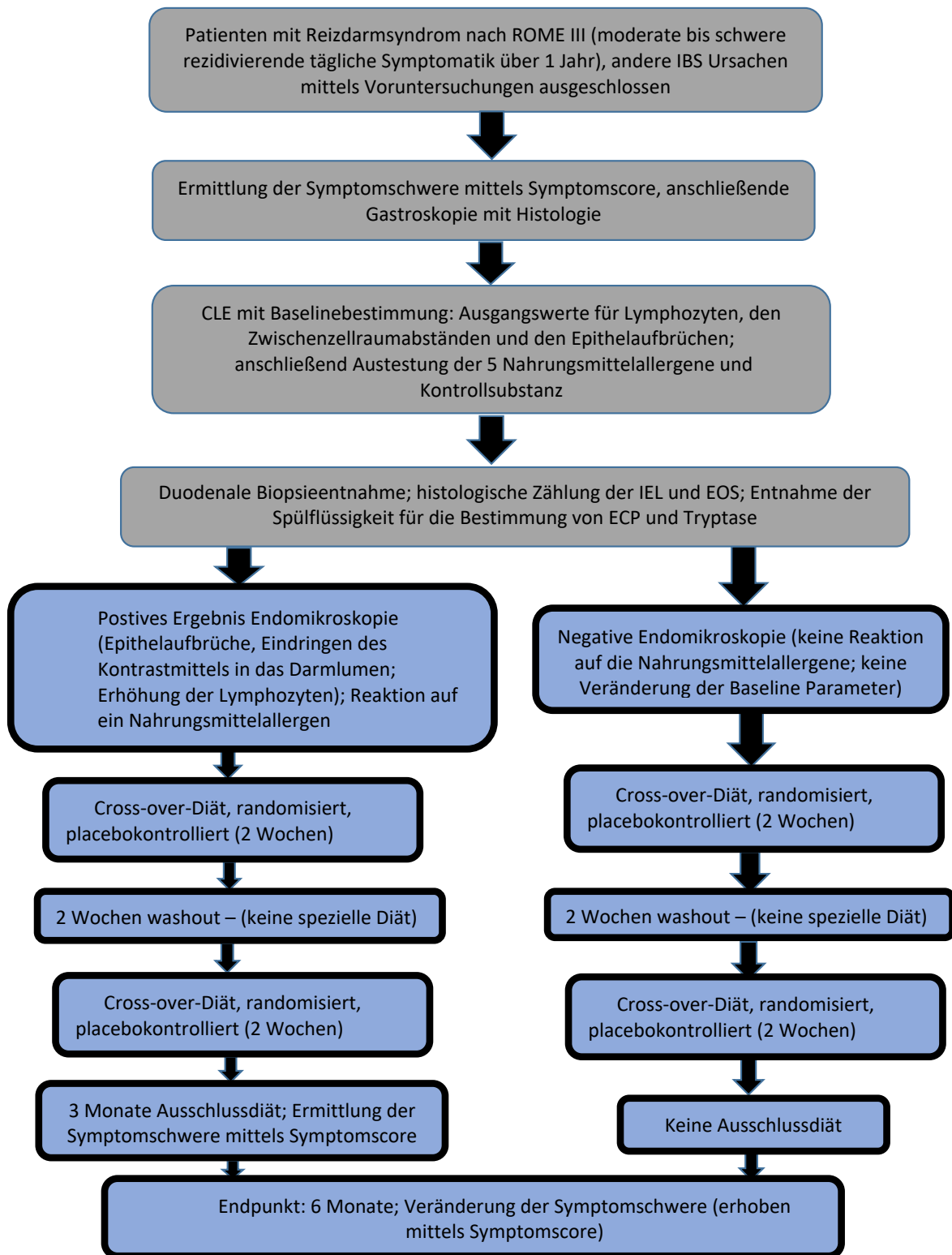


Abbildung 1: Studienprotokoll.

2. 3. Patienten

Die Patienten wurden initial von einem erfahrenen Gastroenterologen gesehen. Es wurde eine ausführliche Anamnese erhoben, Voruntersuchungen genauestens durchgesehen und eine körperliche abdominelle Untersuchung durchgeführt. Anhand dieser Befunde wurden die Patienten anschließend anhand der Rom III Kriterien als IBS Patienten eingestuft und in die Studie eingeschlossen (Longstreth et al. 2006).

Während der ausführlichen Anamneseerhebung wurden die Patienten auch und insbesondere nach ihrer eigenen und Familienanamnese in Hinblick auf eine mögliche Atopie befragt. Es wurde hier sowohl nach möglichen inhalativen (einem allergischen Asthma bronchiale, einer allergischen Rhinitis etc.) oder dermatologischen (einer atopischen Dermatitis, Urtikaria, einem rezidivierenden Augenlidkzem etc.) Reaktionen in der Vorgeschichte des Patienten oder bei Verwandten 1. Grades gesucht. In unklaren Fällen erfolgte eine dermatologische, beziehungsweise allergologische Abklärung.

Alle Patienten mussten zusätzlich eine serologisch laborchemische Basisuntersuchung, Ergebnisse einer ÖGD und Koloskopie, von Atemtesten (Glukose, Laktose, Sorbitol und Fructose), Elastase im Stuhl sowie die histologischen Befunde der Duodenal- und Kolonbiopsien, die in den letzten 12 Monaten durchgeführt worden war, vorlegen, um andere organische Ursachen der IBS Symptomatik auszuschließen. Zusätzlich wurde ein serologischer Antikörpertest (IgA und IgG) gegen Gewebstransglutaminase gefordert, sowie bei unklaren Fällen zusätzliche Blutuntersuchungen (HLA – DQ 2/DQ 8), um eine Zöliakie auszuschließen (siehe Anlage 6.2.: Patienteninformationsblatt Studie). Wenn sich durch keinen der geforderten Untersuchungsbefunde die gastrointestinalen Beschwerden erklären ließen und Infektionen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, gastrointestinale Blutungen oder bakterielle Überwucherung ausgeschlossen waren, wurden die Patienten zur Studie zugelassen.

Die Patienten, bei denen eine Laktose-/Fruktoseunverträglichkeit vorlag und die trotz streng laktose-/fruktosefreier Diät keine signifikante Besserung der Symptomatik zeigten, wurden auch in die Studie als IBS-Patienten aufgenommen. Die Ausschlussdiäten wurden in diesen Fällen individuell angepasst.

Bei weiblichen Patienten wurde die endomikroskopische Untersuchung nicht während der Menstruation durchgeführt. Bei einer bekannten Überempfindlichkeit gegenüber Fluorescein und/oder Methylenblau wurden die Patienten ebenfalls ausgeschlossen.

Bei Patienten, bei denen eine Nahrungsmittelsensitivität aus der Anamnese nicht eindeutig als „wahrscheinlich“ zu erheben war, wurde zunächst eine zusätzliche 3-tägige Reisdiet (ausschließlich weißen, geschälten Reis, gekocht mit Salz und Wasser) durchgeführt.

Reis ist eines der Nahrungsmittel, die ein nur geringes allergenes Potential aufweist und dessen komplexe Kohlenhydrate weitestgehend ohne intestinale Gasbildung im Dünndarm resorbiert werden können (Levitt et al., 1987).

Es hat einen relativ geringen Anteil an Faserstoffen im Vergleich zu anderen Kohlenhydratlieferanten, was für bestimmte IBS Patienten einen Vorteil darstellt (Gonlachavit, 2010). Aufgrund mehrerer klinischer Studien, die Reis als einen wichtigen Kohlenhydratbestandteil ihrer Ausschlussdiäten benutzen, konnte gezeigt werden, dass IBS Patienten sowohl in geblindeten, kontrollierten als auch nicht geblindeten, offenen Studien von diesen Ausschlussdiäten profitieren (Bentley, Pearson and Rix, 1983; Farah et al., 1985; Nanda et al., 1989; Burden, 2001). Daher wird eine 3-tägige Reisdiaät eingesetzt, um zu testen, ob die Symptomatik der Patienten sich unter einer hypoallergenen Diät bessert.

Wenn sich in diesen drei Tagen keine Veränderungen der abdominalen Beschwerden abzeichneten, war eine durch Nahrungsmittel verursachte Beschwerdesymptomatik eher unwahrscheinlich. Daher wurden solche Patienten initial nicht mit in die Studie aufgenommen, sondern auf andere Ursachen hin untersucht.

2.3.1. Kontrollpatienten

Patienten mit einem Barrett-Ösophagus, die eine ÖGD und CLE zum Ausschluss einer dysplastischen Veränderung erhielten, wurden als Kontrollpatienten rekrutiert. Keiner der Patienten zeigte eine IBS Symptomatik, die durch die 4 Fragebögen erhoben wurde. Bei den Kontrollpatienten wurde zusätzlich zur CLE am Ösophagus eine endomikroskopische Untersuchung mit Austestung der Nahrungsmittel am Duodenum durchgeführt, sowie eine Biopsieentnahme aus dem tiefen Duodenum und Entnahme von Spülflüssigkeit nach der Nahrungsmittelprovokation wie auch bei den IBS Patienten. Falls in der histologischen Untersuchung der Duodenalbiopsien pathologische Veränderungen (IEL/100 Epithelien > 25 IEL, entzündliche oder neoplastische Veränderungen) auffielen, wurden diese Kontrollpatienten ausgeschlossen.

2.4. Endomikroskopie

Vor der Untersuchung mit der Endomikroskopie hielten die Patienten mindestens eine 6-8 stündige Nahrungskarenz ein. Die Untersuchung erfolgte durch eine in der endomikroskopischen Untersuchung erfahrene Gastroenterologin (Frau Prof. Dr. Fritscher-Ravens). Zur endoskopischen Untersuchung wurden alle Patienten routinemäßig mittels intravenöser Gabe von Propofol (Disoprivan®) über eine periphere Braunüle tief sediert.

Als Routinevorgang bei den meisten Endoskopien ermöglicht die tiefe Sedierung durch die Ruhigstellung des Patienten eine hohe Bildqualität der duodenalen Mukosa ohne Bewegungsartefakte.

Das flexible Endomikroskop (EC-387CILK, Pentax, Tokyo, Japan) wurde unter Vermeidung möglicher iatrogenen Epithelschäden, die fälschlicherweise als positive Reaktion hätten gedeutet werden können, in das tiefe Duodenum eingebracht und positioniert, bevor 5 ml 10% iges Fluorescein (Flourescein Alcon®, Novartis Pharma GmbH) zur Darstellung der duodenalen Mukosa und 40 mg Buthylscopolaminbromid (Buscopan®, Cc-Pharma GmbH) zur Ruhigstellung des Darms intravenös verabreicht wurden.

Das Endomikroskop verwendet eine Laserdiode mit geringer Leistung im sichtbaren Blaulichtbereich mit einer emittierten Wellenlänge von ca. 488 nm. Durch die intravenöse Gabe von Fluorescein und die Anreicherung der extrazellulären Matrix des duodenalen Epithels sowie der Lamina propria war es möglich, die Oberflächenstruktur im Duodenum bis auf Zellebene (0,7 µm laterale Auflösung) darzustellen. Ebenso kontrastierte das Fluorescein Kapillargefäße und die Enterozyten der oberflächlichen Darmwand. So war es möglich, nach Provokation mit Nahrungsmittelallergenen innerhalb der Untersuchung, ein eventuelles Kapillarleck beziehungsweise einen Epithelschaden zu detektieren. Nach Aktivierung des Lasers wurde der „Normalzustand“, die „baseline“, erfasst und sichergestellt, dass kein Epithelschaden vorlag, der eine positive Reaktion vortäuschen würde. Die aufgebrauchten Allergene (Weizen, Hefe, Kuhmilch, Soja und Hühnereiweiß) wurden in für den Untersucher geblindeten (außer Kuhmilch) 20 ml Spritzen angereicht und durch den Arbeitskanal im Duodenum aufgebracht. Dafür wurden 2 g Weizenmehl (Typ 405), 1 g Hefe (Trockenbackhefe) oder 2 g Soja in 20 ml sterilem Wasser aufgelöst. Die Kuhmilch (homogenisiert, 3,5 % Fett) wurde mit 30 % sterilem Wasser verdünnt und war wegen der weißen Farbe für den Untersucher erkennbar. Als Kontrollsubstanz wurden 2 ml Simeticon (Sab Simplex®, Kohlpharma GmbH) mit 18 ml sterilem Wasser benutzt. Diese Kombination hatte eine ähnliche Trübung wie die Nahrungsmittelkomponenten und konnte visuell nicht unterschieden werden, was die geblindete Reihenfolge der Untersuchungssubstanzen sicherstellte.

Das Darmepithel wurde durchgehend bis 5 Minuten nach Aufbringung jedes einzelnen Allergens am Monitor beobachtet. Es wurden Bilder vor und nach Nahrungsmittelprovokation aufgenommen, um folgende Parameter später genauer untersuchen bzw. zählen zu können.

- 1) die Anzahl der IEL im endomikroskopischen Bild (4 standardisierte 5 x 5 cm große Areale mit 250 x 250 Pixeln (Kantenlänge 500 µm; Farbtiefe: 250 Bit; 1 Pixel: 0.46 µm) zum Zeitpunkt der baseline Aufnahmen und nach der Nahrungsmittelprovokation,
- 2) die Anzahl der Epithelaufbrüche pro 1000 Epithelzellen in 5 verschiedenen Orten,
- 3) die Breite des intervillösen Raums (IVR): Pixelmessung (1 Pixel = 0,46 µm (475 µm/ 1024 Pixel) an 4 verschiedenen Orten. Eine Aufweitung des IVR signalisierte, dass Fluorescein in das Duodenallumen ausgetreten war und war einer der Basisparameter, der eine positive Reaktion auf ein Nahrungsmittel signalisierte.

Wenn sichtbare Veränderungen bei zwei dieser 3 Kriterien detektiert wurden, wurde dieses als CLE positive Reaktion definiert. Die Gesamtuntersuchungszeit wurde auf maximal 25-30 min limitiert, da danach der physiologische Abtransport von Fluorescein ins Darmlumen einsetzte, was die Bildqualität beeinträchtigte.

Wenn eine positive Reaktion nachgewiesen wurde, musste die endomikroskopische Untersuchung beendet werden, da nach deutlichem Austritt des Fluoresceins in das Darmlumen, eine erneute Reaktion auf ein zweites Allergen aufgrund der dann schon geschädigten Darmepithelbarriere nicht mehr zu detektieren ist. Die vom Untersucher generierten endomikroskopischen Bilder wurden nach entsprechender Ausbildung anschließend von zwei Doktoranden, die gegenüber der Allergenprovokation geblindet waren, zur detaillierten Befundung gesichtet und mit dem Untersucher re-evaluiert.

2.5. Biomarker

Eine Auszählung der baseline IEL im immunhistochemischen Schnitt wurde bei den tiefen Duodenalbiopsien, die mit einem Biopsiekatheter (EndoJaw SwingJaw 2,45 mm, OLYMPUS, Tokio, Japan) die bei der initialen Gastroskopie mindestens 2 Wochen vor der CLE gewonnen wurden, durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss an die Nahrungsmittelprovokation wurden erneut Duodenalbiopsien gewonnen. Diese wurden nach histologischer Aufarbeitung auf die Biomarker IEL (nach Nahrungsmittelprovokation) und EOS untersucht. ECP und Tryptase wurden laborchemisch aus der Spülflüssigkeit, die auch im Anschluss an die Nahrungsmittelprovokation durch einen ERCP Katheter (CANB3-18-200-35, medwork, Höchststadt, Deutschland) entnommen worden war, bestimmt. Die anamnestische Erfragung einer atopischen Vorgeschichte erfolgte bei der Erstvorstellung der Patienten.

2.5.1. Intraepitheliale Lymphozyten

Die Duodenalbiopsien für die IEL Zählung wurden in der initialen Gastroskopie (baseline IEL) und mind. 2 Wochen später unmittelbar nach der Nahrungsmittelprovokation als letzte Maßnahme zum Ende der Endomikroskopie entnommen und unmittelbar nach der Entnahme in Formalin (verdünnte und gepufferte Formalaldehydlösung) eingelegt. Anschließend wurden diese in Paraffin aufgearbeitet, in 3-5 Mikrometer Dicke geschnitten und mit HE und PAS eingefärbt. Mittels einer immunhistochemischen Färbung gegen CD3 als T-Zell-Marker (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) wurden die IEL angefärbt.

Das (automatische) Wiederauffinden der Antigene wurde durch die Einbettung in ER 1 (Citrat Buffer, pH 6,0) mit dem Autostainer Bond [™] Max System und dem Polymer Refine Kit (Leica, Berlin, Deutschland) ermöglicht.

Die IEL wurden bei ununterbrochenen Duodenalepithelabschnitten in repräsentativen Arealen von über 50 benachbarten Epithelzellen gezählt. Insgesamt wurden 200 Epithelzellen gezählt.

Duodenalbiopsien mit IEL Werten über 25 werden im Gegensatz zu einer älteren Vorstellung, bei der der Cut-off bei 40 IEL lag, als pathologisch erachtet und sollten im Sinne einer Abklärung einer Zöliakie und anderen pathologischen Darmveränderungen untersucht werden (Walker et al., 2009).

Daher wurden die IEL Werte der Patienten dieser Arbeit erstmals bereits bei der ÖGD bestimmt. Bei Werten über 25 IEL/100 Epithelien wurde eine erweiterte gastroenterologische Abklärung initiiert, um andere mögliche Ursachen dieser Erhöhung auszuschließen.

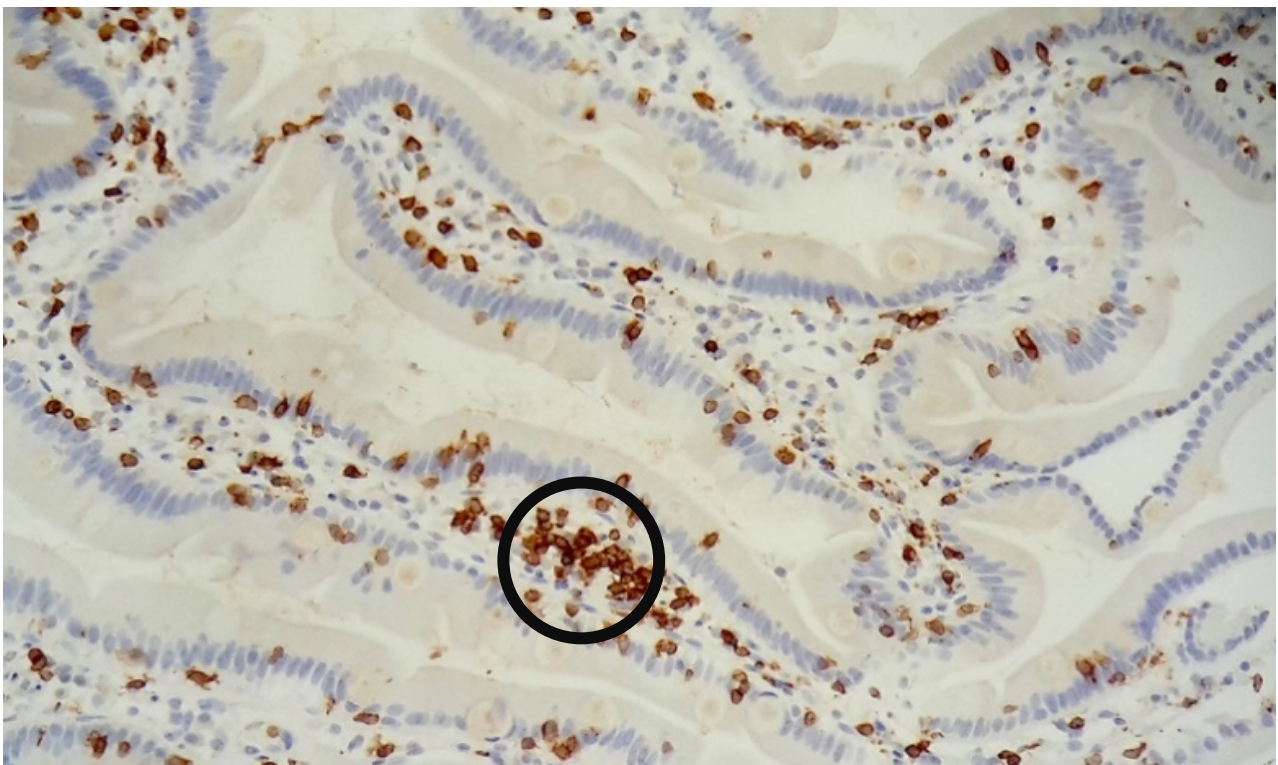


Abbildung 2: Schwarz markierter Kreis: Anhäufung mehrerer Lymphozyten in der Lamina propria, im oberen Bereich intraepitheliale Lymphozyten (bräunlich gefärbt) der Duodenalschleimhaut; Longitudinalschnitt, 100-fache Vergrößerung, immunhistochemische Färbung gegen CD3.

2.5.2. Eosinophile Granulozyten

Für die Bestimmung der eosinophilen Granulozyten (EOS) erfolgte die Biopsieentnahme nach der Nahrungsmittelprovokation in der Endoskopie im tiefen Duodenum.

Auch diese Biopsien wurden in eine Formalinlösung (verdünnte und gepufferte Formalaldehydlösung) gegeben, um das Gewebe zu fixieren, nachfolgend in Paraffin aufgearbeitet und in 3 bis 5 µm dicke Schnitte geschnitten und anschließend mit HE eingefärbt.

Die HE-Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (DM300 Lichtmikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland)) unter 400-facher Vergrößerung (10x (Okular) mal 40x (Objektiv) = 400-fache Mikroskop-Vergrößerung) untersucht.

Es wurden zehn HPF (high power fields, mikroskopische Begutachtung mit 400-facher Vergrößerung (10x (Okular) mal 40x (Objektiv)) in repräsentativen Arealen, die sowohl Stroma als auch Epithel aufwiesen, gezählt. Hier wurde darauf geachtet, dass die EOS durch ihre Mehrkernigkeit und die starke eosinophile Zellplasmafärbung deutlich zu erkennen waren.

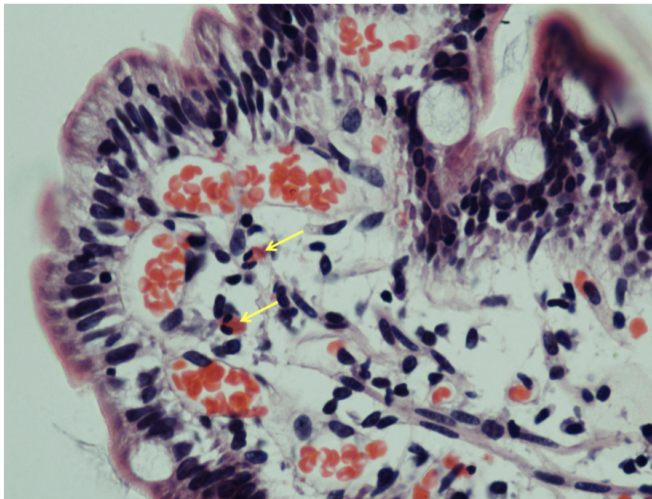


Abbildung 3: Duodenalschleimhaut bei 400-facher Vergrößerung im HE-gefärbten Transversalschnitt, die gelben Pfeile zeigen auf EOS, Aufnahme durch Scan des Präparats.

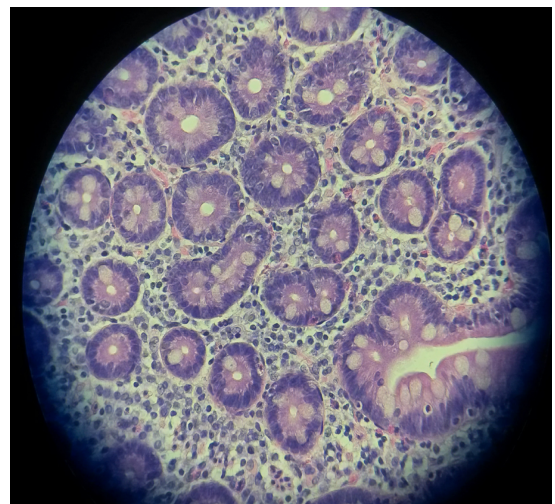


Abbildung 4: HPF eines HE-gefärbte Transversalschnittes im Lichtmikroskop mit 200-facher Vergrößerung betrachtet; die Aufnahme erfolgte durch das Okular des Lichtmikroskops mit einer Samsung Galaxy S5 mini 8 Megapixel Kamera.

2.5.3. Proteine in der Spülflüssigkeit

Die Spülflüssigkeit (1-2 ml) wurde nach Beendigung der Nahrungsmittelprovokation mit einer 5 ml Spritze unter langsamem Sog durch einen Standard ERCP Katheter (ERCP Katheter CANB3-18-200-35, medwork, Höchststadt, Deutschland), der nach der Nahrungsmittelprovokation bei der CLE durch den Arbeitskanal eingebracht wurde, gewonnen.

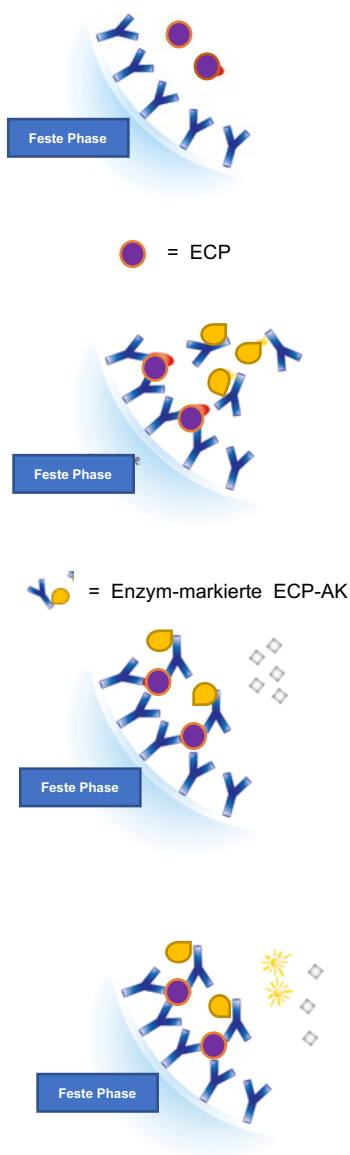
Die genaue Zeit der Entnahme wurde vermerkt, um sicherzustellen, dass eine zeitgerechte Weiterverarbeitung der Probe erfolgte. Die native Probe lagerte 60 min bis maximal 120 min bei Raumtemperatur bei 18-20°C. Die Messung der Konzentrationen von ECP und Tryptase erfolgte entweder direkt oder die Probe wurde bei 4°C in einer Kühlvorrichtung (Liebherr, Bulle, Schweiz) gelagert und innerhalb der nächsten 5 Tage weiterverarbeitet.

Da bis heute in der Wissenschaft noch keine einheitliche Methodik der Bestimmung von ECP (Levy et al., 1997; Arslan et al., 2004; Kristjánsson et al., 2004) und Tryptase (Arslan et al., 2004; Guilarte et al., 2007) in der Spülflüssigkeit vorhanden ist, wurde nach Rücksprache mit der Firma Thermo Scientific die folgende Methodik der ECP und Tryptase Bestimmung erstellt, die eine Modifikation der normalen Serumbestimmung dieser beiden Biomarker darstellt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Farbe der Spülflüssigkeit (hellgelb bis stark grünlich) einen Einfluss auf die Fluoreszenz und somit auf die Konzentrationsbestimmung von ECP und Tryptase in den Proben hatte.

2.5.3.1. Messung des ECP in der Spülflüssigkeit

Nach Zentrifugation der Spülflüssigkeit (meist gelblich, hell bis tief gelb, grünlich) für 10 Minuten bei 1200 x g wurde die flüssige Phase der Spülflüssigkeit abpipettiert, um weiter aufgearbeitet zu werden. Im Phadia 250 der Firma Thermo Scientific (Phadia AB, Uppsala, Schweden) erfolgte die Bestimmung mithilfe des ImmunoCAP® - System ECP (quantitative Bestimmung von ECP mittels Fluoreszenzimmunoassay).

Testprinzip ECP



Im ersten Schritt reagiert das ECP in der zentrifugierten und abpipettierten Spülflüssigkeit mit dem Anti-ECP (monoklonale AK von Mäusen). Das Anti-ECP ist als Antikörper kovalent an eine stark bindungsfähige solide Phase (Zellulose) gebunden.

Um einen Komplex zu bilden, werden nach dem Waschen mit der Waschlösung (Mischung aus 5-Chlor-2methyl-4-isothiazolin-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on) Enzym-markierte ECP-AK (β -Galaktosidase-Anti-ECP 1,5 μ g/ml, 0,05% Natriumazid, monoklonale AK von Mäusen) hinzugefügt um einen Komplex zu bilden.

Ungebundenes Enzym-Anti-ECP wird nach der Inkubation abgewaschen und es erfolgt eine weitere Inkubation mit dem Entwicklerreagens (0,01% 4-Methylumbelliferyl- β -D Galaktosid und < 0,0010% 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on gemischt mit 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on als Konservierungsmittel).

Die Reaktion wird nun durch eine Stopplösung (Natriumcarbonat 4%) abgestoppt und die Fluoreszenz der Probe wird gemessen. Diese ist proportional zur ECP Konzentration in der Probe. Die Höhe des Signalwertes der Fluoreszenz ergibt den Wert des vorhandenen ECP in der Probe. Mithilfe einer Kalibrationskurve werden die Messsignale in Konzentrationen umgewandelt. Bei dem Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA.

Abbildung 5: Modelldarstellung der ECP Messung.

2.5.3.2. Messung der Tryptase in der Spülflüssigkeit

Die Spülflüssigkeit (meist gelblich, hellgelb durchscheinend tief gelb, grünlich) wurde bei 1200 x g für 10 Minuten zentrifugiert und abpipettiert. Die Tryptase wurde, wie auch bei der ECP-Messung, im Phadia 250 durch das ImmunoCAP® System (quantitative Bestimmung von allen Formen der alpha- und beta-Tryptase mittels Fluoreszenzimmunoassay) bestimmt.

Testprinzip Tryptase

Die Tryptase in der zentrifugierten und abpipettierten Probe wurde im ersten Schritt mit Anti-Tryptase (monoklonaler AK von Mäusen) kovalent gebunden an eine feste Phase (Zellulose), in Reaktion gebracht. Es erfolgte im nächsten Schritt das Waschen mit der Waschlösung (Mischung aus 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on) mit anschließender Komplexbildung mit den Enzym-markierten Tryptase-AK (β -Galaktosidase-Anti-Tryptase 3,5 $\mu\text{g/ml}$, 0,06% Natriumazid, monoklonale AK von Mäusen). Daraufhin startete die Inkubation um darauffolgend ungebundene Enzym-Anti-Tryptase abzuwaschen und darauffolgend das Entwicklerreagens (0,01% 4-Methylumbelliferyl- β -D Galaktosid und < 0,0010% 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on gemischt mit 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on als Konservierungsmittel) hinzuzufügen. Nun wurde die Reaktion wieder mit der Stopplösung (Natriumcarbonat 4%) behandelt, um eine abschließende Fluoreszenzbestimmung durchzuführen. Auch hier gilt, dass je höher der ausgegebene Signalwert der Fluoreszenz ist, desto höher ist die Konzentration der Tryptase. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt wie auch beim ECP mithilfe einer Kalibrationskurve. Auch bei diesem Test handelt es sich um eine Sandwich-ELISA.

Reagenziensysteme	Hersteller
ImmunoCAP® - System Anti-ECP Anti-Tryptase Waschlösung Enzym-markierten ECP-AK Enzym-markierten Tryptase-AK Entwicklerreagens Stopplösung	Phadia AB, Uppsala, Schweden

Tabelle 1: Gebrauchsfertiges Reagenziensystem und zugehörige Bezugsquellen. Die genaue Zusammensetzung der Reagenziensysteme wird durch den Hersteller geschützt.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma	Sitz
Autostainer Bond™ Max System	Leica	Berlin, Deutschland
Biopsiekatheter (EndoJaw SwingJaw 2,45mm)	OLYMPUS	Tokio, Japan
Buscopan® (Buthylscopolaminbromid)	Cc Pharma GmbH	Densborn, Deutschland
CD3 T-Zell-Marker	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
DM300 Lichtmikroskop	Leica	Wetzlar, Deutschland
EC-387 CILK	Pentax	Tokio, Japan
ERCP Katheter (CANB3-18-200-35)	medwork	Höchstadt, Deutschland
Flourescein Alcon® (Flourescein)	Novartis Pharma GmbH)	Nürnberg, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr	Bulle, Schweiz
ImmunoCAP® - System	Phadia AB	Uppsala, Schweden
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Polymer Refine Kit	Leica	Berlin, Deutschland
Sab Simplex® (Simeticon)	Kohlpharma GmbH	Merzig, Deutschland
Samsung Galaxy S5 mini 8 Megapixel	Samsung	Seoul, Südkorea
Zentrifuge, Hettich Universal 320	Hettich	Kirchlengern, Deutschland

Tabelle 2: Geräte, Verbrauchsmaterialien und dazugehörige Bezugsquellen.

2.6. Statistik

Alle statischen Auswertungen wurden mit mittels SPSS Version 21 (IBM, Armonk, New York, USA) erhoben.

Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant, ein p-Wert $<0,001$ als statistisch hoch signifikant definiert. Die Auswertung der Biomarker (IEL, EOS, ECP und Tryptase) zwischen mehreren Gruppen wurde mittels des Kruskal-Wallis Tests erstellt. Einzelne Ergebnisse wurden mit Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests) und der Effektstärke nach Cohen (1992) zusätzlich nachberechnet. Die Auftretenswahrscheinlichkeit der Atopie wurde mit dem Pearson Chi-Quadrat Test berechnet. Die Ergebnisse wurden mittels der Kontingenzanalyse und Cramers V nachberechnet und der Zusammenhang bestimmt.

Die Berechnungen zwischen zwei ausgewählten Gruppen in Bezug auf bestimmte Biomarker erfolgten bei nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test und bei normalverteilten Daten mittels ungepaarten t-Test.

Die Korrelationsanalysen wurden mit der Rangkorrelation nach Spearman berechnet.

Die graphischen Auswertungen der Statistiken wurden mit GraphPad Prism, Version 6 (Graph Pad, La Jolla, Kalifornien, USA) sowie mit Microsoft Excel, Version 16.9 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 170 Patienten (95 weiblich; 18 – 78 Jahre; Altersdurchschnitt $44,46 \pm 15,4$) rekrutiert. Von diesen brachen 62 Patienten die Studie vorzeitig ab (34 weiblich, Altersspannweite 18 – 73 Jahre, Altersdurchschnitt $41,87 \pm 14,6$), diese sind im Weiteren als Patienten mit „Mangel an Compliance“ aufgeführt (siehe Tabelle 3).

Bei insgesamt 45 von 62 (72,5 %) Patienten kam es zu einem Kontaktverlust in der initialen Patientenrekrutierungsphase; zusätzlich kam es zu einem Abbruch der Studie bei Schwangerschaft (drei Patienten, 4,8 %), Umzug (9 Patienten, 14,5 %) und akuten familiären Problemen (6 Patienten, 9,6 %). So ergab sich eine Kohorte von 108 Studienpatienten (62 weiblich, Altersspannweite 20 – 78 Jahre, Altersdurchschnitt $45,43 \pm 14,50$). Innerhalb dieser 108 Patienten fanden sich 52 Patienten mit IBS-D, 42 Patienten mit IBS-M und 14 Patienten mit IBS-C.

Patienten zugewiesene Patientengruppe	Patientenanzahl	Prozentuelle Verteilung
CLE+	76	45 %
Mangel an Compliance	62	36 %
CLE-	21	12 %
andere Erkrankung	11	7 %
Gesamt	170	100 %

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der gesamten zugewiesenen Patientengruppe.

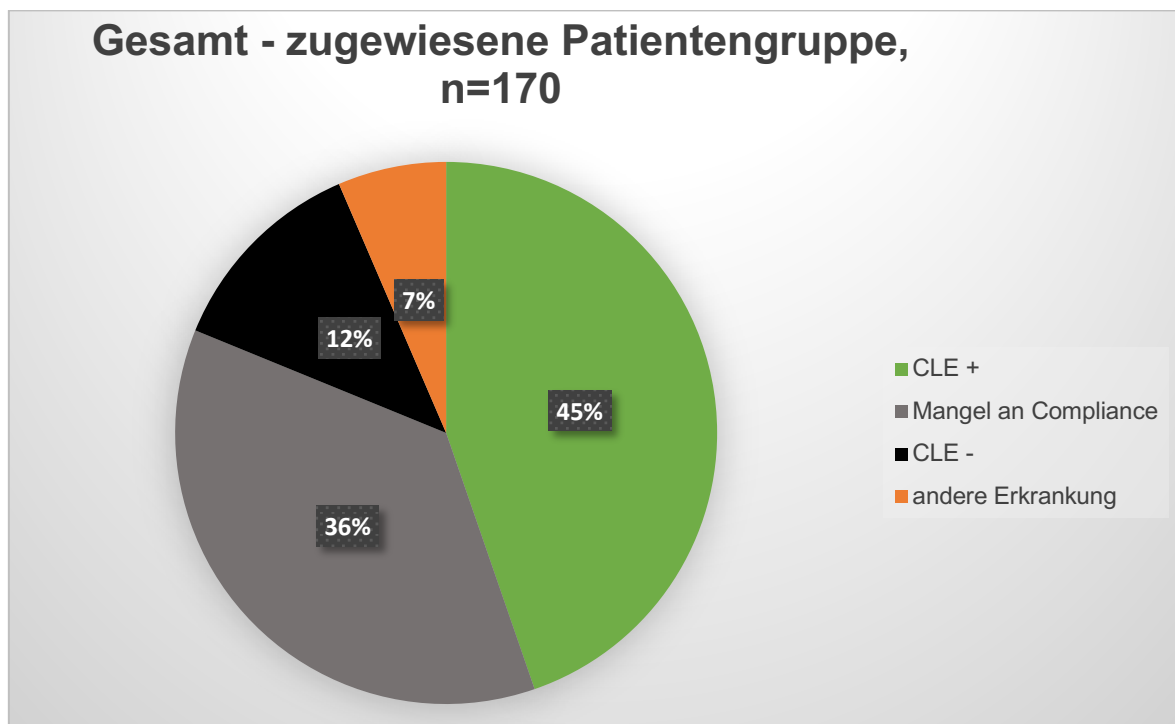


Abbildung 6: Gesamtpatientenkollektiv mit Unterteilung in CLE+, CLE- und Mangel an Compliance, sowie Patienten mit einer anderen Erkrankung.

3.1. Patienten

Von den 108 Studienpatienten waren 76 Patienten CLE+ (48 weiblich, Altersspannweite 20 – 76 Jahre, Altersdurchschnitt $42,72 \pm 14,9$), 21 Patienten waren CLE- (6 weiblich, Altersspannweite 22 – 75 Jahre, Altersdurchschnitt $43,8 \pm 15,81$) und weitere 11 Patienten hatten eine andere Erkrankung (6 weiblich, Altersspannweite 21 – 67 Jahre, Altersdurchschnitt $46,81 \pm 14,3$) (siehe Tabelle 4).

Die Gruppe mit dem Titel „anderen Erkrankungen“ rekrutierte sich aus Patienten, bei denen eine klar definierte Erkrankung der IBS Symptomatik zugrunde lag, die in weiterführenden Untersuchungen nachgewiesen worden war. So waren unter anderen ein Patient mit Mastozytose, eine Patientin mit Endometriose, ein Patient mit chronisch lymphatischer Leukämie, ein Patient mit chronischer Pankreatitis und 7 Patienten mit akuten psychiatrischen Erkrankungen in dieser Gruppe zu finden (siehe Tabelle 5).

Ausschluss:

Patienten wurden bei Nichteinhalten der Diät (13 Patienten), anderer schwerer Krankheit (11 Patienten) oder generellem Mangel an Compliance (62 Patienten) aus der Studie ausgeschlossen, insgesamt 44,17 % des Gesamtkollektivs.

Die Ausgangs-Symptomscores zwischen den späteren CLE+ und CLE- Patienten unterschieden sich statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 7).

Das Alter der CLE+ Patienten ($42,72 \pm 14,90$; Spannweite 20–76) unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zu dem der CLE- Patienten ($43,8 \pm 15,81$, Spannweite 22–75 Jahre) und den der gesunden Kontrollen ($49,78 \pm 12,8$; Spannweite 39–78; $p = 0,51$) (Abbildung 8).

Auch waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in den initialen Symptomscores zwischen den einzelnen IBS Subtypen zu finden.

Unter den 14 Kontrollpatienten, die zur Untersuchung eines Barrett Syndroms überwiesen worden waren (8 weiblich, Alter von 39–78 Jahre, Altersdurchschnitt $49,78 \pm 12,8$), ließ sich keine Reaktion auf ein Nahrungsmittelallergen mittels der CLE beobachten. Keiner dieser Patienten wies klinisch oder in den Fragebögen eine Reizdarmsymptomatik auf.

CLE Ergebnis	Patientenanzahl	Prozentuelle Verteilung
CLE+	76	70,3 %
CLE-	21	19,4 %
andere Erkrankung	11	10,3 %
Gesamt	108	100 %

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Studienpatienten.

Andere Erkrankung	Patientenanzahl	Prozentuelle Verteilung
Akute psychiatrische Erkrankung	7	63,6 %
Endometriose	1	9,1 %
Mastozytose	1	9,1 %
Chronische lymphatische Leukämie	1	9,1 %
Chronische Pankreatitis	1	9,1 %
Gesamt	11	100 %

Tabelle 5: Tabellarische Differenzierung der Patienten mit anderen Erkrankungen.

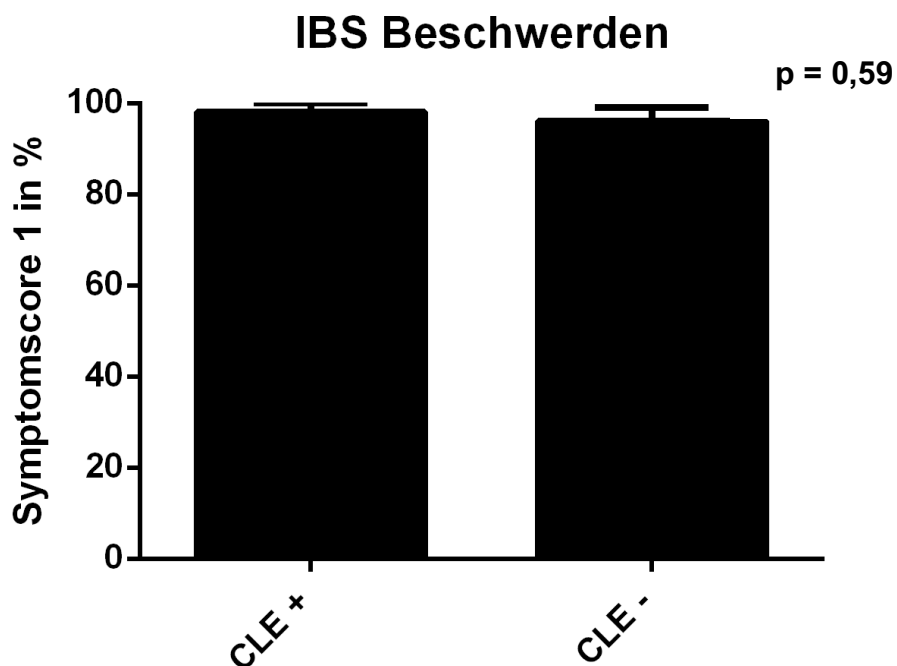


Abbildung 7: statistischer Vergleich des Symptomscores, erhoben durch modifizierten VAS Fragebogen; dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung

(CLE+ 98 ± 7 ; Spannweite 89–99; CLE- 97 ± 8 Spannweite 88–97; $p=0,59$).

Alter der Studienpatienten

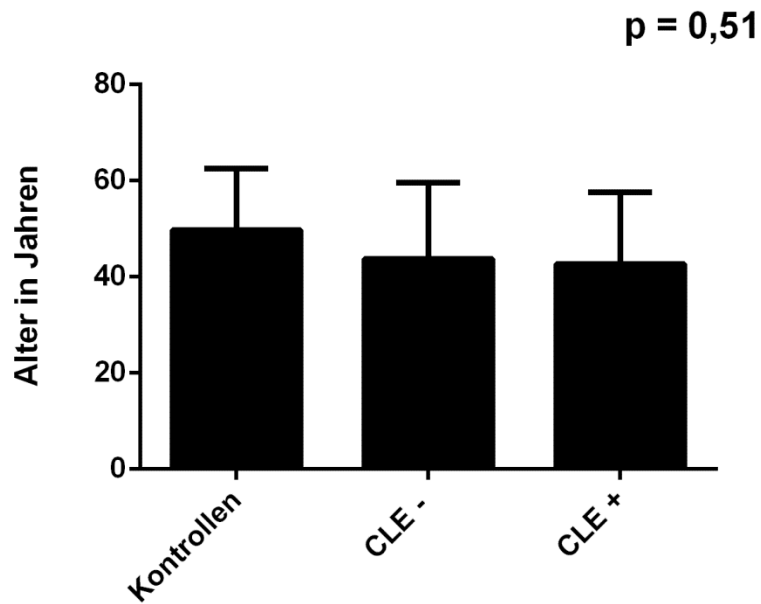


Abbildung 8: statistischer Vergleich des Altersdurschnitts zwischen CLE+ ($42,72 \pm 14,90$; Spannweite 20–76), CLE– ($43,8 \pm 15,81$, Spannweite 22–75 Jahre) und gesunden Kontrollen ($49,78 \pm 12,8$; Spannweite 39–78; $p=0,51$); dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2. Endomikroskopie

Von den 76 CLE+ Patienten reagierten in der endomikroskopischen Nahrungsmittelprovokation 46 Patienten auf Weizen (Altersdurchschnitt $40,6 \pm 13,9$), 15 Patienten auf Hefe (Altersdurchschnitt $43,4 \pm 18,6$), 7 Patienten auf Kuhmilch (Altersdurchschnitt $42,2 \pm 9,2$), 5 Patienten auf Soja (Altersdurchschnitt $46,9 \pm 16,5$) und 3 Patienten auf Eiweiß (Altersdurchschnitt $41,2 \pm 13,5$) (siehe Tabelle 6). Bei insgesamt 15 Patienten zeigte sich während der Nahrungsmittelprovokation in der CLE bereits beim ersten Nahrungsmittelantigen eine sehr deutliche Reaktion, so dass die CLE bereits nach dieser ersten Provokation beendet werden musste. Die anderen Nahrungsmittelallergene wurden bei diesen 15 Patienten in einer zweiten CLE zu einem späteren Zeitpunkt getestet.

Nach intravenöser Gabe von Fluorescein wurde die Darmmukosa des Duodenums innerhalb kurzer Zeit sichtbar. Initial wurden bei der endomikroskopischen Untersuchung Aufnahmen des Normalzustandes angefertigt. Sie dienten als „baseline“ Aufnahmen (siehe Abbildung 9a und 9b) vor der Provokation mit Nahrungsmittelallergenen und wurden mit denjenigen nach der Provokation später verglichen. Die endomikroskopische Reaktion zeigte sich bei den CLE+ Patienten in einer klar definierten Reihenfolge (siehe Abbildung 10 bis Abbildung 12). Zunächst kam es zu einer Zunahme der Dichte der IEL im endomikroskopischen Bild. Darauf zeigten sich kleine Epithelaufbrüche, die zu Lücken im Epithel führten.

Durch diese konnte das Fluorescein in das Darmlumen strömen (siehe Abbildung 10). Es kam zusätzlich auch zu diffusem Austritt des Kontrastmittels aus den Zellzwischenräumen.

Durch den Austritt des Fluoresceins durch die Epithelaufbrüche und Zellzwischenräume erschien der intravillöse Raum (IVR), der sich in der baseline als schwarz darstellt, deutlich heller bis hin zu weißlich (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Das Kontrastmittel bewirkte eine intensive Gefäßanfärbung, in der auch einzelne Erythrozyten sichtbar wurden. Als Endzustand der Reaktion wurde eine Weißfärbung und Erweiterung des IVR gesehen (Abbildung 11).

Die gesamte Reaktion auf ein Nahrungsmittel zeigte sich innerhalb von maximal 3-5 Minuten und war für alle Anwesenden während der Untersuchung deutlich sichtbar. Die deutlichste Reaktion war das Austreten des Fluoresceins durch die Epithelaufbrüche einzelner Zellen und das Einströmen des Fluoresceins durch Zellzwischenräume in den IVR (Abbildung 10). Bei den 14 gesunden Kontrollpatienten war diese Reaktion nicht zu beobachten, weder bei der Nahrungsmittelprovokation noch bei der Provokation mit der Kontrollsubstanz.

Die Anzahl der Lymphozyten wurde in den gespeicherten endomikroskopischen digitalisierten Bildern (baseline und nach Nahrungsmittelprovokation) nach der Untersuchung gezählt.

Sie unterschied sich bei CLE+ Patienten signifikant von der Anzahl der IEL nach Nahrungsmittelprovokation ($19,80 \pm 4,7$ (14 -30) vs. $24,90 \pm 4,7$ (20 - 30); p-Wert: $<0,001$) (Tabelle 7). Kein signifikanter Unterschied zeigte sich bei dem Vergleich der baseline Werte mit denen nach Nahrungsmittelprovokation bei den CLE- Patienten ($10,90 \pm 1,9$ (8 -14) vs. $12,10 \pm 2,2$ (8 -17); p-Wert= $0,104$) und den Kontrollpatienten ($7,68 \pm 0,87$ (6,5 -9,1) vs. $9,47 \pm 2,71$ (5 -12,6); p-Wert= $0,219$) (siehe Tabelle 7).

In den Gruppenvergleichen der IEL baseline, gegen IEL Werte nach Nahrungsmittelprovokation in den CLE Aufnahmen unterschied sich die Gruppe der CLE+ signifikant von den CLE- und den HC (baseline IEL: CLE+ vs. CLE- vs. HC: p-Wert= $<0,001$; nach Nahrungsmittelprovokation IEL: CLE+ vs. CLE- vs. HC: p-Wert= $< 0,001$).

CLE Ergebnis	Patientenanzahl	Prozentuelle Verteilung
CLE+ Weizen	46	60,5 %
CLE+ Hefe	15	19,7 %
CLE+ Milch	7	9,2 %
CLE+ Soja	5	6,7 %
CLE+ Eiweiß	3	3,9 %
Gesamt CLE+	76	100 %

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Verteilung der verschiedenen getesteten Antigene bei CLE+ Patienten.

Gruppe	Baseline (Lymphozyten/ Feld*)	nach Nahrungsmittelprovokation (Lymphozyten/ Feld*)	p- Wert
CLE +	19,80 ± 4,7 (14 -30)	24,90 ± 4,7 (20 -30)	< 0,001
CLE -	10,90 ± 1,9 (8 -14)	12,10 ± 2,2 (8 -17)	0,104
HC	7,68 ± 0,9 (6,5 -9,1)	9,47 ± 2,71 (5 -12,6)	0,219

Tabelle 7: Anzahl der Lymphozyten in der CLE.

*Feld: 4 standardisierte 5 x 5 cm große Areale mit 250 x 250 Pixeln (Kantenlänge 500 µm; Farbtiefe: 250 Bit; 1 Pixel: 0.46 µm); Vergleich zwischen den Lymphozyten pro Feld in den baseline und den Aufnahmen nach Nahrungsmittelprovokation; dargestellt mit Mittelwert ± Standardabweichung und Spannweite.

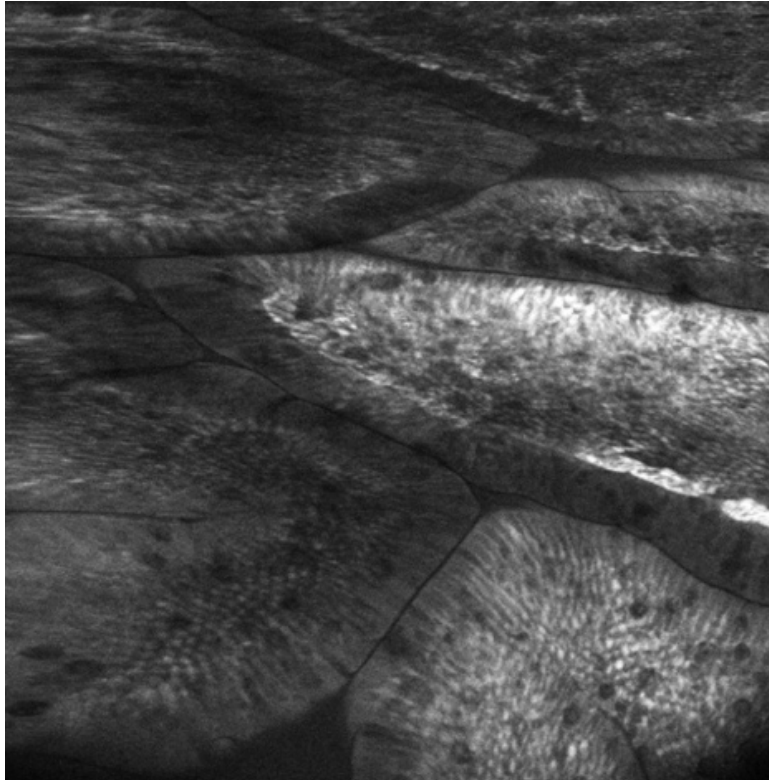


Abbildung 9a)

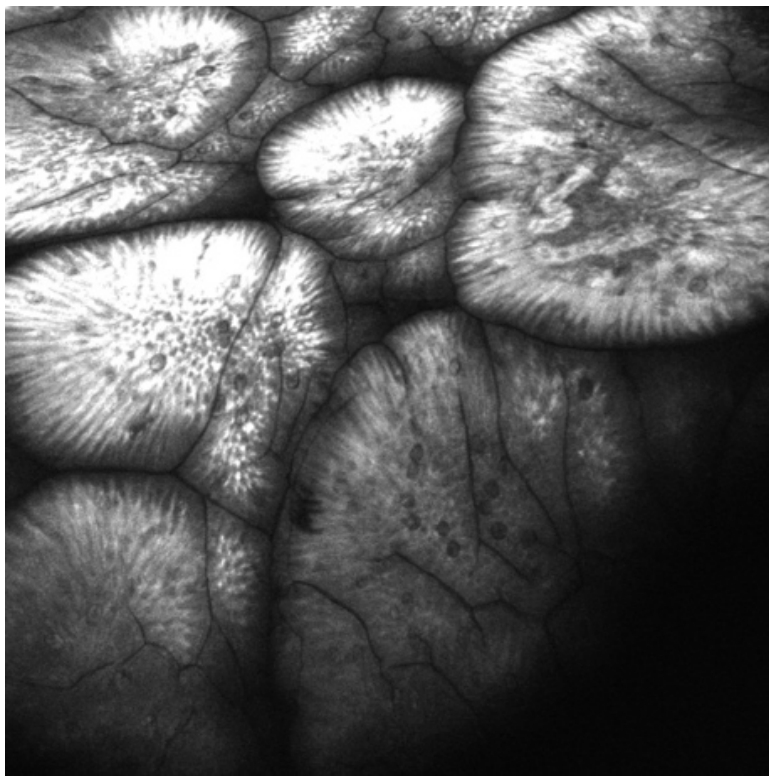


Abbildung 9b)

Abbildung 9a) und 9b): Aufnahmen einer endomikroskopischen Untersuchung bei IBS Patienten; Duodenalvilli und KapillargefäÙe sind deutlich erkennbar, ebenso wie der schmale IVR (hier in der baseline ausschließlich schwarz imponierend); dieses stellt den Normalzustand ohne Nahrungsmittelprovokation dar.

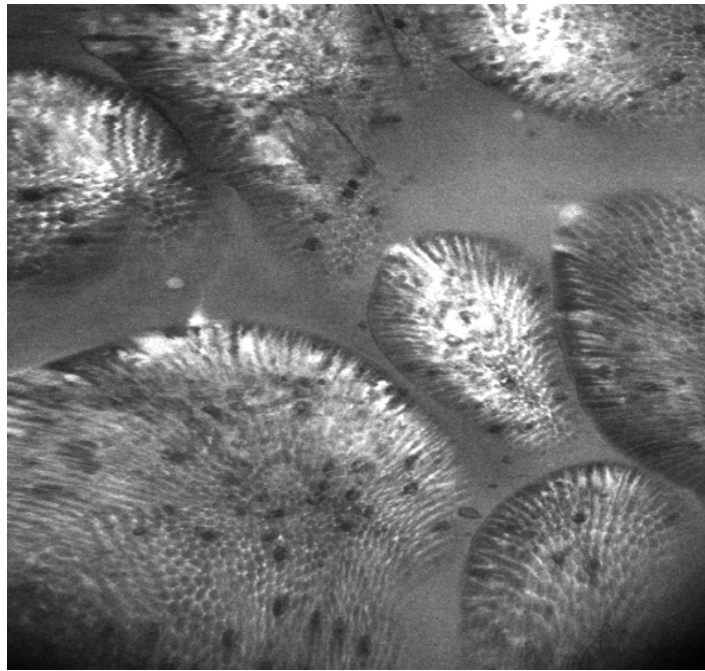


Abbildung 10: Endomikroskopisches Bild einer positiven Reaktion (CLE+); deutlich zu erkennen sind der geweitete und, durch das bereits ausgetretene Fluorescein, deutlich heller erscheinende IVR sowie die Epithelaufbrüche mit Austritt des Fluoresceins.

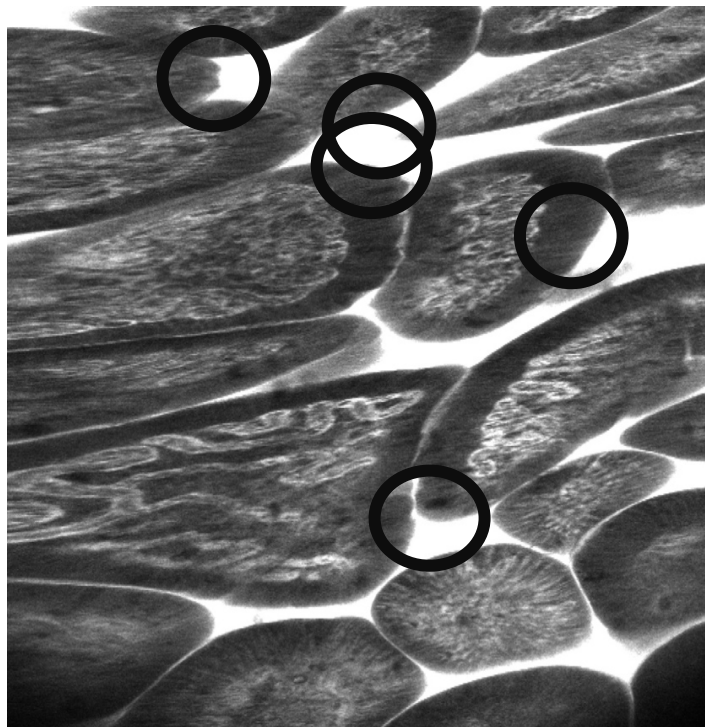


Abbildung 11: Endomikroskopisches Bild einer im Endstadium befindlichen Positivreaktion. Deutlich sichtbar sind der durch das ausgetretene Fluorescein weißlich erscheinende erweiterte intervillöse Raum und die Gefäße. Die schwarzen Ringe kennzeichnen den, durch das ausgetretene Fluorescein, weißlich erscheinenden, erweiterten intervillösen Raum.

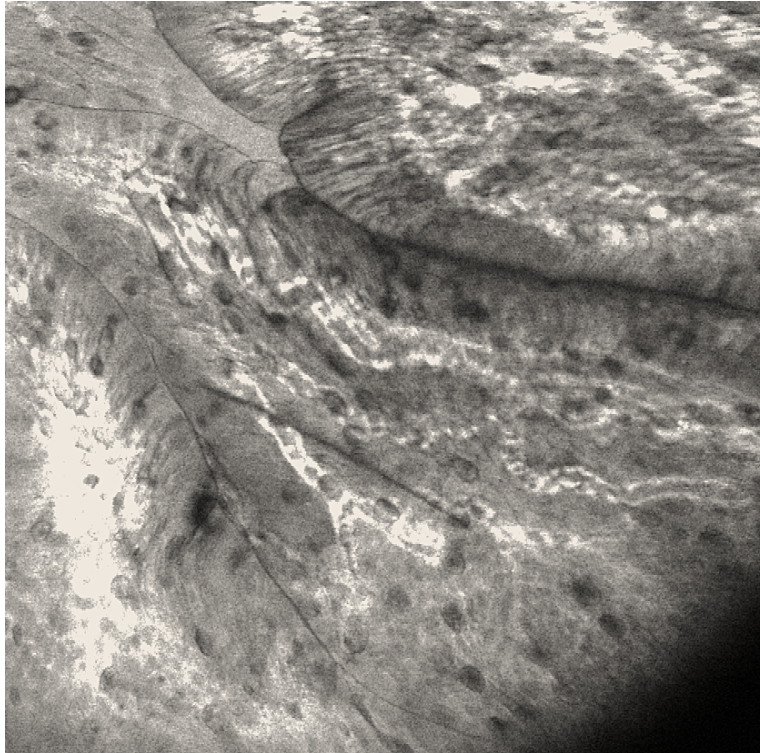


Abbildung 12: Endomikroskopisches Bild einer Reaktion bei einem CLE+ Patienten mit prominenten, fluoreszierend erscheinenden Gefäße mit darin befindlichen Erythrozyten.

3.3. Ergebnisse der Ausschlussdiäten und Symptomscores

Im Anschluss an die Endomikroskopie und die Placebo-/Verumdiät hatten alle CLE+ Patienten eine langfristige, das reagierende Antigen ausschließende Diät durchgeführt. Sie hatten zuvor eine Diätberatung und zusätzlich genaue schriftliche Anweisungen für die entsprechende Durchführung erhalten. Bei dem initialen Follow-up Termin zwei Wochen nach Beginn der individuellen Ausschlussdiät zeigte sich bereits eine Besserung der Symptome bei 73 von 76 Patienten. Bereits bei diesem ersten Follow-up Termin gaben 9 Patienten eine vollkommene Remission der Beschwerden an. Allerdings wurde im Gespräch mit vielen Patienten deutlich, dass die Einhaltung der individuellen Ausschlussdiät im Alltag oft nicht leicht umzusetzen war. Dieser Follow-up Termin nach zwei Wochen wurde daher insbesondere zur weiteren Diätberatung genutzt, um die tatsächliche Besserung nach Ausschluss des reagierenden Antigens besser bestimmen zu können.

Im Durchschnitt zeigte sich bei den 76 CLE+ Patienten nach 3 Monaten eine 70,04 prozentige Besserung der Symptome. Die Symptombeschwerden reduzierten sich entsprechend auf einen Durchschnittswert von 29,96 %. In dem Follow-up Termin nach 3 Monaten waren 52 von 76 CLE+ Patienten (68,4%) um >80% durch die individuelle Ausschlussdiät in ihrer Symptomatik gebessert (CLE+80).

Der Durchschnittswert der Besserung sank auf eine verbleibende Symptomschwere von nur 14.7% des Ausgangswertes (siehe Tabelle 8 und Abbildung 13).

Die übrigen 24 CLE+ Patienten (18 weiblich) gaben eine durchschnittliche Besserung von 45,21% nach 3 Monaten und 41,25% nach 6 Monaten (Minimum 0 %, Maximum 75%) an. Drei Patienten (zwei weiblich, einer CLE+ für Weizen, einer CLE+ für Hefe und Weizen und einer CLE+ für Hefe) gaben unter der individuellen Ausschlussdiät keine Verbesserung der Beschwerdesymptomatik an.

Bei dem letzten Termin nach 6 Monaten zeigte sich bei den 52 Patienten, die initial bereits einen deutlich gebesserten Zustand der IBS Symptomatik angaben, eine weiter zunehmende leichte Besserung der gastrointestinalen Symptome auf dann nur noch 7,62 % der Ausgangsbeschwerden, was auf eine zunehmende Kenntnis der Diät zurückzuführen war (siehe Tabelle 9). Acht der Patienten konnten ihre Individualdiät nicht durchhalten.

CLE Ergebnis und % Besserung	Patientenanzahl	Prozentuelle Verteilung
CLE+ > 80% Besserung	52	48,2 %
CLE+ < 80% Besserung	16	14,9 %
CLE-	21	19,5 %
CLE+ nicht gebessert	8	7,4 %
andere Erkrankung	11	10 %
Gesamt	108	100 %

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung des CLE Ergebnisses und der prozentuellen Verteilung der Besserung nach individueller Ausschlussdiät.

	Patienten- zahl	Symptomscore 1 in % (baseline)	Symptomscore 2 in % (3 Monate)	Symptomscore 3 in % (6 Monate)
CLE -	21	100	94,6	95,8
CLE +	69	100	29,96	24,44
CLE + 80	52	100	14,7	7,62
HC	14	3	4	3

Tabelle 9: Symptomscores (1,2 und 3) der Patienten zum Zeitpunkt der Baseline Erhebung (Symptomscore 1), nach drei Monaten (Symptomscore 2) und nach sechs Monaten (Symptomscore 3).

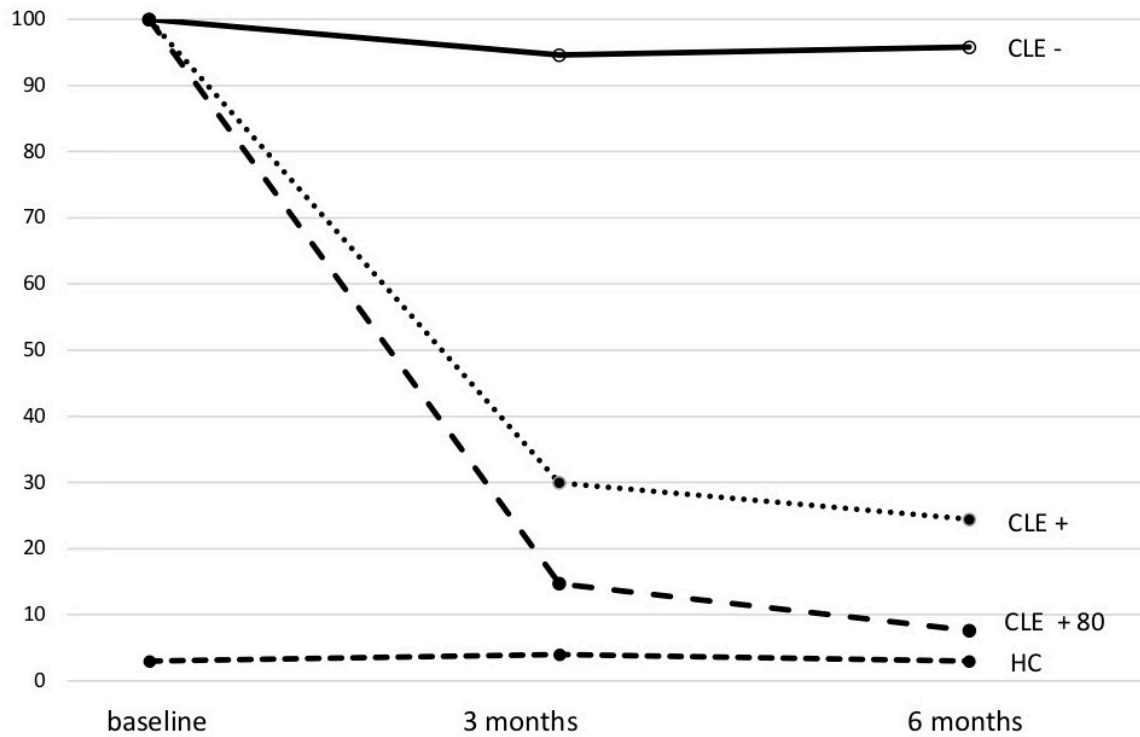


Abbildung 13: Therapieerfolg der Patienten. Die y-Achse stellt die Schwere der IBS-Beschwerden in Prozent dar. Die x-Achse zeigt die drei Erhebungen mittels Symptomscore 1 (Ausgangswert), Symptomscore 2 (Wert nach 2-monatiger Ausschlussdiät) und Symptomscore 3 (nach 6-monatiger Ausschlussdiät).

3.4. Auswertungen der Biomarker

Duodenalbiopsien

Die Entnahme der Duodenalbiopsien erfolgte nach der Nahrungsmittelprovokation unmittelbar nach der endomikroskopischen Untersuchung.

In der histologischen Betrachtung der H&E gefärbten Schnitte der Duodenalbiopsien zeigte sich bei allen Patienten eine normale Morphologie der Villi und Krypten ohne villöse Atrophie.

3.4.1. Intraepitheliale Lymphozyten

Bei den 76 CLE+ Patienten ($25,3 \pm 11,92$; Spannweite 8–53) wurde eine hoch signifikante Erhöhung der IEL im histologischen Schnitt im Vergleich zu 21 CLE- Patienten ($19,93 \pm 9,13$; Spannweite 2–40,5) und denen der 14 gesunden Kontrollpatienten nachgewiesen ($14,14 \pm 4,3$, Spannweite 5–19) ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 14). So fand sich auch eine hoch signifikante IEL Erhöhung in den histologischen Schnitten in der CLE+80 Patientengruppe ($25,5 \pm 11,92$; Spannweite 8–53) im Vergleich zu den CLE- und den gesunden Kontrollen ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 15).

In den histologischen Schnitten mit einer immunhistochemischen Färbungen gegen CD3 (siehe Abbildung 2) wurden lokal auftretende Anhäufungen von Lymphozyten teils in der Lamina propria mucosae, teils im Epithel nachgewiesen (siehe Abbildung 16). Die Anzahl der Lymphozyten stand aber in keinem Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik.

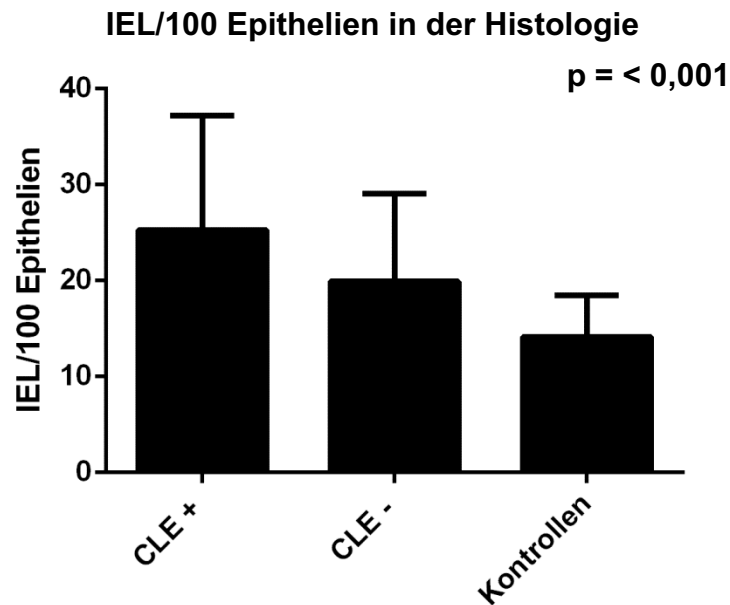


Abbildung 14: IEL in der Histologie/100 Epithelien nach Nahrungsmittelprovokation in der Endomikroskopie; Vergleich zwischen CLE+ (25,3 ± 11,92; Spannweite 8–53), CLE- (19,93 ± 9,13; Spannweite 2 – 40,5) und Kontrollen (14,14 ± 4,3, Spannweite 5–19) (Chi-Quadrat (2) = 13,147; $p < 0,001$). Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni-Test): CLE+; Kontrollen: ($z = 3,568$, $p < 0,001$); Effektstärke nach Cohen (1992): $r = 0,34$ (mittelstarker Effekt).

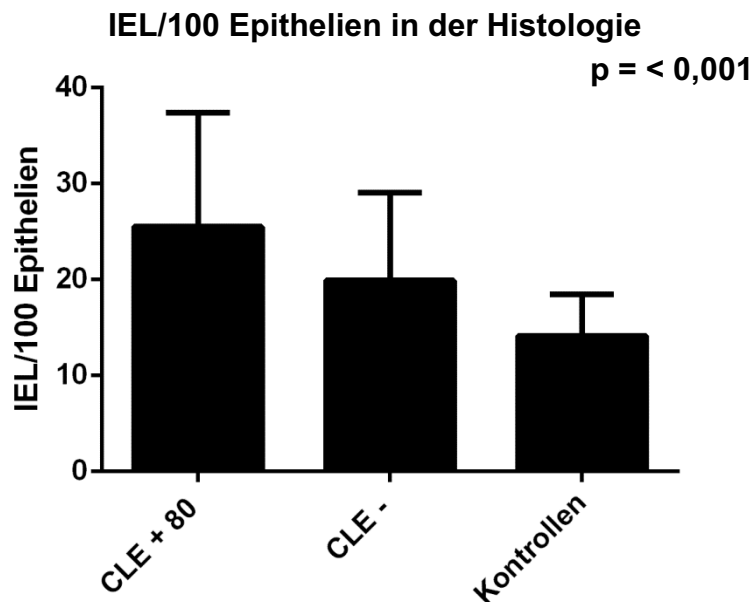


Abbildung 15: IEL in der Histologie/100 Epithelien nach Nahrungsmittelprovokation in der Endomikroskopie; Vergleich zwischen CLE+80 (25,5 ± 11,92; Spannweite 8–53), CLE- und Kontrollen ($p < 0,001$).

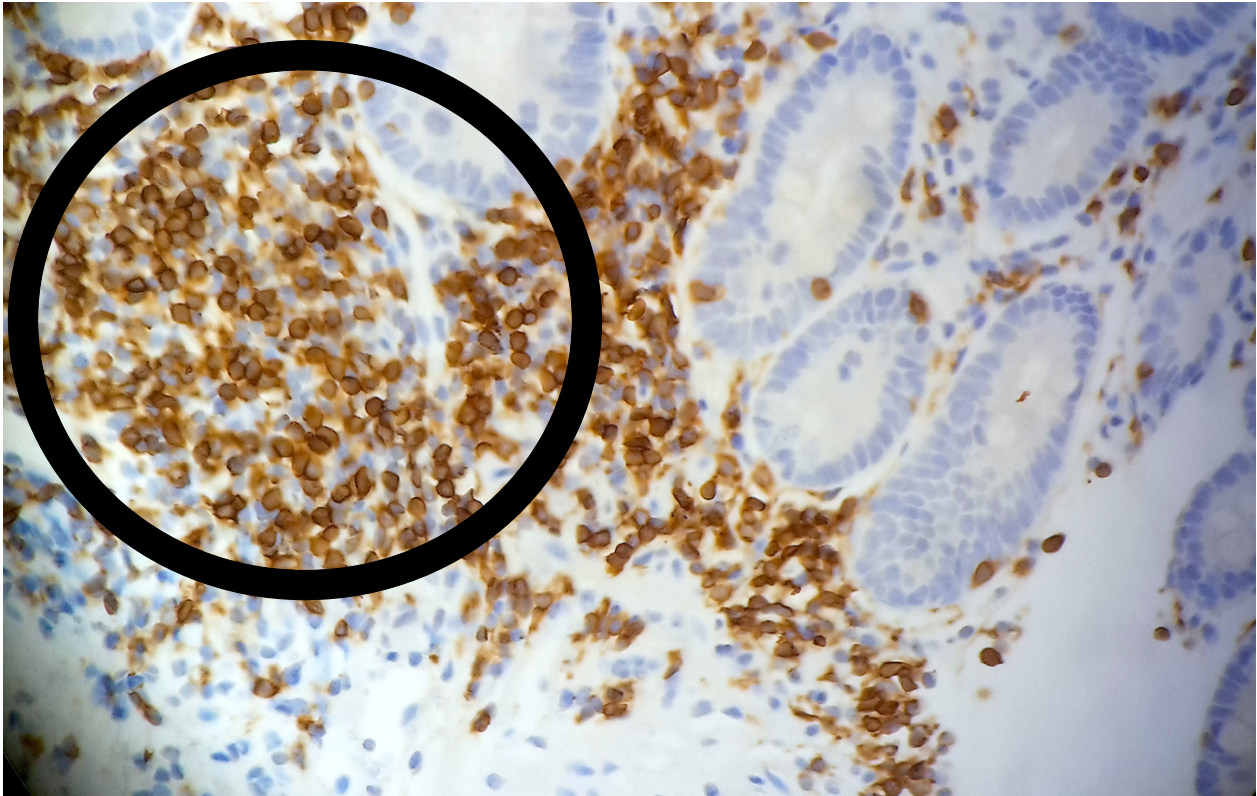


Abbildung 16: Duodenalschleimhaut bei 400-facher Vergrößerung im Longitudinalschnitt, immunhistochemische Färbung gegen CD3; es fällt eine deutliche, nestähnliche Anhäufung von Lymphozyten im linken oberen Bildausschnitt auf (siehe schwarzer Kreis links oben im Bild).

3.4.2. Eosinophile Granulozyten

Die Zählung der EOS fand im histologischen, H&E gefärbten, Schnitt statt.

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der Anzahl der EOS von CLE+ ($5,39 \pm 3,22$; Spannweite 0,83–15,85), CLE- ($4,77 \pm 3,18$; Spannweite 0–13,5) und gesunden Kontrollen ($4,13 \pm 3,33$; Spannweite 0,71–11,6; $p=0,2$). Auch die Unterschiede in der Anzahl des EOS von CLE+80 ($5,58 \pm 3,25$; Spannweite 0,83–15,85; $p=0,2$), CLE- und gesunden Kontrollen waren statistisch nicht signifikant.

Bei einigen Schnitten der CLE+ Patienten waren degranulierende eosinophile Granulozyten zu erkennen. Die Zellzahlen der EOS bei den CLE+ Patienten könnten insbesondere durch die degranulierten eosinophilen Granulozyten unterschätzt worden sein. Auch zeigte sich, ähnlich wie auch bei den IEL Schnitten bei einem Patienten eine starke lokal begrenzte, nestähnliche Anhäufung von EOS in der Lamina propria mucosae (siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Ein HPF im Lichtmikroskop, betrachtet in 200-facher Vergrößerung in einem HE-gefärbten Transversalschnitt; Aufnahme erfolgte durch das Okular des Lichtmikroskops mit Samsung Galaxy S5 mini 8 Megapixel: im Zentrum lässt sich eine deutliche Anhäufung von Eosinophilen Granulozyten in der Lamina propria mucosae erkennen (schwarzer Kreis); der gelbe Pfeil rechts oben im Bild zeigt auf einen teilweise degranulierten eosinophilen Granulozyten.

3.4.3. Proteine in der Spülflüssigkeit

Die Spülflüssigkeit wurde nach der Nahrungsmittelprovokation im Anschluss an die CLE entnommen.

3.4.3.1. Messung des ECP in der Spülflüssigkeit

Die Konzentration des ECP war bei CLE+ Patienten ($21,78 \pm 41,35$, Spannweite 1–235) signifikant höher ist als im Vergleich zu den CLE- ($11,64 \pm 17$, Spannweite 1–59) und Kontrollpatienten ($3,07 \pm 2,41$, Spannweite 1,04–8,73) ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 18). Auch bei den CLE+80 Patienten wurde ein signifikant höherer ECP Werte ($25,27 \pm 45,94$, Spannweite 1–235) im Vergleich bei CLE- und Kontrollpatienten gemessen ($p < 0,05$; siehe Abbildung 19).

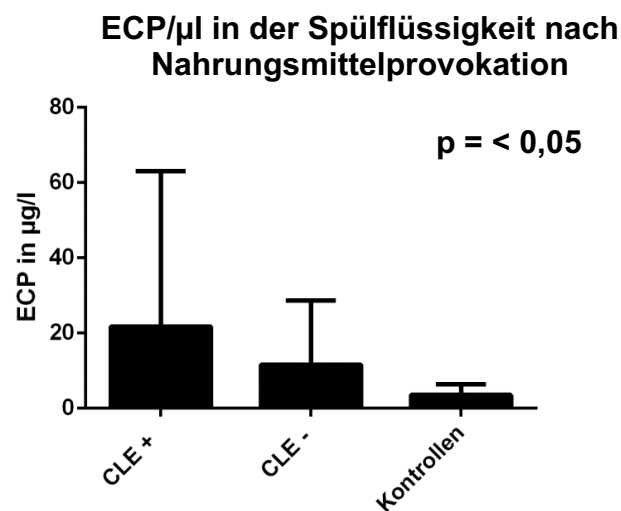


Abbildung 18: ECP/ μ l nach Nahrungsmittelprovokation in der Endomikroskopie; Vergleich zwischen CLE+ ($21,78 \pm 41,35$, Spannweite 1–235), CLE- ($11,64 \pm 17$, Spannweite 1–59) und Kontrollen ($3,07 \pm 2,41$, Spannweite 1,04–8,73; Chi-Quadrat (2) = 6,050; $p < 0,05$).

ECP/ μ l in der Spülflüssigkeit nach Nahrungsmittelprovokation

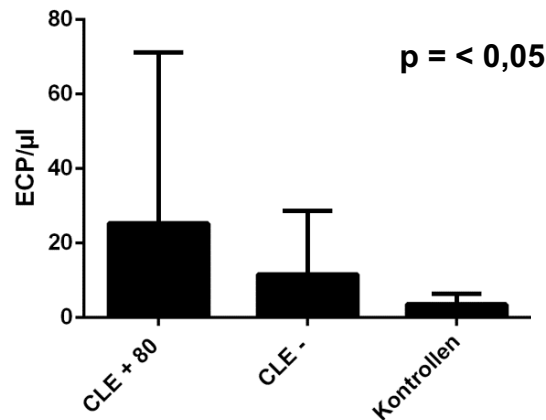


Abbildung 19: ECP/ μ l, entnommen unmittelbar nach Nahrungsmittelprovokation in der Endomikroskopie; Vergleich zwischen CLE+80 ($25,27 \pm 45,94$, Spannweite 1–235), CLE- und gesunden Kontrollen (Chi-Quadrat (2) = 7,548, $p < 0,05$). Post-hoc-Test: CLE+80; Kontrollen; ($z = 2,291$, $p < 0,05$). Effektstärke nach Cohen (1992): $r = 0,3$ (mittelstarker Effekt).

Korrelation von ECP und eosinophilen Granulozyten

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Anzahl der EOS und Konzentration des ECP zu ermitteln, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Höhe der gemessenen ECP in Spülflüssigkeit nicht signifikant mit der Anzahl der EOS nach Nahrungsmittelprovokation in der CLE bei den untersuchten IBS Patienten korreliert ($r_s = 0,14$, $p = 0,2$, $n = 85$). Auch in der weiteren Korrelationsanalyse der Gruppen zeigte sich keine statistische Signifikanz bei CLE+ Patienten ($r_s = 0,016$, $p > 0,05$, $n = 55$) sowie bei CLE+80 Patienten ($r_s = 0,074$, $p = 0,67$, $n = 35$).

3.4.3.2. Alpha-Tryptase in der Spülflüssigkeit

In den Vergleichen der Konzentration der alpha-Tryptase von CLE+ ($2,43 \pm 4,76$; Spannweite 0,5–31,7), CLE+80 ($2,15 \pm 3,14$; Spannweite 0,5–13), CLE- ($2,32 \pm 3,38$; Spannweite 0,5–19,4) und den gesunden Kontrollen ($1,1 \pm 0,53$; Spannweite 0,5–2,83) fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,81$).

3.4.4. Anamnese: Atopie

Die Anamneseerhebung zeigte ein signifikant erhöhtes Vorliegen einer Atopie bei Patienten und deren Familienangehörigen ersten Grades in der Gruppe der CLE+ Patienten, verglichen mit denjenigen der CLE- Gruppe und den Kontrollpatienten (Chi-Quadrat (2) = 17,78, $p < 0,05$, $n=112$) (siehe Abbildung 20).

Auch das Vorliegen einer Atopie bei CLE+80 Patienten war gegenüber den CLE- und den Kontrollpatienten signifikant erhöht ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 21).

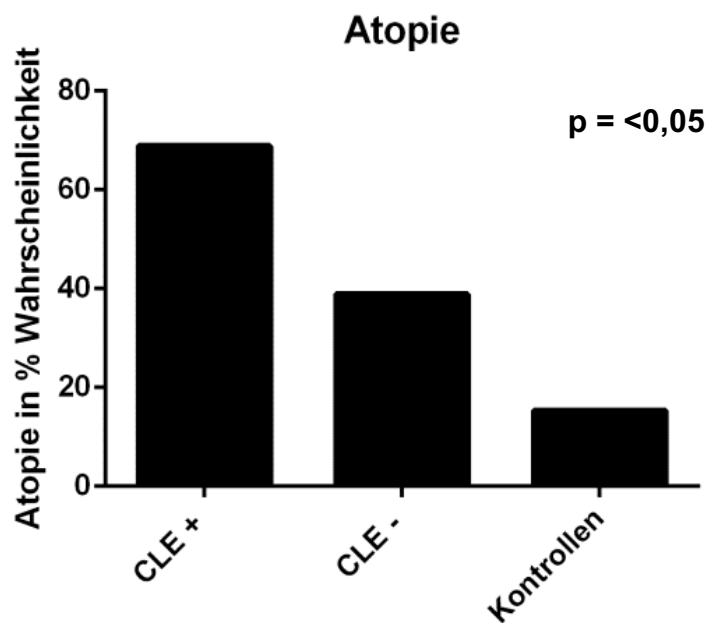


Abbildung 20: Wahrscheinlichkeit der Atopie innerhalb der Gruppen CLE+, CLE- und Kontrollen. (Chi-Quadrat (2) = 17,78, $p < 0,05$, $n=112$ Patienten).

Der Zusammenhang ist stark (Kontingenzkoeffizient=0,37, $p=0,004$; Cramers V=0,399, $p=0,001$). Kontingenzkoeffizient, sowie Cramers V > 0,3.

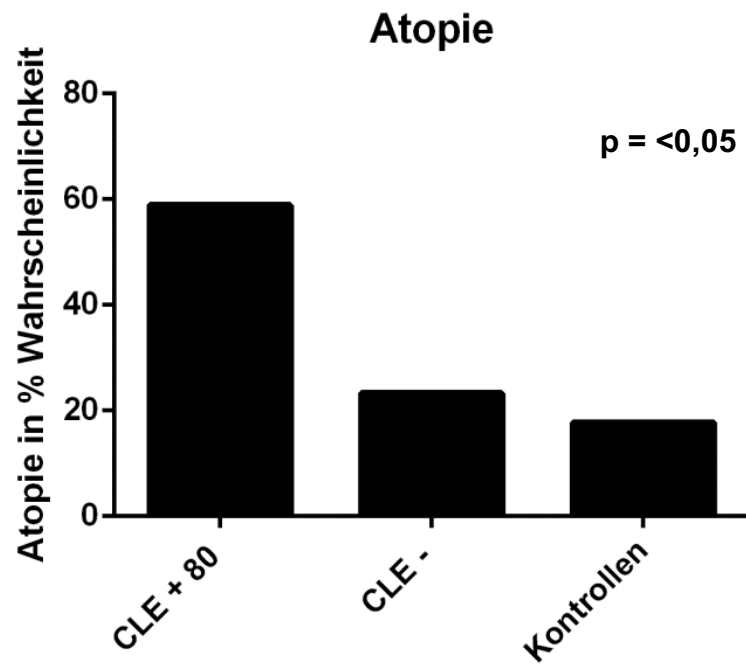


Abbildung 21: Atopiewahrscheinlichkeit bei CLE+80, CLE- und Kontrollen (Chi-Quadrat (2) = 10,67, $p < 0,05$, $n = 73$ Patienten). Der Zusammenhang ist stark (Kontingenzkoeffizient = 0,382, $p = 0,004$; Cramers $V = 0,382$, $p = 0,004$).

3.4.5. Vergleich der IEL und EOS bei CLE+, unterteilt nach Reaktionen auf die verschiedenen Nahrungsmittelantigene

Um eine mögliche Differenzierung der IBS Patienten mit unterschiedlichen Nahrungsmittelsensitivitäten zu ermöglichen, wurde diesbezüglich eine statistische Auswertung der signifikanten Biomarker IEL und EOS in der Histologie mittels Mann-Whitney-U-Test vorgenommen.

Hier zeigte sich, dass sich die IEL Werte in der Histologie von Patienten, die in der CLE auf Weizen oder Hefe reagiert hatten (CLE+80 (W/H)) und CLE+80 Patienten, die auf Milch, Soja oder Ei reagierten (CLE+80 (M/S/E)), nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 22).

CLE+80 (W/H) Patienten wiesen zwar eine etwas geringere Konzentration an ECP/ μ l in der duodenalen Flüssigkeit auf als CLE+80 Patienten, die auf Milch, Soja oder Ei reagiert haben, jedoch ist dieses nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 23).

IEL/100 Epithelien in der Histologie

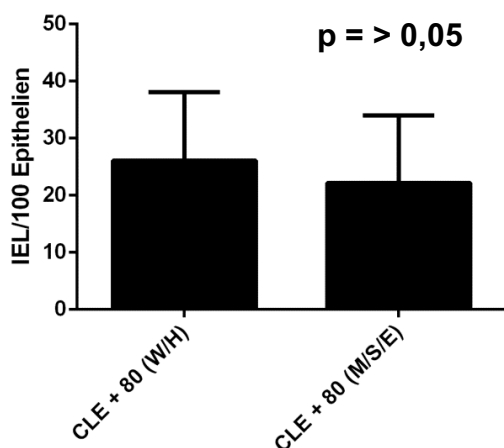


Abbildung 22: IEL/100 Epithelien nach Nahrungsmittelprovokation, gemessen in der histologischen Zählung; Vergleich zwischen CLE+80 (W/H) (Median 26,91) und CLE+80 (M/S/E) (Median 21,13; Mann-Whitney-U-Test: $U=133$, $p=0,32$).

ECP/ μ l in der Spülflüssigkeit

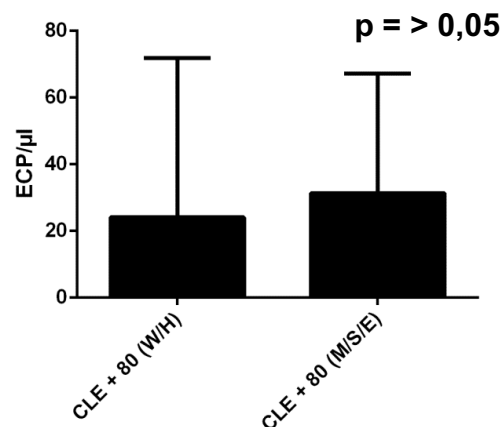


Abbildung 23: ECP/ μ l nach Nahrungsmittelprovokation in der Endomikroskopie aus duodenaler Flüssigkeit gemessen; Vergleich zwischen CLE+80 (W/H) (Median=22,36) und CLE+ (M/S/E) (Median = 26,91; Mann-Whitney-U-Test: $U = 108,5$, $p=0,45$).

3.4.6. Extraintestinale Symptome

In der Anamnese der IBS Patienten fiel auf, dass einige der CLE+ Patienten (11 von 76 CLE+, 14,47%) nach dem Verzehr von bestimmten Nahrungsallergenen Urtikaria ähnliche Hautveränderungen beschrieben (siehe Abbildung 25). Insgesamt 8 der Patienten (72,72%) beschrieben nach dreimonatiger Ausschlussdiät einen deutlichen Rückgang der Hautveränderungen. Zusätzlich berichteten 6 Patienten von einem ausgeprägten, teils steroidresistenten Lidexzem (davon 3, die zusätzlich Urtikaria ähnliche Veränderungen aufwiesen), das sich bei 4 von den Patienten nach 3-monatiger Individualdiät deutlich zurückgebildet hatte (siehe Abbildung 24).

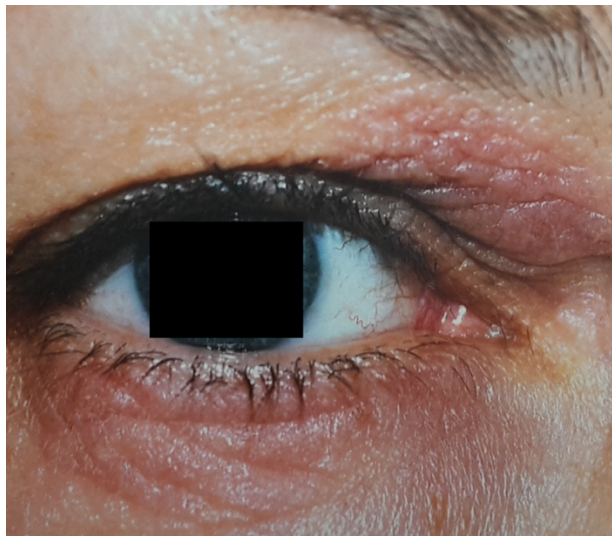


Abbildung 24: Frontalaufnahme einer Patientin, die bis zur Studie unter einem starken Lidexzem litt, dass sich auch unter der Therapie mit topischen Hydrocortison nicht zurückbildete; nach 3-monatiger Individualdiät war der Hautbefund stark rückläufig.

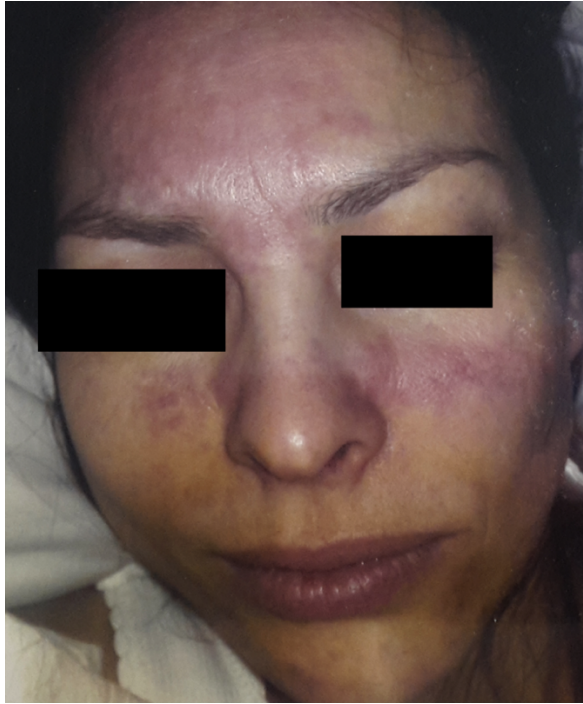


Abbildung 25: Frontalaufnahme einer Patientin mit einem deutlichem Gesichtserythem sowie einer Quaddelbildung nach dem Genuss von Weizenprodukten. Diese Veränderungen waren nach Einhaltung einer weizenfreien Diät nach drei Monaten verschwunden.

4. Diskussion

Obwohl die Pathophysiologie des großen Symptomkomplexes des IBS bis heute nicht vollständig verstanden ist, ist allgemein anerkannt, dass durch die Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems eine chronische, unterschwellige gastrointestinale Entzündung initiiert wird, die die variable klinische Symptomatik des Patienten provozieren kann (Barbara et al., 2002). In den bisherigen IBS Studien wurden sowohl Entzündungsmarker, Auto- und Immunreaktionen und exogene Stressoren wie Bakterien untersucht, die eine Pathologie im Darm mit mikro- und makroskopischen Veränderungen bei IBS Patienten vermuten lassen (Sinagra et al., 2016). Andere Studien haben bereits versucht, Biomarker für ein IBS zu finden, jedoch ohne eindeutige Ergebnisse (Barbara and Stanghellini, 2009; Barbara, 2014; Corsetti, Van Oudenhove and Tack, 2014; Sood, Law and Ford, 2014). Bisher war es jedoch auch nicht möglich, klare Subgruppen des IBS zu definieren wie zum Beispiel Nahrungsmittelsensitivitäten, denn eine endoskopisch makroskopisch detektierbare pathologische Reaktion der gastrointestinalen Mukosa auf Nahrungsmittelallergene waren bei IBS Patienten nicht sichtbar zu machen. Erst die statische Beschreibung einer „Ist“ Situation (Kiesslich and Neurath, 2007; De Palma, 2009; Turcotte et al., 2013; Canto et al., 2014). Eine in-vivo Darstellung und Veränderung nach einer Exposition der Mukosa hatte es nicht gegeben. Die Vermutung, dass ein IBS aufgrund einer Provokation durch Nahrungsmittel hervorgerufen werden kann, wurde bereits 1982 von Jones et al. formuliert (Jones et al., 1982). Da bis zu 60 % der IBS Patienten beklagen, dass Ihre Beschwerden nach Nahrungsmittelaufnahme entstehen, lag es nahe, diese IBS Patienten auf bestimmte Nahrungsmittelallergene hin zu untersuchen (Ragnarsson and Bodemar, 1998; Böhn et al., 2013). Dennoch haben sich beide Arbeiten, wie auch viele spätere Studien in Ermangelung grundlegender Erkenntnisse, auf Untersuchungen mittels Fragebögen beschränkt. Ragnarsson et al. hatte eine 6-wöchige prospektive Symptombefragung durchgeführt, um die subjektiven Aussagen der Patienten nachzuvollziehen zu können. Böhn et al. hatte den Fokus auf bestimmte Nahrungsmittelgruppen, die Relation zur Lebensqualität, zu Body-Mass-Index, Alter, Geschlecht etc. gelegt (sich also eher epidemiologisch orientiert). Keine der Studien haben an eine Allergie oder „allergieähnliche Symptomatik“ gedacht und einfache Untersuchungen durchgeführt wie IgE getestet oder eine Allergianamnese erhoben. Diese Denkweise einer eher „funktionellen“ und nicht „somatischen“ Störung hält vielerorts bis heute vor. Schlussfolgernd glaubte man, die IBS Symptomatik durch Ausschlussdiäten und/oder standardisierte Fragebögen nachweisen oder zumindest vermuten zu können (Simrén et al., 2001). Die zeitlich teilweise deutlich verspäteten klinischen gastrointestinalen Symptome der IBS Patienten mit einer nicht IgE-vermittelten Nahrungsmittelsensitivität sind am ehesten durch unterschiedlichste pathophysiologische Prozesse zu erklären, die alle mit zeitlich variierenden Veränderungen der enterischen Sekretion, Permeabilität, Motilität und Sensibilität einhergehen. Aber gerade die zeitliche Verzögerung macht die Interpretation nach oraler Provokation schwierig. Positive Reaktionen auf Nahrungsmittel sind erst nach einer zeitlich sehr variablen Spanne von nur

15 bis 20 Minuten bis zu mehreren Stunden und Tage zu erwarten und eine negative Reaktion kann erst nach mehreren Tagen sicher ausgeschlossen werden (Niggemann, Beyer and Wahn, 1994; Rothenberg, 1998; Bischoff, Mayer and Manns, 2000; Serra, Azpiroz and Malagelada, 2001).

In den letzten Jahren konnte die CLE in der ersten Pilotstudie zur Erforschung der Veränderung der Darmoberfläche nach Nahrungsmittelprovokation bei IBS Patienten, die berichteten, dass sich ihre Symptome nach Nahrungsaufnahme verschlechterten, erfolgreich eingesetzt werden. Die Methode bewies bei der Mehrzahl dieser Patienten das Vorliegen einer dynamische Veränderung an der Mukosa nur wenige Minuten nach Nahrungsmittelprovokation (Fritscher-Ravens et al., 2014). Die Symptome der Patienten verschwanden oder verbesserten sich stark, wenn das Allergen, das in der CLE positiv getestet worden war, aus der Nahrung eliminiert wurde (Fritscher-Ravens et al., 2014, 2019). Mithilfe dieser CLE Technik als klinisch endoskopische Provokationstestung auf Nahrungsmittelallergene und den anschließenden Ausschlussdiäten des in der CLE reagierenden Antigens konnte so eine Nahrungsmittelsensitivität bei einem großen Teil der IBS Patienten (22 von 36 IBS Patienten, 61 %) nachgewiesen werden.

Die Auswertung dieser Arbeit bestätigte die erste Pilotstudie, aus der sich vermuten ließ, dass 50-60% der IBS Patienten an einer Nahrungsmittelsensitivität leiden könnten (Fritscher-Ravens et al., 2014). In der vorgelegten Arbeit waren 76 von 108 Studienpatienten CLE+ (70,3 %) positiv. Von diesen 76 Patienten konnte man bei 52 (48 % von 108 IBS Patienten) durch eine individuelle Ausschlussdiät eine Symptombesserung von über 80 % erzielen, die restlichen 24 Patienten gaben eine durchschnittliche Besserung von 45,21 % nach 3 Monaten und 41,25 % nach 6 Monaten an. Drei Patienten zeigten unter der individuellen Ausschlussdiät keine Verbesserung der Beschwerdesymptomatik.

Somit konnte eine Nahrungsmittelsensitivität nicht nur endomikroskopisch nachgewiesen werden, sondern im randomisierten, durch Placebo kontrollierten Nahrungsmittelausschlussversuch über einen längeren Zeitraum beobachtet, diagnostiziert und erfolgreich therapiert werden.

Auffälligste Reaktion in der endoskopischen Darstellung der Mukosa bei CLE+ Patienten war die Sichtbarkeit von Epithelaufbrüchen mit explosionsartigem Entleeren von Kontrastmittel in die Zellzwischenzellräume, die sich bereits innerhalb von 5 Minuten nach der Provokation zeigten (Fritscher-Ravens et al., 2014). Auch in der vorgelegten Arbeit war dieses die prominenteste und durchgängig vorhandene Reaktion des endoskopischen Provokationstests.

Diese Reaktion führte zu einer Akkumulation des Fluoresceins in den epithelialen Zwischenzellräumen mit nachfolgender Plasmasekretion in das intestinale Lumen durch parazelluläre Vorgänge.

Der hier in vivo beobachtete Reaktionsmechanismus in der CLE steht im Einklang mit anderen Studien, in denen eine erhöhte Permeabilität (Dunlop et al., 2006; Vazquez-Roque et al., 2012), das Aufbrechen der Zwischenzellverbände (tight-junction Komplex) der intestinalen Mukosa (Martínez

et al., 2013) und die Veränderungen der Epitheldurchlässigkeit von Biopsien ex-vivo in Ussing-Kammern, bei IBS Patienten untersucht worden sind (Piche et al., 2009).

Dieses Phänomen zeigte sich niemals bei den Baseline Aufnahmen von CLE+, CLE- Patienten oder HC, aber auch nicht nach den Provokationen der als CLE- klassifizierten Patienten oder den HC.

Bei den Lymphozytenzählungen im endomikroskopischen Bild nach Nahrungsmittelprovokation ergab sich in dieser Arbeit divergentes Ergebnis im Vergleich zur Pilotstudie (Fritscher-Ravens et al., 2014, 2019) (IEL in der CLE post Nahrungsmittelprovokation (2014 vs. 2019); HC 13.2 ± 2.1 vs. 9.47 ± 2.71 ; CLE+ 24.7 ± 1.4 vs. 24.90 ± 4.7 ; CLE- 16.3 ± 1.6 vs. 12.10 ± 2.2). Die leichten, aber in der jetzigen Arbeit signifikanten Unterschiede bei den endomikroskopischen Lymphozytenzählungen nach der Nahrungsmittelprovokation sind auf die größere Anzahl der untersuchten Patienten zurückzuführen (n= 36 vs. 108; 2014 vs. 2019), sowie vor allem auf die bessere Primärselektion der Patienten in der Kontrollgruppe. Anders als in der ersten Pilotstudie mussten auch die HC in dieser Arbeit die Fragebögen beantworten, im Besonderen dem Francis IBS Score, wodurch ein auch bisher nicht erkanntes IBS herausselektiert werden konnte. Dieses führte im Vergleich der Lymphozytenzählungen im endomikroskopischen Bild zu deutlich niedrigeren Ergebnissen bei den HC und den nun signifikanten Ergebnissen im Vergleich zu CLE- und CLE+. In der vorgelegten Arbeit zeigten die Patienten, die mittels CLE als CLE+ Patienten diagnostiziert wurden, eine hoch signifikante Langzeitreaktion auf die individuelle Ausschlussdiät im bis zu 6 Monate dauerndem Follow-up.

Während der Patientenrekrutierung wurde wiederholt deutlich, dass die Diagnostik eines IBS allein anhand eines Kriterienkataloges ohne wegweisende Biomarker oder apparative Diagnostik nur eingeschränkt möglich ist. Selbst die Rom III Kriterien weisen lediglich eine mäßige diagnostische Sensitivität von 75 % in der Primärversorgung, sowie eine Sensitivität von 69 % und Spezifität von 80 % in der Sekundärversorgung auf (Engsbro et al., 2013; Ford et al., 2013). In der Literatur wird wiederholt deutlich, dass ein aktuell ausreichender Goldstandard für die Diagnostik nicht vorhanden ist (AC et al., 2008; Canavan, West and Card, 2014; Sood and Ford, 2015).

Die hier eingesetzte Endomikroskopie zeigte eindeutige Veränderungen der Permeabilität der duodenalen Mukosa bei nahrungsmittelsensiblen IBS Patienten. Somit konnte bei IBS Patienten, die auf eine Nahrungsmittelprovokation in der CLE reagierten, ein wiederholbares und objektivierbares Erkennungssystem für Nahrungsmittelsensitivitäten nachgewiesen werden, das als Goldstandard geeignet war und somit auch in dieser Arbeit als Goldstandard bei den IBS Patienten eingesetzt wurde, deren Erkrankung mutmaßlich durch Nahrungsmittelantigene hervorgerufen wurde (Fritscher-Ravens et al., 2014, 2019). Diese Ergebnisse der CLE und der anschließenden Ausschlussdiät wurde die Grundlage für die weitere Analyse von Biomarkern.

Ziel war es, Biomarker zu finden, die richtungsweisend für IBS sein könnten.

In der Literatur wurden bereits eine Reihe von Biomarkern für IBS untersucht, allerdings ohne die Möglichkeit eines Goldstandards zur Diagnose des Symptomkomplexes zur Verfügung zu haben. In einer umfassenden Metaanalyse wurde deutlich, dass neben vielen ungenügend spezifizierten und selektiven Ergebnissen nur die Messung der Transitzeit mit Radioisotopenmarkern eine reproduzierbare und etablierte Methode darstellt (Spiller, 2011). Es zeigt sich, dass unterschiedlichste Methoden zur Bestimmung der Messung der Transitzeit zur Verfügung stehen (Hinton and Young, 1969; Arhan et al., 1981; B. et al., 1987; Metcalf et al., 1987; Sadik et al., 2008). Die Ergebnisse der neueren Studien zeigen, dass diese weitverbreitete Methode dazu dienen kann, unterschiedliche Patientengruppen, wie die mit einer langsamen Transitzeit und die mit IBS-C zu unterscheiden (Gorard, Libby and Farthing, 1994; Evans et al., 1998; Dunlop et al., 2005). Mit neueren Methoden, wie mit einer pH-, druck- und temperaturempfindlichen kabellosen Kapsel, zeigen sich noch weiter differenzierbare Ergebnisse wie unterschiedliche Druckverhältnisse im Kolon und divergente Peristaltik bei HC, IBS-C und obstipierten Patienten (Hasler et al., 2009). Insgesamt betrachtet stellt jedoch die Messung der Transitzeit mit radioisotopischen Markern eine hoch kostenaufwendige Methode dar, die nur durch den Gebrauch von Medikamenten, die die Transitzeit beeinflussen können, valide Ergebnisse liefern kann, so dass die Suche nach geeigneteren Biomarkern für das IBS fortgeführt wurde (Spiller, 2011).

In dieser Arbeit wurden insbesondere solche Biomarker untersucht, die aufgrund ihrer Beteiligung an niedrig inflammatorischen, allergologischen und immunvermittelten Prozessen in der möglichen Pathophysiologie des IBS eine Rolle spielen könnten.

Zudem sollten diese Biomarker auch einen prognostischen Nutzen für die Patienten in der ambulanten und klinischen Diagnostik vorweisen können. Auch war die einfache Durchführbarkeit ihrer Bestimmungen wichtig, weil sie im besten Fall auch von medizinischen Einrichtungen durchgeführt werden können sollten, denen keine hochspeziellen Forschungslabore auf Universitätsniveau zur Verfügung stehen.

Im Rahmen dieser Voraussetzungen zeigte sich die Auszählung von IEL und EOS in der Histologie als gut durchführbare Methode, die im klinischen Alltag bereits etabliert ist. Wie bei der Zöliakiediagnostik wurden die IEL leitliniengemäß aus Duodenalbiopsien bestimmt (Schuppan and Zimmer, 2013). Die Auszählung der EOS pro HPF stellt eine bereits in anderen Arbeiten durchgeführte, standardisierte Methodik dar (Walker et al., 2009). Auch die Messung von ECP und Tryptase aus der Spülflüssigkeit der Duodenaloberfläche ist eine modifizierte Messmethode einer bereits etablierten Diagnostik für andere Erkrankungen wie Asthma und CED (Kristjánsson et al., 1994; Luck et al., 1997; Vitte, 2015). Allerdings gibt die Entnahme von Flüssigkeit aus dem Duodenum gelegentlich Probleme auf, da nur wenig Flüssigkeit zur Verfügung steht.

Die vorsichtige Entnahme mittels ERCP Katheter ist hier hilfreich. In unseren Duodenalbiopsien konnten bis auf eine Ausnahme, bei der sich eine nestähnliche Anhäufung der IEL fand (siehe

Abbildung 16), in den H&E gefärbten Schnitten kaum Unterschiede in der histologischen Architektur zwischen den HC und den IBS Patienten festgestellt werden. Zu ähnlichen Resultaten, in denen sich kaum histomorphologische Unterschiede der Krypten und Villi zwischen IBS und gesunden Kontrollpatienten fanden, kamen auch die Arbeiten von Guilarte et al., 2007, Walker et al. 2009 und Foley et al., 2011.

In der bisher bekannten Pathophysiologie des IBS wird die Reaktion auf unterschiedlichen Pfaden reguliert, so unter anderem durch zelluläre und molekulare Veränderungen von Enterozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und anderen Immunzellen, die die mukosale Permeabilität regulieren (Martínez et al., 2012, 2013).

So fanden sich in den von uns untersuchten CLE+80 Patienten signifikant erhöhte IEL in den histologischen Schnitten im Vergleich zu CLE- und HC ($p = <0,001$). Auch in dem Vergleich von CLE+80, sowie CLE+80 (W/H) zu CLE- und HC fand sich diese signifikante Erhöhung der histologisch ausgezählten IEL ($p = <0,001$) wieder.

In der ersten Pilotstudie zeigte sich allerdings keine solche Signifikanz (CLE+ $28,7 \pm 4,8$, CLE-: $18,4 \pm 3,7$, HC: $22,2 \pm 3,2$ IEL/100 Epithelien), was besonders im Vergleich mit den jetzt erhobenen Daten auffällt : CLE+ $25,3 \pm 11,92$, CLE-: $19,93 \pm 9,13$, HC: $14,14 \pm 4,3$ IEL/100 Epithelien.

Die unterschiedliche Höhe der IEL könnte zum einen an den zuvor deutlich geringeren Patientenzahlen der ersten Studie liegen; sie ist vor allem aber auch an der verbesserten Selektion der HC zu sehen, die in der vorgelegten Arbeit im Vergleich zu der Pilotstudie deutlich geringere IEL-Werte aufwies. Gerade in Bezug auf das sichere Nichtvorliegen von abdominalen Beschwerden wurden in dieser Studie die Auswahlkriterien enger gefasst, die sicher dazu beigetragen, dass die IEL dieser Gruppe deutlich geringer ausfielen als in der Vorstudie. So wurden auch die Einschlusskriterien für die HC ausschließlich von den Ergebnissen der oben beschriebenen Fragebögen abhängig gemacht und nicht alleine von den subjektiven Aussagen der Patienten wie in der Vorstudie.

Eine ähnliche Methodik bezüglich der Aufarbeitung der Proben und der statistischen Analyse von IEL bei IBS Patienten und HC setzte auch Walker et al., 2009 ein. In der Arbeit wurde in Übereinstimmung mit unseren Daten eine signifikante Erhöhung der IEL in den proximalen Duodenalbiopsien im Vergleich von IBS Patienten zu HC gefunden ($p = 0,016$). In Kongruenz zu unseren Daten haben auch Foley et al. im direkten Vergleich von IBS, HC und Patienten mit einer CED zeigen können, dass die IBS Patienten signifikant erhöhte IEL in Duodenalbiopsien im Vergleich zu HC aufwiesen ($p = < 0,01$). Weiterhin wurde eine auch hoch signifikante Erhöhung der IEL in Jejunalbiopsien von IBS Patienten (diagnostiziert mittels der ROME II-Kriterien) im Vergleich zu HC ($p = <0,006$) bei Guilarte et al., 2007 nachgewiesen. In den Kolonbiopsien von IBS Patienten (nach ROME II Kriterien diagnostiziert) zeigte sich auch eine Erhöhung der IEL ($p = < 0,01$), sowie

zusätzlich eine hoch signifikant erhöhte Anzahl von CD3 und CD25 positiven Lymphozyten in der Lamina propria ($p = < 0,001$) im Vergleich zu Biopsien von gesunden Kontrollpatienten (Chadwick et al., 2002).

Erhöhte IEL können die Permeabilität der intestinalen Wand durch Aktivierung der Myosin-Leicht-Kinase und Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten erhöhen (Wang et al., 2005; Weber et al., 2010), entsprechend könnte sich so die Permeabilitätsstörung bei den CLE+ Patienten erklären. Eine unterschwellige Entzündungsreaktion mit einer Erhöhung der IEL ist daher nach unseren Ergebnissen und den vorliegenden Veröffentlichungen als wahrscheinlich, aber nicht beweisend anzunehmen. Wir konnten bei einem Teil der Patienten einen deutlichen Rückgang der IEL nach Ausschlussdiät aufzeigen, sodass die Ausschlussdiät einen kurativen Therapieansatz darstellen könnte (Ruchay et al., 2015).

EOS spielen eine wichtige Rolle im zellulären Immunsystem des Verdauungstraktes und sind essentiell in der Abwehr von verschiedensten Infektionen, spielen aber auch eine wichtige Rolle im zellulären Immunsystem des Verdauungstraktes (Rothenberg, 2004). In unserer Studie zeigte sich eine nicht signifikante Erhöhung der EOS von CLE+ Patienten gegenüber den anderen Patientengruppen ($p = > 0,05$).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt Walker et al., 2009. Hier konnte auch keine signifikante Erhöhung von eosinophilen Granulozyten in der Duodenalschleimhaut im Vergleich zu einer randomisierten Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand sich im Zökum von IBS Patienten eine erhöhte Anzahl von EOS im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Patienten mit einem Kolonkarzinom in der Familienanamnese (De Silva et al., 2012). Bei dieser Studie ist allerdings die unterschiedliche Lokalität im Darm, die selektierte Kontrollgruppe ($n=14$), sowie die geringen Fallzahlen von 49 IBS Patienten zu beachten, von denen 16 der 49 IBS Patienten anamnestisch eine infektiöse Diarrhoe angaben. In einer koreanischen Studie zeigte sich bei 23% der IBS Patienten (nach ROME II Kriterien) eine erhöhte Zahl an EOS im terminalen Ileum, Kolon und Rektum im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne IBS (Park et al., 2008).

Die 2000 veröffentlichte Arbeit von O'Sullivan et al. wiederum wies bei IBS Patienten (nach ROME I Kriterien) keine erhöhte Anzahl an EOS in Kolonbiopsien im Vergleich zu HC nach. (O'Sullivan et al., 2000). Die vorliegenden Arbeiten zeigen ein uneinheitliches Bild in Bezug auf das Vorliegen von erhöhten eosinophilen Granulozyten. Unsere Ergebnisse zeigen keine signifikanten Veränderungen der EOS im Duodenum und befinden sich in Kongruenz mit anderen Studien. Eine erhöhte EOS Anzahl wurde weitestgehend in den weiter distal gelegenen Darm Abschnitten (Zökum, terminales Ileum, Kolon und Rektum) gesehen. Die EOS scheinen eine bisher undefinierte Rolle im Rahmen des IBS Syndroms einzunehmen.

Die Aktivierung von EOS im Darm kann durch eine große Anzahl von Stimuli erfolgen. So bewirken unter anderem Allergene, nicht spezifische Gewebsverletzung, sowie Infektionen eine Degranulation der EOS. Bei der Degranulation der EOS werden multiple zytotoxische Proteine, die die Noxen aus dem Körper beseitigen sollen, ausgestoßen.

Diese zytotoxischen Proteine (ECP, eosinophile Peroxidase, eosinophil-derived neurotoxin (EDN) und major basic protein (MBP)) können zu einer toxischen Zerstörung und einer schnell einsetzenden epithelialen Funktionsstörung führen (Rothenberg, 1998; Furuta et al., 2005; Kalach et al., 2013; Travers and Rothenberg, 2015; O'Shea et al., 2018).

ECP ist ein zytotoxisches und neurotoxisches Protein mit einem Molekulargewicht von 21.000 Dalton. Es wird von aktivierten EOS freigesetzt und ist fast ausschließlich in diesen enthalten. Abgesehen von der zytotoxischen Komponente des ECP fanden sich auch einige relevante, nicht zytotoxische Funktionen des ECP in-vitro (Barnes, Rodger and Thomson, 1998).

Unter anderem zählt zu diesen nicht zytotoxischen Funktionen die Inhibition der Antigen-induzierten Proliferation von T-Lymphozyten und die Hemmung der Immunglobulinsynthese von B-Lymphozyten. ECP setzt zusätzlich Histamin und Tryptase aus humanen Herzmastzellen frei und stimuliert auch die Freisetzung von Histamin aus humanen basophilen Lymphozyten (Bergstrand et al., 1985; Patella et al., 1996).

In dieser Arbeit war das mittels langsamen Sogs durch einen ERCP Katheter in der Spülflüssigkeit gewonnene ECP nach Nahrungsmittelprovokation bei CLE+ (CLE+ 80; CLE+ 80 (W/H)) im Vergleich zu HC ($p = < 0,05$) signifikant erhöht. In Kongruenz zu unseren Daten fanden sich in einer anderen Studie mit „nahrungsmittelsensitiven“ IBS Patienten (Patienten mit anamnestischer Nahrungsmittelsensitivität, getestet im Prick-Test, Serum IgE Analysen und einer doppelt geblindeten Placebo kontrollierten Nahrungsmitteldiät) signifikant erhöhtes ECP in der gastrointestinalen Lavage im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten ($p = 0,007$) (Arslan et al., 2004). Die Konzentrationsbestimmung fand bei Arslan et al. wie auch in unserer Arbeit mittels des ImmunoCAP® Systems statt. Auch in Stuhlproben von IBS Patienten mit einer diätetisch nachgewiesenen Nahrungsmittelsensitivität konnte eine höhere ECP Konzentration im Vergleich zu HC nachgewiesen werden (Carroccio et al., 2011). Im Gegensatz dazu wurde keine veränderte ECP Konzentration bei, nach ROME II Kriterien rekrutierten, IBS Patienten ($25,7 \pm 4,7 \mu\text{g/l}$) im Vergleich zu HC ($32,7 \pm 7,2 \mu\text{g/l}$) im Kolon nachgewiesen, die dort mithilfe einer mukosalen Patchtechnik untersucht wurden (Kristjánsson et al., 2004).

Durch die unterschiedliche Art der Messung von ECP und die andere Lokalisation ist ein direkter Vergleich dieser Studie zu unseren Daten allerdings nicht angezeigt. Die ECP Werte bei unseren CLE+ Patienten waren lediglich im Vergleich zu den HC signifikant unterschiedlich, nicht aber zu den CLE- Patienten ($p = 0,28$), bei denen hohe Standardabweichungen gesehen worden waren (CLE+: $21,78 \pm 41,35$; CLE-: $11,64 \pm 17$).

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass einige der CLE- Patienten auch eine Nahrungsmittelsensitivität gegenüber Nahrungsmittelallergenen aufwiesen, dann aber auf solche, auf die sie aber innerhalb dieser Arbeit nicht getestet worden waren. Sie waren sozusagen „Nicht-erkannte“ CLE+ Patienten. ECP wurde somit als möglicher Mediator eines pathologischen Prozesses bei nahrungsmittelsensitiven IBS Patienten identifiziert.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen EOS und ECP ist in der Literatur, insbesondere bei IBS Patienten, bisher nur wenig untersucht worden. Eine Studie konnte bei Patienten mit einer Nahrungsmittelallergie eine hoch signifikante Korrelation zwischen der basalen Freisetzung von ECP und der Dichte von eosinophilen Granulozyten im Kolon im Gegensatz zu gesunden Kontrollpatienten aufzeigen. Auch zeigte sich hier eine erhöhte Rate von Degranulationen der EOS in den koloskopisch gewonnenen Biopsien, ähnlich wie in unserer Studie (Schwab et al., 2003).

Da die pathophysiologische Reaktion bei nahrungsmittelsensitiven IBS Patienten noch nicht abschließend erklärt ist, aber auch hier eine zumindest allergieähnliche Komponente zu vermuten ist, wurde in dieser Arbeit eine mögliche Korrelation von ECP und EOS untersucht.

Zudem geht aus der Literatur hervor, dass das intestinale ECP zu einem großen Teil von den intestinalen eosinophilen Granulozyten gebildet wird (Levi-Schaffer et al., 1996; Lampinen et al., 2005). Das Ergebnis der von uns untersuchten Patienten ergab allerdings keine nachweisbare Korrelation zwischen der Konzentration des ECP und der Anzahl der EOS in den Duodenalbiopsien, weder bei CLE+ Patienten, noch bei den CLE+80 Patienten. In Kongruenz zu Schwab et al., 2003 fanden sich aber in der Auswertung der histologischen Schnitte der CLE+ Patienten in einigen Biopsien Degranulationen der EOS (siehe Abbildung 17). Obwohl sich in dieser Arbeit keine signifikante Erhöhung der EOS zeigte, könnten die gehäuften Degranulationen der eosinophilen Granulozyten in den Schnitten der CLE+ Patienten auf eine atypische Nahrungsmittelreaktion hinweisen, welche durch eine Aktivierung der eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist.

Aufgrund der vermuteten allergisch-entzündlichen Pathophysiologie im Darm der Reizdarmpatienten wurde insbesondere auch die alpha-Tryptase als einer der möglich hinweisenden Biomarker in den letzten Jahren erforscht (Arslan et al., 2002; Walker et al., 2009). Die alpha-Tryptase ist eine Serin-Protease, die durch eine Mastzellaktivierung aus diesen bei Stimulation freigesetzt wird. Im Menschen sind 4 Isoformen der Tryptase bekannt, wobei nur die Alpha- und Beta-Tryptase als medizinisch relevant gelten (Vitte, 2015).

ECP und sowie auch Tryptase sind bei IBS Patienten in anderen Studien mit unterschiedlichen Methoden gastrointestinal gewonnen und weiter untersucht worden. Es wurden für die Gewinnung der zu untersuchenden Proben unter anderem die Technik der gastrointestinalen Lavage, die Aspiration von Flüssigkeit über den Arbeitskanal des Endoskops und eine Patchtechnik im Kolon der Patienten angewendet (Levy et al., 1997; Arslan et al., 2004; Kristjánsson et al., 2004).

Der Vorteil der Entnahme der Spülflüssigkeit, wie auch in dieser Arbeit durchgeführt, ist die Einfachheit der Durchführung während der endoskopischen Untersuchung. Das vorsichtige und langsame Absaugen der Spülflüssigkeit durch das Endoskop, mit dem nach der Nahrungsmittelprovokation unter Sicht die Spülflüssigkeit durch einen ERCP Katheter aspiriert wird, bedarf keiner speziellen Technik.

Im Vergleich zur gastrointestinalen Lavage, wie bei Berstad et al., 2000 und Arslan et al., 2004, ist dies eine einfache Diagnostik, die keine zusätzliche Inkubationszeit erfordert und auch das gewonnene Probenmaterial mit der hier verwendeten Technik direkt aufgearbeitet werden kann. Die native Aufarbeitung mittels Zentrifugation und anschließender Auswertung durch das ImmunoCAP® System stellt eine weitere gut durchführbare Aufarbeitung des Probenmaterials dar. Eine vergleichbare Aufarbeitung des Materials findet sich bei Arslan et al., 2004 und Guilarte et al., 2007. Somit stellt die Materialgewinnung und weitere Aufarbeitung von ECP und Tryptase in der Spülflüssigkeit ein einfach durchführbares und gut in den klinischen Alltag integrierbares diagnostisches Mittel dar. Allerdings fanden sich in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der Konzentration der Tryptase zwischen CLE+, CLE+80 oder CLE+80 (W/H) IBS Patienten zu den CLE- Patienten oder den Kontrollpatienten ($p = 0,81$). Insgesamt zeigten alle untersuchten Gruppen ähnlich niedrige Konzentrationen mit Mittelwerten um $1,1 - 3,4 \mu\text{g/l}$.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich in der Konzentrationsbestimmung aus der gastrointestinalen Lavage bei IBS Patienten einer anderen Studie (Arslan et al., 2004). Im Kontrast dazu wurden in Biopsien aus dem linken Kolon von IBS Patienten erhöhte Tryptaseausschüttungen (mittels immunoenzymatischer Aufarbeitung) gemessen (Barbara et al., 2004). Auch wurden signifikant erhöhte Tryptasewerte in jejunalem Aspirat (gemessen mittels Fluoreszenzimmunoassay; $p = 0,005$), sowie eine signifikant erhöhte Anzahl von Mastzellen bei IBS Patienten (rekrutiert nach Rome II) im Vergleich zu HC gefunden ($p = < 0,001$) (Guilarte et al., 2007). Alpha-Tryptase findet sich in vielen menschlichen Flüssigkeiten und kann dort als möglicher Parameter für den Grad der Mastzellaktivierung quantifiziert werden (Schwartz et al., 1987). Die Höhe der gemessenen Tryptase korrelierte allerdings nicht mit der Anzahl der Mastzellen, obwohl mukosale Mastzellen als einzig relevante Tryptasequelle im Darm gelten (Guilarte et al., 2007). Auch hier sind wieder die unterschiedliche Darmregion sowie die unterschiedlichen Messmethoden zu beachten. Trotzdem weist diese Studie auf einen weiteren interessanten Biomarker des IBS hin, die Mastzellen. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der gastrointestinalen Motilität und der mukosalen und epithelialen gastrointestinalen Barrierefunktion (Santos et al., 2005).

Sowohl akuter als auch chronischer Stress führen zu einer Aktivierung der gastrointestinalen Mastzellen (Santos et al., 2001; Eutamene et al., 2003). Eine erhöhte Anzahl von Mastzellen und Mastzellproteinen wurden im terminalen Ileum und proximalen sowie distalen Kolon bei IBS Patienten gefunden (Weston et al. 1993; O'Sullivan et al. 2000).

Da nach der Nahrungsmittelprovokation kein Anstieg der histologischen Mastzellen / basophilen Granulozyten und keine verstärkten Mastzellmediatoren (Tryptase) in der Spülflüssigkeit festzustellen war, gehen wir von einer nichtklassischen oder atypischen Nahrungsmittelallergie als Ursache der von der CLE beobachteten Schleimhautreaktion aus.

Die Atopie als eine komplex immunvermittelte Reaktion, die sich bei den Patienten sehr unterschiedlich in der Symptomatik äußern kann, ist in der Verbindung zum nahrungsmittelsensiblen Reizdarmsyndrom Gegenstand von sowohl älterer als auch neuerer Forschung, daher wurde diese in unsere Untersuchung und Auswertung mit einbezogen (Petitpierre, Gumowski and Girard, 1985; Arslan et al., 2004; Park and Camilleri, 2006; Tobin et al., 2008). Als komplexe pathophysiologische Prädisposition ist die Atopie möglicherweise über gemeinsame biomolekulare Teil- oder Endstrecken mit dem nahrungsmittelsensiblen IBS verbunden (Bischoff, Mayer and Manns, 2000). Ein solcher Zusammenhang konnte nach ausführlicher Anamneseerhebung in dieser Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich, dass bei CLE+, CLE+80 und CLE+80 (W/H) IBS Patienten die Wahrscheinlichkeit einer Atopie beim Patienten oder bei Verwandten 1. Grades signifikant erhöht ist im Vergleich zu CLE- Patienten und den Kontrollpatienten ($p = <0,05$). Zusätzlich fiel auf, dass 11 der CLE+ Patienten (14,47 %) Urtikaria ähnliche Veränderungen oder steroidresistente Lidekzeme (6 von 76 CLE+ Patienten, 7,9 %) vorwiesen (siehe Abbildungen 24 und 25). Bei 4 der Patienten mit Lidekzemen ließ sich ein deutlicher Rückgang des Ekzems nach 2-monatiger Ausschlussdiät beobachten, sowie insgesamt in 8 der 11 Patienten mit Urtikaria (72,72 %), wenngleich diese Aussage durch das intermittierende Auftreten der Erkrankung relativiert werden muss. In Analogie zu diesen Ergebnissen konnten Petitpierre, Gumowski und Girard et al. bereits 1985 zeigen, dass sich bei einer kleinen Gruppe von Patienten mit atopischer Vorgeschichte, IBS Symptome bei dem Verzehr von bestimmten Nahrungsmitteln induzieren ließen. In unserer Studie reagierte keiner der HC auf Nahrungsmittel, weder intestinal noch extraintestinal.

Mittels Fragebögen und klinischen Parametern wurde auch in neueren Studien eine Assoziation zwischen IBS-Patienten und Patienten mit atopischer Vorgeschichte nachgewiesen (Tobin et al., 2008). Trotz der engen Verknüpfung von Atopie und IBS, ist ein IBS nur bei wenigen Patienten auf einer echten Immunglobulin vermittelten Nahrungsmittelallergie begründet (Monsbakken et al. 2006). Diese Ergebnisse lassen eine enge Verknüpfung der Atopie mit dem nahrungsmittelassozierten Reizdarmsyndrom wahrscheinlicher werden. Zudem zeigt insbesondere die Studie von Jones et al., dass ein nahrungsmittelassoziertes IBS Syndrom eine Pathologie darstellt, die mit einem niedrig inflammatorischen, gastrointestinalen Prozess in Verbindung stehen könnte (Jones et al., 1982).

In dieser Studie mit der CLE in Kombination mit den Ausschlussdiäten als Goldstandard, wurden folgende potentiell prognostische Biomarker nachgewiesen:

- IEL in der Duodenalbiopsie
- ECP in der Spülflüssigkeit
- anamnestische erhobene Atopie.

Diese Marker waren bei den CLE+ Patienten im Vergleich zu HC signifikant erhöht und könnten als mögliche prognostische Parameter für den Verdacht auf das Vorliegen einer Reaktion auf Nahrungsmittel fungieren. In einer 2016 veröffentlichten multizentrischen Studie von Mujagic et al. konnten 8 Biomarker zur Differenzierung von IBS Patienten (nach dem ROME III Kriterien rekrutiert) und HC mit guter Sensitivität und Spezifität (88,1 % und 86,5 %) definiert werden. Jedoch basierte zum einen die Definition eines IBS Patienten hier alleine auf den Rome III Kriterien, zum anderen handelte es sich um sehr kostenaufwendige Serumbestimmungen (IL-1 β , IL-6, IL-12p70) und Stuhluntersuchungen (Human β -Defensin, Chromogranin A, SCFA C5 und C6), die teilweise noch nicht im ambulanten Rahmen verfügbar sind (Mujagic et al., 2016). Differenzierung in Nahrungsmittelsensitivitäten waren nicht Bestandteil der o.a. Studie. Mit aufgenommen in die Kombination der 8 Biomarker wurde auch das Calprotectin in Stuhlproben. Bereits Silberer et al. konnten 2005 nachweisen, dass sich die Schwere der gastrointestinalen Entzündung bei den CED Patienten, aber auch bei IBS Patienten mithilfe des fäkalen Calprotectin gut einschätzen lässt (Silberer et al., 2005). Auch konnte nachgewiesen werden, dass bei IBS Patienten die Calprotectinwerte (22 μ g/g) tendenziell gegenüber Kontrollpatienten (11 μ g/g) erhöht sind, wenngleich insgesamt im Normbereich (Costa et al., 2003). Außerhalb unserer Studie wurden auch bei einigen CLE+ Patienten minimal erhöhte fäkale Calprotectin Werte gemessen, die sich bei Einhalten der Ausschlussdiät in der Nachkontrolle nach 2 Monaten zurückbildeten. Eine Verbindung zwischen erhöhten fäkalen Calprotectinwerten und einem IBS mit Nahrungsmittelsensitivität erscheint somit wahrscheinlich. Ein solcher Nachweis war aber nicht Gegenstand dieser Studie.

Insgesamt ist jedoch bei den erwähnten Studien anzumerken, dass für die Überprüfung der Diagnose IBS die diagnostischen Möglichkeiten begrenzt waren und der Nachweis von Reaktionen auf Nahrungsmittel nicht geführt worden war, es sich somit um eine sehr inhomogen Patientengruppe handelte. In der in der Einleitung erwähnten Metaanalyse von Camilleri wurde zudem deutlich, dass Subgruppenanalysen in Bezug auf mögliche Biomarker zur weiteren Diagnostik und Therapie eines IBS sehr hilfreich sein könnten.

Dieses Ziel konnte innerhalb dieser Arbeit mittels der CLE, sowie den anschließenden Ausschlussdiäten umgesetzt werden. Auch eine mögliche ambulante Durchführbarkeit der Bestimmung von speziellen, möglicherweise prognostischen Biomarkern ist in dieser Arbeit aufgezeigt worden.

Trotz der Häufigkeit des IBS beschränken sich die therapeutischen Möglichkeiten bis heute auf eine rein symptomatische, meist komplexe diätetische Therapie. In experimentellen Ansätzen konnten durch den Einsatz von Psychotherapie, Probiotika und serotonerger Medikation bei bestimmten IBS Gruppen symptomatische Verbesserungen erzielt werden (Mertz, 2003; Kajander et al., 2005; Drossman et al., 2010).

Die vorgelegte Arbeit liefert einen weiteren Baustein zur möglichen Therapie des IBS mit Nahrungsmittelsensitivität: So wurden neben den in den vorherigen Abschnitten dargelegten potentiellen Biomarker zur Diagnostik, die individuelle Ausschlussdiät des als reaktiv erkannten Antigens als sehr praktikabler Therapieansatz aufgezeigt. Diese Ergebnisse könnten im Hinblick auf neue Diagnostik- und Therapiekonzepte des IBS Ansätze für weiterführende Untersuchungen bieten. Basierend auf den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit wäre es interessant zu prüfen, ob eine bessere Selektion der IBS Patienten allein anhand der gefundenen Biomarker gelingt.

4.2. Zusammenfassung

Patienten mit einem Reizdarmsyndrom zu diagnostizieren und zu therapieren stellt eine komplexe und multidisziplinäre Aufgabe dar. Die Notwendigkeit einer gut durchführbaren Diagnostik, sowie einer möglichen Therapie des Reizdarmsyndroms ergibt sich aus den hohen Prävalenzzahlen von bis zu 25 % der Bevölkerung und den damit verbundenen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Folgen (Spiller et al. 2007).

Innerhalb der letzten Jahre wurden viele Ansätze in der Forschung verfolgt, die sowohl Biomarker als auch die zugrunde liegende Pathologie eines Reizdarmsyndroms einschlossen, allerdings bisher ohne klinisch oder therapeutisch umsetzbaren Erfolg. Ursächlich dafür war einerseits, dass eine exakte Diagnosestellung der Untergruppen bisher nicht möglich war und somit nur eine ungenügende Standardisierung der Diagnostik der Reizdarmpatienten stattfinden konnte. Zudem gab es keine verlässlichen Biomarker. Diejenigen, die aussagekräftig waren, waren hochaufwendig zu bestimmen sowie kostenintensiv und nicht für die Routine geeignet.

Die neuartige Methode der konfokalen Laserendomikroskopie erbrachte erstmals einen möglichen Goldstandard in die Diagnostik des Reizdarmpatienten mit Nahrungsmittelsensitivität, wenn auch nur unter Studienbedingungen (Fritscher-Ravens et al., 2014, 2019). Basierend auf dieser Methode hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, potentiell prognostische Biomarker zu finden, die richtungsweisend für eine Nahrungsmittelsensitivität bei Reizdarmpatienten sein können, aber auch in einem ambulanten Setting bestimmt werden könnten.

Für diese Untersuchungen gelang es, innerhalb einer größeren klinischen Studie die Daten von 170 Reizdarmpatienten und 14 Kontrollpatienten auszuwerten. Von diesen erfolgte bei 108 Reizdarmpatienten nicht nur eine laserendomikroskopische Diagnostik, sondern auch eine nachfolgende individuelle Ausschlussdiät auf das in der Endomikroskopie regierende Agens über 6 Monate. Von den Reizdarmpatienten und den Kontrollpatienten konnten sowohl die initiale endomikroskopische Diagnostik, das klinische Ergebnis der Ausschlussdiäten, sowie die potentiellen Biomarker in die Analysen eingeschlossen und entsprechend untersucht werden. Die selektierten Biomarker wurden histologisch, immunhistochemisch sowie laborchemisch aufgearbeitet und untersucht, sowie anschließend innerhalb der unterschiedlichen Gruppen von Reizdarmpatienten, die eine positives Ergebnis in der Endomikroskopie hatten, solchen die in der Endomikroskopie negativ verblieben und den Kontrollpatienten ausgewertet.

Es zeigte sich, dass insbesondere die Wahrscheinlichkeit einer anamnestisch erhobenen Atopie, die Konzentration des eosinophilen kationischen Proteins aus der Spülflüssigkeit und die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten in den Duodenalbiopsien nach Nahrungsmittelprovokation bei den Reizdarmpatienten, die ein positives laserendomikroskopisches Ergebnis hatten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten signifikant erhöht waren.

Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Duodenum war leicht erhöht, jedoch nicht signifikant, es wurden allerdings vermehrt Degranulationen beobachtet.

Kein Unterschied fand sich bei Konzentration der Tryptase in der duodenalen Spülflüssigkeit zwischen den einzelnen Gruppen.

Somit konnten innerhalb dieser Arbeit erstmalig Biomarker bei Reizdarmpatienten mit Nahrungsmittelsensitivität bestimmt werden, die auf eine pathologische Veränderung bei Reizdarmpatienten mit Nahrungsmittelsensitivität schließen lassen. Die Untersuchungen zeigten, dass diese Veränderungen mit einem allergieähnlichen, unterschwelligem entzündlich-gewebeschädigendem Prozess einhergehen, der sich während der individuellen Ausschlussdiäten (teilweise) zurückbildete (siehe 3.4.6.). Weiterführende Studien werden benötigt, die diese Ergebnisse bestätigen.

5. Literaturverzeichnis

- A. Berstad, G. Arslan, G. Folvik (2000) 'Relationship between Intestinal Permeability and Calprotectin Concentration in Gut Lavage Fluid', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(1), pp. 64–69.
- AC, F. *et al.* (2008) 'Will the history and physical examination help establish that irritable bowel syndrome is causing this patients lower gastrointestinal tract symptoms?', *JAMA*, 300(15), pp. 1793–1805.
- Arhan, P. *et al.* (1981) 'Segmental colonic transit time', *Diseases of the Colon & Rectum*, 24(8), pp. 625–629.
- Arslan, G. *et al.* (2002) 'Food allergy and intolerance: response to intestinal provocation monitored by endosonography', *European Journal of Ultrasound*, 15(1–2), pp. 29–36.
- Arslan, G. *et al.* (2004) 'Patients with subjective food hypersensitivity: The value of analyzing intestinal permeability and inflammation markers in gut lavage fluid', *Digestion*, 70(1), pp. 26–35.
- B., S. L. *et al.* (1987) 'Tryptase Levels as an Indicator of Mast-Cell Activation in Systemic Anaphylaxis and Mastocytosis', *New England Journal of Medicine*, 316(26), pp. 1622–1626.
- Barbara, G. *et al.* (2002) 'A role for inflammation in irritable bowel syndrome?', *Gut*, 51(suppl 1), i41–i44.
- Barbara, G. *et al.* (2004) 'Activated Mast Cells in Proximity to Colonic Nerves Correlate with Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 126(3), pp. 693–702.
- Barbara, G. (2014) 'Biomarkers for IBS: ready for prime time?', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited, 12, p. 9.
- Barbara, G. and Stanghellini, V. (2009) 'Biomarkers in IBS: When will they replace symptoms for diagnosis and management?', *Gut*, 58(12), pp. 1571–1575.
- Barnes, P. J., Rodger, I. W. and Thomson, N. C. (1998) *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. Academic Press.

- Bengtsson, M., Ohlsson, B. and Ulander, K. (2007) 'Development and psychometric testing of the Visual Analogue Scale for Irritable Bowel Syndrome (VAS-IBS).', *BMC gastroenterology*, 7, p. 16.
- Bennet, S. M. P. *et al.* (2017) 'Multivariate modelling of faecal bacterial profiles of patients with IBS predicts responsiveness to a diet low in FODMAPs', *Gut* 67(5), pp. 872–881.
- Bentley, S., Pearson, D. and Rix, K. (1983) 'Food hypersensitivity in irritable bowel syndrome', *The Lancet*, (August), pp. 9–11.
- Bergstrand, H. *et al.* (1985) 'Eosinophil derived cationic protein and human leukocyte histamine release', *Inflammation: basic mechanisms tissue injuring principles and clinical models. Stockholm: Almqvist & Wiksell International*, pp. 361–365.
- Berstad, A., Arslan, G., & Folvik, G. (2000) 'Relationship between intestinal permeability and calprotectin concentration in gut lavage fluid', *Scandinavian journal of gastroenterology*, 35(1), pp. 64-69.
- Bindslev-Jensen, C. *et al.* (2004) 'Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods - Position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 59(7), pp. 690–697.
- Bischoff, S. C., Mayer, J. H. and Manns, M. P. (2000) 'Allergy and the gut', *International Archives of Allergy and Immunology*, 121(4), pp. 270–283.
- Böhn, L. *et al.* (2013) 'Self-Reported Food-Related Gastrointestinal Symptoms in IBS Are Common and Associated With More Severe Symptoms and Reduced Quality of Life', *The American Journal of Gastroenterology*, 108(5), pp. 634–641.
- Böhn, L. *et al.* (2015) 'Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome as Well as Traditional Dietary Advice: A Randomized Controlled Trial', *Gastroenterology*, 149(6), pp. 1399-1407.e2.
- Brun-Strang, C. *et al.* (2007) 'Irritable bowel syndrome in France: quality of life, medical management, and costs: the Encoli study.', *European journal of gastroenterology & hepatology*, 19(12), pp. 1097–103.
- Burden, S. (2001) 'Dietary treatment of irritable bowel syndrome: current evidence and guidelines for future practice', *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. Blackwell Science Ltd., 14(3), pp. 231–

241.

Camilleri, M. (2015) 'Review article: Biomarkers and personalised therapy in functional lower gastrointestinal disorders', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 42(7), pp. 818–828.

Canavan, C., West, J. and Card, T. (2014) 'The epidemiology of irritable bowel syndrome', *Clinical Epidemiology*, 6(1), pp. 71–80.

Canto, M. I. *et al.* (2014) 'In vivo endomicroscopy improves detection of Barrett's esophagus;related neoplasia: a multicenter international randomized controlled trial (with video)', *Gastrointestinal Endoscopy*, 79(2), pp. 211–221.

Carroccio, A. *et al.* (2010) 'A Cytologic Assay for Diagnosis of Food Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 8(3), pp. 254–260.

Carroccio, A. *et al.* (2011) 'Fecal Assays Detect Hypersensitivity to Cow's Milk Protein and Gluten in Adults With Irritable Bowel Syndrome', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(11), pp. 965-971.e3.

Chadwick, V. S. *et al.* (2002) 'Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 122(7), pp. 1778–1783.

Con, D. and De Cruz, P. (2016) 'Mobile Phone Apps for Inflammatory Bowel Disease Self-Management: A Systematic Assessment of Content and Tools', *JMIR mHealth and uHealth*, 4(1), p. e13.

Corsetti, M., Van Oudenhove, L. and Tack, J. (2014) 'The quest for biomarkers in IBS—where should it lead us?', *Neurogastroenterology & Motility* 26(12), pp. 1669–1676.

Costa, F. *et al.* (2003) 'Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation', *Digestive and Liver Disease*, 35(9), pp. 642–647.

De Palma, G. D. (2009) 'Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of the gastrointestinal tract', *World journal of gastroenterology* 15(46), p. 5770.

Drossman, D. A. *et al.* (1988) 'Psychosocial Factors in the Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 95(3), pp. 701–708.

- Drossman, D. A. (1999) 'Do psychosocial factors define symptom severity and patient status in irritable bowel syndrome?', *American Journal of Medicine*, 107(5 SUPPL. 1), pp. 41–50.
- Drossman, D. A. et al. (2010) 'international survey of patients with ibs: symptom features and their severity, health status, treatments, and risk taking to achieve clinical benefit', *Journal of clinical gastroenterology* 43(6), pp. 541–550.
- Dunlop, S. P. et al. (2005) 'Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(4), pp. 349–357.
- Dunlop, S. P. et al. (2006) 'Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes', *The American journal of gastroenterology*, 101(6), p. 1288—1294.
- El-Salhy, M. et al. (2015) 'Densities of rectal peptide YY and somatostatin cells as biomarkers for the diagnosis of irritable bowel syndrome', *Peptides.*, 67, pp. 12–19.
- Engsbro, A. L. et al. (2013) 'Patients Suspected of Irritable Bowel Syndrom, Cross-Sectional Study Exploring the Sensitivity of Rome III Criteria in Primary Care', *The American journal of gastroenterology*, 108(6), pp. 972–980.
- Eutamene, H. et al. (2003) 'Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats.', *The Journal of physiology*, 553(Pt 3), pp. 959–66.
- Evans, J. M. et al. (1998) 'Relation of colonic transit to functional bowel disease in older people: A population-based study', *Journal of the American Geriatrics Society*, 46(1), pp. 83–87.
- Farah, D. A. et al. (1985) 'Specific food intolerance: its place as a cause of gastrointestinal symptoms.', *Gut*, 26, pp. 164–168.
- Foley, S. et al. (2011) 'Impaired uptake of serotonin by platelets from patients with irritable bowel syndrome correlates with duodenal immune activation', *Gastroenterology*, 140(5), pp. 1434-1443.e1.
- Ford, A. C. et al. (2013) 'Validation of the Rome III criteria for the diagnosis of irritable bowel syndrome in secondary care', *Gastroenterology*, 145(6), pp. 1262-1270.e1.
- Francis, C. Y., Morris, J. and Whorwell, P. J. (1997) 'The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress.', *Alimentary pharmacology &*

therapeutics, 11(2), pp. 395–402.

Fritscher-Ravens, A. *et al.* (2014) 'Confocal endomicroscopy shows food-associated changes in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 147(5), pp. 1012–1020.e3.

Fritscher-Ravens, A. *et al.* (2019) 'Many Patients With Irritable Bowel Syndrome Have Atypical Food Allergies Not Associated With Immunoglobulin E', *Gastroenterology*, pp. 109–118.

Furuta, G. T. *et al.* (2005) 'Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(5), pp. G890–G897.

Gibson, P. R. *et al.* (2015) 'Food components and irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 148(6), pp. 1158–1174.

Gonlachanvit, S. (2010) 'Are rice and spicy diet good for functional gastrointestinal disorders?', *Journal of neurogastroenterology and motility*, 16(2), pp. 131–138.

Gorard, D. A., Libby, G. W. and Farthing, M. J. G. (1994) 'Influence of antidepressants on whole gut and oro-caecal transit times in health and irritable bowel syndrome', *Aliment Pharmacol Ther*, pp. 159–166.

Guilarte, M. *et al.* (2007) 'Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum.', *Gut*, 56(2), pp. 203–209.

Guilera, M., Balboa, A. and Mearin, F. (2005) 'Bowel Habit Subtypes and Temporal Patterns in Irritable Bowel Syndrome: Systematic Review', *The American Journal of Gastroenterology*, 100(5), pp. 1174–1184.

Gralnek, I. M. *et al.* (2000) 'The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life', *Gastroenterology*, Volume 119, Issue 3, pp. 654 - 660.

Haddad, Z. H. (1982) 'Clinical and immunological aspects of food hypersensitivity. Bela Schick memorial lecture', *Annals of allergy*, 49(1), pp. 29–34.

Hahn, B. A. *et al.* (1997) 'Patient-perceived severity of irritable bowel syndrome in relation to symptoms, health resource utilization and quality of life.', *Alimentary pharmacology & therapeutics*,

11(3), pp. 553–9.

Halmos, E. P. *et al.* (2014) 'A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome', *Ygast.*, 146(1), pp. 67-75.e5.

Hasler, W. L. *et al.* (2009) 'Heightened colon motor activity measured by a wireless capsule in patients with constipation: relation to colon transit and IBS', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(6), pp. G1107–G1114.

Heitkemper, M., Jarrett, M., Bond, E. F., & Chang, L. (2003) 'Impact of sex and gender on irritable bowel syndrome', *Biological Research for Nursing*, 5(1), pp. 56-65.

Heizer, W. D., Southern, S. and McGovern, S. (2009) 'The Role of Diet in Symptoms of Irritable Bowel Syndrome in Adults: A Narrative Review', *Journal of the American Dietetic Association*. American Dietetic Association, 109(7), pp. 1204–1214.

Hinton, J. M. and Young, A. C. (1969) 'A new method for studying gut transit times using radioopaque markers', *Gut*, (10)1, pp. 842–847.

Ireton-Jones, C. (2017) 'The low FODMAP diet: Fundamental therapy in the management of irritable bowel syndrome', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(5), pp. 414–419.

Johansson, S. G. O. *et al.* (2004) 'Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), pp. 832–836.

Jones, V. A. *et al.* (1982) 'Food intolerance: a major factor in the pathogenesis of irritable bowel syndrome', *Lancet (London, England)*, 2(8308), pp. 1115–1117.

Kajander, K. *et al.* (2005) 'A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: A controlled 6-month intervention', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(5), pp. 387–394.

Kalach, N. *et al.* (2013) 'Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers', *Clinical chemistry and laboratory medicine*. Walter de Gruyter, 51(2), pp. 351–361.

- Kiesslich, R. and Neurath, M. F. (2007) 'Endomicroscopy is born-do we still need the pathologist?', *Gastrointestinal Endoscopy*, 66(1), pp. 150–153.
- Kim, J. H., Lin, E. and Pimentel, M. (2016) 'Biomarkers of Irritable Bowel Syndrome.', *Journal of neurogastroenterology and motility*, 23(1).
- Kong, S. C. *et al.* (2005) 'The Incidence of self-prescribed oral complementary and alternative medicine use by patients with gastrointestinal diseases.', *Journal of clinical gastroenterology*, 39(2), pp. 138–41.
- Kristjánsson, G. *et al.* (2004) 'Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome.', *Gut*, 53(12), pp. 1806–12.
- Kristjánsson, S. *et al.* (1994) 'Eosinophil cationic protein, myeloperoxidase and tryptase in children with asthma and atopic dermatitis', *Pediatric Allergy and Immunology*, 5(4), pp. 223–229.
- Lampinen, M. *et al.* (2005) 'Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis.', *Gut*, 54(12), pp. 1714–1720.
- Layer, P. *et al.* (2011) 'Irritable bowel syndrome: German consensus guidelines on definition, pathophysiology and management', *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 49(2), p. 237.
- Layer, P *et al.* (2009) 'Irritable Bowel Syndrome: German Consensus Guidelines on Definition, Pathophysiology and Management. German Society of Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) and German Society of Neurogastroenterology and Motility (DGNM)', *Z Gastroenterol*, 49(9), pp. 237–293.
- Levi-Schaffer, F. *et al.* (1996) 'Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils.', *Immunology*, 87(1), pp. 155–61.
- Levitt, M. D. *et al.* (1987) 'H₂ excretion after ingestion of complex carbohydrates', *Gastroenterology*, 92(2), pp. 383–389.
- Levy, A. M. *et al.* (1997) 'Increased Eosinophil Granule Proteins in Gut Lavage Fluid From Patients With Inflammatory Bowel Disease', *Mayo Clinic Proceedings*, 72(2), pp. 117–123.
- Lewis, S. J. and Heaton, K. W. (1997) 'Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit

Time', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Taylor & Francis, 32(9), pp. 920–924.

Longstreth, G. F. *et al.* (2006) 'Functional Bowel Disorders', *Gastroenterology*, 130(5), pp. 1480–1491.

Lovell, R. M. and Ford, A. C. (2012) 'Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(7), pp. 712-721.e4.

Luck, W. *et al.* (1997) 'In vitro release of eosinophil cationic protein from peripheral eosinophils reflects disease activity in childhood Crohn disease and ulcerative colitis', *European Journal of Pediatrics*, 156(12), pp. 921–924.

Manning, A. P., *et al.* (1978) 'Towards positive diagnosis of the irritable bowel.', *Br Med J* 2.6138, pp. 653-654.

Martínez, Cristina, *et al.* (2012) 'The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations.', *American Journal of Gastroenterology* 107.5, pp. 736-746.

Martínez, C. *et al.* (2013) 'Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier', *Gut*, 62(8), pp. 1160 LP – 1168.

May, C. D. and Bock, S. a (1978) 'A modern clinical approach to food hypersensitivity.', *Allergy*, 33(4), pp. 166–88.

Mearin, X. Badía, A. Balboa, E. Bar, F. (2001) 'Irritable Bowel Syndrome Prevalence Varies Enormously Depending on the Employed Diagnostic Criteria: Comparison of Rome II Versus Previous Criteria in a General Population', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 36(11), pp. 1155–1161.

Mertz, H. R. (2003) 'Irritable bowel syndrome.', *The New England journal of medicine*, 349(22), pp. 2136–2146.

Metcalf, A. M. *et al.* (1987) 'Simplified assessment of segmental colonic transit', *Gastroenterology*, 92(1), pp. 40–47.

- Monsbakken, K. W., Vandvik, P. O., & Farup, P. G. (2006) 'Perceived food intolerance in subjects with irritable bowel syndrome—etiology, prevalence and consequences', *European journal of clinical nutrition*, 60(5), pp. 667-672
- Mujagic, Z. *et al.* (2016) 'A novel biomarker panel for irritable bowel syndrome and the application in the general population', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(June), pp. 1–10.
- Müller-Lissner, S. A., & Pirk, O. (2002) 'Irritable bowel syndrome in Germany. A cost of illness study', *European journal of gastroenterology & hepatology*" 14(12), pp. 1325-1329.
- Mulak, A., & Taché, Y, (2010) 'Sex difference in irritable bowel syndrome: do gonadal hormones play a role?', *Gastroenterologia Polska: organ Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii*, 17(2), p. 89.
- Nanda, R. *et al.* (1989) 'Food intolerance and the irritable bowel syndrome', *Gut*, 30(8), pp. 1099–1104.
- Neumann, H. *et al.* (2012) 'Assessment of Crohn's Disease Activity by Confocal Laser Endomicroscopy', *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(12), pp. 2261–2269.
- Niggemann, B., Beyer, K. and Wahn, U. (1994) 'The role of eosinophils and eosinophil cationic protein in monitoring oral challenge tests in children with food-sensitive atopic dermatitis', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 94(6), pp. 963–971.
- O'Sullivan *et al.* (2000) 'Increased mast cells in the irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*. Blackwell Science Ltd, 12(5), pp. 449–457.
- O'Shea, K. M. *et al.* (2018) 'Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis HHS Public Access', *Gastroenterology*, 154(2), pp. 333–345.
- Ortolani, C. *et al.* (1999) 'Controversial aspects of adverse reactions to food', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 54(1), pp. 27–45.
- De Palma, G. D. (2009) 'Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of the gastrointestinal tract', *World Journal of Gastroenterology*, 15(46), pp. 5770–5775.
- Palsson, O. S. *et al.* (2016) 'Development and validation of the Rome IV diagnostic questionnaire for adults', *Gastroenterology*, 150(6), pp. 1481–1491.

Park, K. S. *et al.* (2008) 'A survey about irritable bowel syndrome in South Korea: Prevalence and observable organic abnormalities in IBS patients', *Digestive Diseases and Sciences*, 53(3), pp. 704–711.

Park, M. I. and Camilleri, M. (2006) 'Is there a role of food allergy in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia? A systematic review', *Neurogastroenterology and Motility*, 18(8), pp. 595–607.

Patella, V. *et al.* (1996) 'Eosinophil granule proteins activate human heart mast cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(3), pp. 1219–25.

Le Pen, C. *et al.* (2004) 'The burden cost of French patients suffering from irritable bowel syndrome.', *Scandinavian journal of gastroenterology*, 39(4), pp. 336–43.

Petitpierre, M., Gumowski, P. and Girard, J. P. (1985) 'Irritable bowel syndrome and hypersensitivity to food', *Annals of allergy*, 54(6), pp. 538–540.

Piche, T. *et al.* (2009) 'Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators.', *Gut*, 58(2), pp. 196–201.

Quénéhervé, L. *et al.* (2019) 'Quantitative assessment of mucosal architecture using computer-based analysis of confocal laser endomicroscopy in inflammatory bowel diseases', *Gastrointestinal Endoscopy*, 89(3), pp. 626–636.

Ragnarsson, G. and Bodemar, G. (1998) 'Pain is temporally related to eating but not to defaecation in the irritable bowel syndrome (ibs). Patients' description of diarrhoea, constipation and symptom variation during a prospective 6-week study', *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 10(5), pp. 415–422.

Rothenberg, M. E. (1998) 'Eosinophilia', *New England Journal of Medicine*.

Rothenberg, M. E. (2004) 'Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID)', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(1), pp. 11–29.

Ruchay, Z. *et al.* (2015) 'The Impact of an Exclusion Diet on Lymphocytic Duodenitis in Patients With IBS and Food Intolerance Diagnosed on Confocal Laser Endomicroscopy', 83(5), p. 1.

Russo, M. W., Gaynes, B. N. and Drossman, D. A. (1999) 'A national survey of practice patterns of gastroenterologists with comparison to the past two decades.', *Journal of clinical gastroenterology*,

29(4), pp. 339–43.

Sadik, R. *et al.* (2008) 'Gastrointestinal transit abnormalities are frequently detected in patients with unexplained GI symptoms at a tertiary centre', *Neurogastroenterology and Motility*, 20(3), pp. 197–205.

Santos, J. *et al.* (2001) 'Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat.', *Gut*, 48(5), pp. 630–6.

Santos, J. *et al.* (2005) 'Pathogenesis of irritable bowel syndrome: the mast cell connection', *Scandinavian journal of gastroenterology*, 40(2), pp. 129–140.

Schuppan, D. and Zimmer, K.-P. (2013) 'Diagnostik und Therapie der Zöliakie', *Dtsch Arztebl International*, 110(49), pp. 835–846.

Schwab, D. *et al.* (2003) 'Functional and morphologic characterization of eosinophils in the lower intestinal mucosa of patients with food allergy' *The American journal of gastroenterology*, 98(7), pp. 1525-1534.

Schwartz, L. B. *et al.* (1987) 'Tryptase Levels as an Indicator of Mast-Cell Activation in Systemic Anaphylaxis and Mastocytosis', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 316(26), pp. 1622–1626.

Serafin, W. E. and Austen, K. F. (1987) 'Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions', *New England Journal of Medicine*, 317(1), pp. 30–34.

Serra, J., Azpiroz, F. and Malagelada, J. R. (2001) 'Impaired transit and tolerance of intestinal gas in the irritable bowel syndrome', *Gut*, 48(1), pp. 14–19.

Silberer, H. *et al.* (2005) 'Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome', *Clinical laboratory*. University of Heidelberg, Germany., 51(3–4), pp. 117–126.

De Silva, A. P. *et al.* (2012) 'Subclinical mucosal inflammation in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS) in a tropical setting', *Scandinavian journal of gastroenterology*. Taylor & Francis, 47(6), pp. 619–624.

Simrén, M. *et al.* (2001) 'Functional gastrointestinal disorders food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome', *Digestion*, 63, pp. 108–115.

Sinagra, E. *et al.* (2016) 'Inflammation in irritable bowel syndrome: Myth or new treatment target?', *World Journal of Gastroenterology*, 22(7), pp. 2242–2255.

Soares, R. L. S. (2014) 'Irritable bowel syndrome: A clinical review', *World Journal of Gastroenterology*, 20(34), pp. 12144–12160.

Sood, R. and Ford, A. C. (2015) 'Combining Biomarkers in Irritable Bowel Syndrome: A Forward Step Toward Making a Positive Diagnosis and Directing Therapy?', *Gastroenterology*, 148(7), pp. 1471–1473.

Sood, R., Law, G. R. and Ford, A. C. (2014) 'Diagnosis of IBS: symptoms, symptom-based criteria, biomarkers or “psychomarkers”?', *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(11), p. 683—691.

Spiller, R., *et al.* (2007) 'Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management.', *Gut* 56.12, pp. 1770-1798.

Spiller, R. C. *et al.* (2010) 'The patient health questionnaire 12 somatic symptom scale as a predictor of symptom severity and consulting behaviour in patients with irritable bowel syndrome and symptomatic diverticular disease', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32(6), pp. 811–820.

Spiller, R. C. (2011) 'Potential biomarkers', *Gastroenterology Clinics of North America*, 40(1), pp. 121–139.

Stamboldjiev, T. (2011) 'Master of Arts in Nursing Theses Management of Irritable Bowel Syndrome in Primary Care'.

Stilwell, J. A. and Hamlyn, A. N. (1983) 'Organic and Functional Disorders in Gastroenterology Outpatients', *The Lancet*, 321(8330), pp. 938–939.

Thompson, W. G. *et al.* (1999) 'Functional bowel disorders and functional abdominal pain.', *Gut*, 45 Suppl 2(Suppl II), pp. II43-7.

Thomson, W. G. *et al.* (1989) 'Irritable bowel syndrome; A guideline for diagnosis', *Gastroenterol int*, 2, pp. 92–95.

Tobin, M. C. *et al.* (2008) 'Atopic irritable bowel syndrome: a novel subgroup of irritable bowel

syndrome with allergic manifestations', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 100(1), pp. 49–53.

Travers, J. and Rothenberg, M. E. (2015) 'Eosinophils in mucosal immune responses', *Mucosal Immunology*, (2), pp. 163–178.

Turcotte, J.-F. *et al.* (2013) 'Breaks in the wall: increased gaps in the intestinal epithelium of irritable bowel syndrome patients identified by confocal laser endomicroscopy (with videos)', *Gastrointestinal endoscopy*, 77(4), pp. 624–630.

Vazquez–Roque, M. I. *et al.* (2013) 'A controlled trial of gluten-free diet in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: effects on bowel frequency and intestinal function.', *Gastroenterology*, 144(5), pp. 903-911.

Vazquez-Roque, M. I. *et al.* (2012) 'Association of HLA-DQ gene with bowel transit, barrier function, and inflammation in irritable bowel syndrome with diarrhea', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(11), pp. G1262–G1269.

Vitte, J. (2015) 'Human mast cell tryptase in biology and medicine', *Molecular Immunology*, 63(1), pp. 18–24.

van der Voort, I. R. *et al.* (2005) 'Funktionsdiagnostik des Magens mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) deckt bei funktioneller Dyspepsie (FD) und Reizdarmpatienten mit dyspeptischen Beschwerden (IBS+ D) Störungen der postprandialen gastralen Relaxation und der Magenentleerung auf', *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 43(05), p. P403.

Walker, M. M. *et al.* (2009) 'Duodenal mastocytosis, eosinophilia and intraepithelial lymphocytosis as possible disease markers in the irritable bowel syndrome and functional dyspepsia', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 29(7), pp. 765–773.

Wang, F. *et al.* (2005) 'Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression', *The American Journal of Pathology*, 166(2), pp. 409–419.

Weber, C. R. *et al.* (2010) 'Mucosal Interleukin-13 Expression to Alter Tight Junction Ion Selectivity*', 285(16), pp. 12037–12046.

Weston, A. P. *et al.* (1993) 'Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome', *Digestive*

diseases and sciences, 38(9), pp. 1590–5.

Whitehead, W. E. *et al.* (1992) 'Effects of stressful life events on bowel symptoms: subjects with irritable bowel syndrome compared with subjects without bowel dysfunction', *Gut*, 33(c), pp. 825–830.

Zigmond, A. S. and Snaith, R. P. (1983) 'The Hospital Anxiety and Depression Scale', *Acta Psychiatrica Scandinavica*. Blackwell Publishing Ltd, 67(6), pp. 361–370.

6. Anhang

6.1. IBS Kriterien

Die Manning-Kriterien (Manning et al. 1978)

- 1) Beginn der Schmerzen im Zusammenhang mit häufigeren Stuhlentleerungen
- 2) Weichere Stühle assoziiert mit dem Beginn von Schmerzen
- 3) Schmerzlinderung nach Stuhlentleerung
- 4) Deutliche abdominelle Blähungen
- 5) Gefühl der unvollständigen Darmentleerung in mehr als 25% der Zeit
- 6) Diarrhoë mit Schleimbeimengungen in mehr als 25% der Zeit

In den verschiedenen epidemiologischen Studien wurden unterschiedlich viele der Kriterien als Diagnosekriterien für IBS benutzt. In der Veröffentlichung stellten sich Kriterium 1) – 4) in Kombination in der IBS Diagnostik als statistisch relevant unterschiedlich ($p < 0,01$) gegenüber einer Vergleichsgruppe mit organisch erwiesener Ursache der abdominellen Beschwerden (wie zum Beispiel eine CED, Duodenalulzera und Gallensteine) dar.

Die Kruis-Kriterien (Kruis et al. 1984)

Hier müssen zwei Fragebögen, einmal vom Patienten und einmal vom behandelnden Arzt ausgefüllt werden. Die beiden Punktwerte, die sich aus dem Scores ergeben werden addiert. Ein addierter Gesamtscore von ≥ 44 Punkten spricht mit einem prädiktiven Wert von 94% für ein IBS des Patienten.

Fragen, die vom Patienten ausgefüllt werden	Score
1. Sind Sie hier wegen Ihrer Bauchschmerzen? Leiden Sie unter Blähungen? Leiden Sie an unregelmäßigem Stuhlgang?	+34
2. Leiden Sie unter diesen Beschwerden seit mehr als zwei Jahren?	+16
3. Wie können Ihre Bauchschmerzen beschrieben werden: brennend, stechend, sehr stark, fürchterlich, Druckgefühl, dumpf, bohrend, nicht so schlimm?	+23
4. Ist Ihnen wechselhaftes Stuhlverhalten zwischen Verstopfung und Durchfall aufgefallen?	+14

Fragebogen, der vom Arzt ausgefüllt wird.	Score
1. Auffällige Befunde in der körperlichen Untersuchung und/oder Anamnese, die auf eine andere Erkrankung als IBS hinweisen.	-47
2. BSG > 20 / 2 Stunden	-13
3. Leukozytose > 10 000 /cm ³	-50
4. Hämoglobin < 12 % bei Frauen < 14 % bei Männern	-98
5. anamnestisch: Blut im Stuhl	-98

Die ROME-I-Kriterien (Thomson et al., 1989)

Drei Monate lang andauernde oder rezidivierende Symptome von abdominellem Schmerz oder Irritation, welche

- sich mit einer Stuhlentleerung bessern können,
 - an eine Änderung der Stuhlfrequenz gekoppelt sein können oder
 - mit einer Änderung der Stuhlkonsistenz zusammenhängen können
- Zwei oder mehr der folgenden Kriterien bestehen mindestens 25% (ein Viertel) der Zeit:
- eine Änderung der Stuhlfrequenz (mehr als 3 Stuhlentleerungen pro Tag oder weniger als 3 Stuhlentleerungen pro Woche),
 - deutlicher Unterschied in der Stuhlkonsistenz (hart, weich, wässrig oder kaum geformt),
 - Schleimbeimengungen im Stuhl,
 - Blähungen oder das Gefühl der abdominalen Distension
 - veränderte Stuhlpassage (z.B. Gefühl der inkompletten Entleerung, Pressen, Stuhldrang).

Die ROME-II-Kriterien (Thompson et al. 1999)

Während der vergangenen 12 Monate, über die Dauer von mindestens 12 Wochen (nicht unbedingt aufeinander folgend) abdominelle Schmerzen oder abdominelles Unwohlsein, wobei mindestens 2 der 3 folgenden Charakteristika erfüllt sind:

1. Erleichterung der Beschwerden nach der Defäkation,
2. Beginn der Beschwerden in Assoziation mit einer Änderung der Stuhlfrequenz und/oder
3. Beginn der Beschwerden in Assoziation mit einer Änderung der Stuhlkonsistenz.
4. Symptome, die darüber hinaus die Diagnose Reizdarmsyndrom stützen:
 1. abnorme Veränderung der Stuhlfrequenz (< 3 mal Stuhlgang pro Woche oder > 3 mal Stuhlgang pro Tag),
 2. abnorme Veränderung der Stuhlkonsistenz (hart, breiig, wässrig),
 3. abnorme Stuhlpassage (gesteigerter Stuhldrang, Gefühl der inkompletten Entleerung),
 4. perianaler Schleimabgang,
 5. Blähungen oder Gefühl der abdominellen Distension.

Die ROME-III-Kriterien (Longstreth et al. 2006)

Die Symptome müssen für mindestens 3 Tage pro Monat während der vergangenen 3 Monate vorhanden sein. Dazu gehören rezidivierende abdominelle Schmerzen oder abdominelles Unwohlsein in Verbindung mit mindestens 2 der folgenden Faktoren:

- Besserung der Beschwerden nach der Defäkation,
- Beginn der Beschwerden in Assoziation mit einer Änderung der Stuhlfrequenz

Symptome, die darüber hinaus die Diagnose Reizdarmsyndrom stützen:

1. abnorme Veränderung der Stuhlfrequenz (< 3 mal Stuhlgang pro Woche oder > 3 mal Stuhlgang pro Tag),
2. abnorme Veränderung der Stuhlkonsistenz (hart/klumpig oder breiig/wässrig),
3. mühsame Stuhlentleerung mit starkem Pressen,
4. gesteigerter Stuhldrang,
5. Gefühl der inkompletten Stuhlentleerung,
6. per analer Schleimabgang.
7. Blähungen oder das Gefühl einer abdominellen Distension.

Die ROME-IV-Kriterien (Palsson et al., 2016)

Wiederkehrende abdominale Schmerzen für mindestens einen Tag in der Woche in den letzten drei Monaten, mit zwei oder mehr der folgenden Kriterien assoziiert:

- 1) assoziiert mit Defäkation
- 2) assoziiert mit einer Veränderung der Stuhlfrequenz
- 3) assoziiert mit einer Formveränderung/Veränderung der Beschaffenheit des Stuhls

Die Kriterien müssen mindestens die letzten drei Monate vorliegen mit einem Symptombeginn vor mindestens 6 Monaten vor der Diagnosestellung eines Reizdarmsyndroms nach ROME IV.

S3-Leitlinie Reizdarmsyndrom (Layer et al., 2011)

In der deutschen S3-Leitlinie (AWMF-Registriernummer: 021/016) werden für die Diagnose eines Reizdarmsyndroms drei Kriterien gefordert.

- 1) Zum einen müssen chronische, d.h. länger als 2 Monate anhaltende Beschwerden wie Bauchschmerzen oder Blähungen vorliegen, die der Patient sowie der Arzt dem Gastrointestinaltrakt zuordnet und die mit Veränderung der Stuhlgewohnheiten einhergehen.
- 2) Die Beschwerden müssen begründen, dass der Patient deswegen Hilfe sucht und sich sorgt und so stark sein, dass die Lebensqualität hierdurch relevant beeinträchtigt wird.
- 3) Das letzte Kriterium ist, dass keine für andere Krankheitsbilder charakteristischen Veränderungen vorliegen, welche wahrscheinlich für diese Symptome verantwortlich sind.

6.2. Patienteninformationsblatt Studie



Campus Kiel

Prof. Dr. A. Fritscher-Ravens
Leiterin experimentelle
Endoskopie
Klinik für Innere Medizin I UKSH,
Campus Kiel
Arnold Heller Str.3
24105 Kiel

Tel: 04315972133

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

vielen Dank für das Interesse zur Teilnahme an unserer Endoskopie-Studie.

Aufgrund der sehr hohen Anzahl an Anfragen möchten wir Sie bitten, uns folgende Befunde nach Rücksprache mit Ihrem Hausarzt oder Gastroenterologen vorzulegen:

- Befund Gastroskopie mit Biopsien aus Duodenum und Magen (**mit Zählung der intraepithelialen Lymphozyten**)
- Befund Koloskopie mit Biopsien aus Ileum und gesamtem Dickdarm
- Histologieergebnisse der Biopsieentnahmen
- Helicobacter pylori-Status
- Lactose-Atemtest
- Fructose-Atemtest
- Glucose-Atemtest
- Elastase im Stuhl
- AK gegen Gewebstransglutaminase – IgG/IgA im Blut (wird auch „TTG-AK“ oder „tissue-transglutaminase AB“ bezeichnet)
- ärztl. Befund mit evtl. chronischen Erkrankungen und deren aktueller Status

Die Befunde sollten nicht älter als zwölf Monate sein. Nur so können wir einen reibungslosen Ablauf Ihrer potentiellen Teilnahme an der Studie gewährleisten.

Die Unterlagen können Sie uns über den Postweg oder per Mail an: endo.praktikant@uksh.de schicken.

Wenn alle Unterlagen vorliegend und Sie für die Teilnahme an der Studie in Betracht kommen, werden wir mit Ihnen einen Termin vereinbaren. Bitte rechnen Sie mit entsprechender Bearbeitungs- und Wartezeit, da eine sehr hohe Anzahl von Patientin anfragt.

Bitte füllen Sie dazu Ihre Kontaktdaten aus:

Name: _____

Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Telefon/ MOBIL: _____

Email : _____

PLZ/Wohnort _____

Hausarzt: _____

Mit freundlichen Grüßen,

Prof. Dr. A. Fritscher-Ravens

Leiterin Einheit Experimentelle Endoskopie

6.3. Einverständniserklärung Studie



Campus Kiel

Prof. Dr. A. Fritscher-Ravens
Leiterin experimentelle Endoskopie
Klinik für Innere Medizin I UKSH,
Campus Kiel
Arnold Heller Str.3
24105 Kiel

Tel: 04315972133

Vor- und Zuname Patient
Geburtsdatum

Forschungsprojekt:

„Nachweis von Nahrungsmittelunverträglichkeiten bei Patienten mit „Reizdarmsyndrom“ - Bauchschmerzen und/oder Blähungen- durch konfokale Laserendomikroskopie – 2. Teil“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Wie in unseren Vorgesprächen vereinbart haben Sie nun bereits eine Spiegelung der Speiseröhre des Magens und des Zwölffingerdarmes – Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) und einen Mannitoltest routinemäßig in der Krankenversorgung unserer Ambulanz erhalten. Die Daten dieser Untersuchung werden in die Studie eingehen. Nach der nun folgenden Untersuchung werden wir weitere Klinikbesuche und Durchführung von Diäten, wie bereits im Vorgespräch vereinbart, verabreden.

zur Klärung der Frage nach Nahrungsmittelunverträglichkeit bieten wir Ihnen im Rahmen dieses Forschungsprojekts die Untersuchung mit einer neuartigen Methode an.

Unser Ziel ist es, mit einer neuen Laser-Vergrößerungstechnik (Endomikroskopie) die Schleimhaut des Zwölffingerdarmes auf mikroskopisch kleiner Ebene sichtbar zu machen. So hoffen wir nachweisen zu können, dass die Zellen auf der Darmschleimhaut, die sonst nur mit einem Mikroskop außerhalb des Körpers untersucht werden können, auf bestimmte Nahrungsmittel reagieren und im lebenden Organismus (in-vivo) sichtbar gemacht werden können.

Während der Untersuchung werden verschiedene, im Vorfeld ermittelte, Nahrungsmittel auf die Oberfläche des Zwölffingerdarmes aufgebracht und die Reaktion der Darmschleimhaut daraufhin untersucht. Sollten Sie auf eine der getesteten Substanzen reagieren, so können Ihnen die dadurch gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise bei der Auswahl Ihrer Nahrungsmittel helfen, die Bauchschmerzen und/oder Blähungen zu lindern oder sogar zu stoppen.

Sie helfen aber auch uns in der Medizin, weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Nahrungsmittelunverträglichkeiten und der Reaktion der Schleimhaut des Darmes, zu gewinnen.

Für feingewebliche Untersuchungen werden 8 Proben und Spülflüssigkeit aus dem Darm entnommen und auf bestimmte Zellen, die vielleicht verantwortlich für Reaktionen auf Nahrungsmittel sein könnten, untersucht. Die Entnahme der Spülflüssigkeit erfolgt mit einem kleinen Katheter, der durch den Arbeitskanal des Endoskops in den Zwölffingerdarm vorgeschoben wird, die anderen Proben werden mit einer herkömmlichen und bei der Routinegastroskopie verwendeten Biopsiezange entnommen. Die Proben sollen zur Aufklärung der noch nicht bekannten Vorgänge im Darm bei Nahrungsmittelunverträglichkeit beitragen. Diese Zellanalysen werden anonymisiert durchgeführt, d.h. Ihre persönlichen Daten werden nicht weitergegeben oder veröffentlicht.

Durchführung der Studie

Die Untersuchung des oberen Teils des Dünndarms erfolgt rein technisch mittels einer konventionellen Spiegelung der Speiseröhre des Magens und des Zwölffingerdarmes – „ÖGD“ genannt. Allerdings verwenden wir für die ÖGD in der Studie ein spezielles Gerät, ein sogenanntes Endomikroskop. Dieser ganz spezielle flexible Schlauch (Endoskop) hat ein integriertes Mikroskop, welches uns ermöglicht, eine bis zu 1000-fache Vergrößerung der Oberfläche des Darmes zu erreichen und betrachten zu können. Es ist bereits für andere Untersuchungen am oberen Magen-Darm-Trakt zugelassen.

Um die Zellen darstellen zu können benötigen wir einen Farbstoff, den wir in Ihre Vene injizieren. Er heißt Fluorescein und wird in der Routine als Kontrastmittel in der Augenheilkunde seit vielen Jahren eingesetzt, ist aber auch für die Endoskopie bei bestimmten Speiseröhrenerkrankungen zugelassen. Dieser Farbstoff wird vom Körper rückstandslos abgebaut und mit dem Urin wieder ausgeschieden.

Nach Injektion mit Fluorescein in eine Ihrer Körpervenen, kann das in das Endoskop eingebaute Laserlicht mikroskopisch kleine Zellen und Zellveränderungen sichtbar machen. Wir werden dann über das Endoskop 2 verschiedene Nahrungsmittel auf die Oberfläche Ihres Zwölffingerdarmes geben und nach Zellveränderungen Ausschau halten. Wir haben diese 2 Nahrungsmittel danach ausgesucht, wie häufig sie in unseren früheren Studien bei ähnlichen Patienten vorkamen und sind bei allen teilnehmenden Patienten gleich. Erst am Ende der Studie werden wir Ihnen mitteilen, welche Nahrungsmittel wir getestet haben und auf welche Nahrungsmittel Sie reagiert haben, damit Ihre „Gefühle“ zu bestimmten Nahrungsmitteln in dieser Studie ausgeschaltet sind. Man nennt das auch – sie sind „geblindet“ – Sie wissen also nicht, welche Nahrungsmittel wir testen und wir später in Ihren Nahrungsmitteln weglassen.

Die ÖGD ist ein allgemein verbreitetes, sehr sicheres und schonendes Verfahren zur Inspektion des oberen Verdauungstraktes und wird in der Routine sogar von niedergelassenen Kollegen in der Praxis durchgeführt. Für diese Untersuchung werden wir Ihnen ein Medikament injizieren, das Sie in einen schlafähnlichen Zustand versetzt, (Propofol). Dieses Medikament wird jedem Patienten, der zu uns in die Endoskopie zu einer Untersuchung kommt, gespritzt, damit die Untersuchung nicht als schmerzhaft oder als unangenehm empfunden wird. Dieser Kurzschlaf während der Endoskopie wird auch „tiefe Sedierung“ genannt.

Auch Gewebeproben werden routinemäßig entnommen. Für die Untersuchung im Zusammenhang mit der Studie entnehmen wir eine um 4 Proben erhöhte Anzahl (insgesamt werden 8 Proben zur Aufarbeitung versandt, vier davon sind ausschließlich Proben für die Studie). Das Risiko für die vermehrte Entnahme der Proben ist extrem gering und gleicht dem Risiko wie es in der Aufklärung zur Gastroskopie beschrieben ist.

Den gesonderten Aufklärungsbogen für die Gastroskopie haben Sie bereits erhalten. Dennoch sind wir angehalten Ihnen hier noch einmal zu erklären, dass bei dieser Untersuchung wie auch bei der Routine ÖGD ein sehr kleines, aber dennoch potentiell vorhandenes Risiko durch Biopsieentnahme z.B. Darmperforation besteht. Das studienbedingte Risiko ist identisch zur Routine ÖGD, da wir keine abweichenden Untersuchungen durchführen

Die Spiegelung wird nur dann durchgeführt, wenn bei weiblichen Personen im gebärfähigen Alter ein Schwangerschaftstest negativ ausgefallen ist.

Potentielle Risiken:

Kein medizinischer Eingriff ist völlig frei von möglichen Risiken. Art und Schwere der Grunderkrankung, eventuelle Begleiterkrankungen, Lebensalter sowie Lebensgewohnheiten und andere Faktoren bestimmen dabei das Risiko mit. Durch die Injektion von Fluorescein in eine Vene kann in sehr seltenen Fällen (6 von 1000 Patienten) eine allergische Reaktion mit Blutdruckabfall oder Übelkeit (3.5%) ausgelöst werden. In 0.6% können Rhythmusstörungen auftreten. Lokale Komplikationen an der Injektionsstelle beinhalten Austritt der Flüssigkeit und oberflächliche Thrombose. Durch die Verteilung des Fluorescein im Körper kann für einige Stunden einer Gelbfärbung der Haut und der Schleimhaut des Auges sowie des Urins hervorgerufen werden. Diese Verfärbungen bilden sich aber durch die rückstandslose Ausscheidung des Fluorescein über die Niere vollständig zurück.

Die Gabe von Propofol zur Sedierung kann Schmerzen an der Injektionsstelle, Herz-Kreislaufstörungen mit einem Abfall des Blutdrucks, verlangsamten Herzschlag und Abfall des Sauerstoffgehaltes im Blut hervorrufen. Um diese Nebenwirkungen des Medikamentes zu vermeiden, wird Propofol nur in kleinen, aufeinanderfolgenden Dosierungen unter strenger Kontrolle der Herz-Kreislaufwerte über einen Monitor verabreicht. Sollte es in sehr seltenen Fällen trotzdem zu einer Kreislaufreaktion kommen, können durch die dauerhafte Überwachung am Monitor Reaktionen sofort identifiziert und unmittelbar therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden.

Selten kann Propofol Krampfanfälle und Venenentzündung verursachen und sehr selten allergische Reaktionen, Wasser in der Lunge oder Entzündungen der Bauchspeicheldrüse. In solchen, sehr seltenen Fällen kann es auch zum Verlust der sexuellen Kontrolle während der Aufwachphase kommen und zur ungewöhnlich guten Laune.

Um diese Medikamente verabreichen zu können, müssen wir Ihnen vor Beginn der Untersuchung eine Kanüle in eine Körpervene anlegen. Durch diese Anlage und durch die intravenöse Gabe der genannten Medikamente können gelegentlich Blutergüsse und Missempfindungen im Bereich der Einstichstelle oder deren Umgebung auftreten. Diese Veränderungen sind harmlos und verschwinden nach einiger Zeit von selbst oder können sehr gut behandelt werden. Im Bereich der Einstichstelle kann sich in seltenen Fällen eine Entzündung der punktierten Vene entwickeln, die meist medikamentös gut beherrschbar ist. Haut-, Weichteil- und Nervenschäden (Spritzenabszess, Absterben von Gewebe, Nerven- und Venenreizungen, Blutergüsse, Entzündungen) infolge von Einspritzen von Medikamenten in die Vene vor, während oder nach der Endoskopie sind außerordentlich seltene Komplikationen.

Insgesamt kann die Injektion von Medikamenten über eine Vene in seltenen Fällen leichte allergische Reaktionen (Unverträglichkeitsreaktionen) auslösen, die sich als Juckreiz, Hautausschlag, Übelkeit oder Erbrechen äußern. Diese Reaktionen klingen meist von selbst wieder ab, können aber auch sehr gut behandelt werden und wir haben bei jeder unserer Untersuchungen Medikamente parat, die sofort therapeutisch eingesetzt werden können, sollte es zu einer solchen Reaktion kommen. In außerordentlich seltenen Fällen kann es zu Schleimhautschwellungen im Kehlkopfbereich, Atemstörungen, Herz-Kreislaufstörungen und Krämpfen kommen.

Eine sofortige intensivmedizinische Behandlung ist dann notwendig, die in solch extrem seltenen Fällen auch innerhalb kürzester Zeit von uns veranlasst werden kann.

Natürlich kann jede der an Ihnen in einem Krankenhaus durchgeführten Untersuchungen, durch jedes der Schritte, die an Ihnen durchgeführt werden, zum Tode führen. Wir möchten Ihnen hier aber versichern, dass wir sorgsam uns mit größter Vorsicht arbeiten.

Im Rahmen der Routine-ÖGD vor der Studie ist die Entnahme von kleinen Gewebeproben mit einem Durchmesser von etwa 2 mm aus der Schleimhaut des Dünndarmes vorgesehen. Diese Probennahme (Biopsie) ist völlig schmerzfrei, da sich keine Zellen an der Darmschleimhaut befinden, die Schmerzen auslösen können. In seltenen Fällen kann es zu kleinen Schleimhautblutungen kommen, die in aller Regel von selbst aufhören oder sehr gut endoskopisch behandelt werden können.

In extrem seltenen Fällen (wir haben bei mehr als 50.000 Untersuchungen in den letzten 5 Jahren keinen solchen Fall gesehen) kann durch die Biopsien die Darmwand vollständig verletzt werden (Perforation). Der Verschluss dieser Perforation ist in aller Regel endoskopisch unproblematisch möglich, es kann aber auch eine Operation notwendig werden.

Am Ende der Untersuchung bekommen Sie einen Untersuchungsbefund mit nach Hause. Sollten Sie nach Beendigung der Untersuchung oder zu Hause über Beschwerden klagen, können Sie sich jederzeit an die Notaufnahme der Klinik für Innere Medizin I wenden. Die Telefonnummer lautet 0431-597-1243. Die Notaufnahme ist auf dem UKSH Campus im Gebäude der 1. Medizinischen Klinik, Haus 6 zu finden. Über die Notaufnahme erfolgt eine jederzeitige Rücksprache mit diensthabenden Gastroenterologen der Endoskopie oder direkt mit Fr. Prof. Fritscher-Ravens.

Datenerhebung

Ihre im Rahmen der beschriebenen Studie nach Ihrer Einwilligung erhobenen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzgesetzlichen Bestimmungen.

Sie werden elektronisch in einem gesicherten EDV-System verschlüsselt (pseudonymisiert) sowie nach Beendigung der Nachbeobachtungszeit von 12 Monaten nicht mehr entschlüsselbar (anonymisiert) in der Klinik für Innere Medizin I am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, gespeichert. Bei der Pseudonymisierung (Verschlüsselung) werden der Name und andere Identifikationsmerkmale (z.B. Teile des Geburtsdatums) durch eine mehrstellige zufällig gewählte Zahlen-Buchstabenkombination ersetzt, um eine Identifizierung des Studienteilnehmers auszuschließen oder wesentlich zu erschweren. Zugang zu dem „Schlüssel“, der eine persönliche Zuordnung der Daten des Studienteilnehmers ermöglicht, haben nur Ihre behandelnden Ärzte.

Ihre pseudonymisierten Daten werden im Studienzentrum über 12 Monate gesammelt und danach anonymisiert. Das bedeutet, dass die Zuordnungsmöglichkeit (Schlüssel) zwischen der zufällig gewählten Zahlen-Buchstabenkombination und Ihrem Namen vernichtet wird. Die Daten werden dann für die Dauer von 10 Jahren anonymisiert zur wissenschaftlichen Auswertung gespeichert.

Die aus der Studie gewonnenen Erkenntnisse sollen im Rahmen einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht werden. Die Veröffentlichung der Daten erfolgt vollständig anonymisiert, somit ist eine Zuordnung zu Ihrer Person nicht möglich.

Sie haben im 12-monatigen Erhebungszeitraum jederzeit die Möglichkeit, Auskunft über Ihre bei der Studienzentrale gespeicherten Daten zu verlangen. Selbstverständlich können Sie Ihre Zustimmung zur Speicherung der Daten in diesem Zeitraum widerrufen und die Löschung Ihrer Daten aus dem Studien-EDV-System verlangen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an Ihren behandelnden Arzt. Ein Widerruf bereits anonymisierter Daten (nach dem Erhebungszeitraum von 12 Monaten) ist nicht möglich. Ihre Teilnahme an der Studie können Sie zum jedem Zeitpunkt zurückziehen. Ihnen entsteht dadurch weder ein Nachteil, noch verändert der Widerruf den weiteren Behandlungsverlauf.

Für alle Patienten/Probanden wurde eine Versicherung abgeschlossen, die unabhängig vom Verschulden in einem Schadensfall wirksam sind. Die Versicherungsbedingungen werden Ihnen auf Wunsch ausgehändigt. Auf die §§ 6 (Versicherungsleistung) und in 14 Abs.2 (Obliegenheiten des Versicherten) der Versicherungsbedingungen wird besonders hingewiesen.

Während der Dauer der klinischen Prüfung sollte eine andere medizinische Behandlung mit Ausnahme von Notfalluntersuchungen, nur im Einvernehmen mit dem Prüfarzt erfolgen. Der Prüfarzt ist von einer Notfallbehandlung unverzüglich zu unterrichten.

Bei Verdacht auf einen studienbedingten Gesundheitsschaden sind Sie verpflichtet, dies der Versicherung und dem Prüfarzt unverzüglich mitzuteilen. Es besteht andernfalls die Gefahr, dass der Versicherungsschutz verloren geht. Sie müssen den Versicherer entweder selbst benachrichtigen, oder könnten sich zur Vereinfachung an den Prüfarzt wenden, der dann in Ihrem Auftrag die Versicherung informiert. Der Prüfarzt wird Ihnen eine Kopie dieser Anzeige aushändigen.

Die Versicherung mit der Versicherungsscheinnummer **AS-9100160838** wurde bei der Allianz Versicherungs-Aktiengesellschaft abgeschlossen.

Leider können wir Ihnen keine Wege-Unfallversicherung zu den Endoskopien und den klinischen Wiedervorstellungen anbieten.

Einwilligung zur Teilnahme an der Studie

„Nachweis von Nahrungsmittelunverträglichkeiten bei Patienten mit Reizdarmsyndrom durch konfokale Laserendomikroskopie – 2. Teil“

Ich habe die schriftliche Information zur genannten Studie erhalten und verstanden. Zudem hatte ich ausreichend Gelegenheit, etwaige offene Fragen zu klären.

Mir ist bekannt, dass meine Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist und dass ich diese Einwilligung bis zur Anonymisierung der Daten jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann. Hieraus entsteht mir kein Nachteil noch verändert der Widerruf meinen weiteren Behandlungsablauf.

Ich willige ein, dass meine Daten ohne direkten Bezug zu meiner Person (pseudonymisiert bzw. nach vollständiger Erhebung anonymisiert) wie in der Information zur Datenerhebung in der Studienzentrale gespeichert, verarbeitet und gegebenenfalls ohne Bezug zu meiner Person (anonym) veröffentlicht werden.

Darüberhinausgehende Datenerhebungen bedürfen jeweils einer zusätzlichen Einwilligung.

Ort, Datum

Unterschrift des Studienteilnehmers/-nehmerin

Name des Teilnehmers in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift des aufklärenden Arztes

Name aufklärender Arzt in Druckbuchstaben

6.4. Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Frau Prof. Dr. Fritscher- Ravens für die stets mehr als hilfsbereite Betreuung bedanken und dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat auf dem spannenden und hoch aktuellen Gebiet experimentellen Endoskopie und Reizdarmforschung zu promovieren. Sie hat mich nicht nur von Anfang an in meinen Vorhaben und Ideen unterstützt, sondern hat es geschafft mich in kürzester Zeit durch ihren unnachgiebigen Enthusiasmus und ihre wissenschaftliche Neugier für die experimentell klinische Forschung zu begeistern.

Besonderen Dank gilt den Schwestern in der Endoskopie im Universitätsklinikum Kiel für die stetige Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und das die aufmunternden Worte, die mir immer sehr geholfen haben.

Ein spezieller Dank geht an Prof. Dr. Röcken und Prof. Dr. Braasch für die Möglichkeit der Nutzung der wissenschaftlichen Ressourcen, organisatorische Hilfestellungen und die Begleitung meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des immunhistochemischen Labors der Dermatologie, insbesondere an Frau Gabriele Kolfenbach. Sie hat mit ihrer durchwegs hilfsbereiten und interessierten Art eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schreiber für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. Milla für die großartige Unterstützung bei den histopathologischen Zählungen und für seine Hilfsbereitschaft bei den wissenschaftlichen Publikationen.

Weiterhin möchte ich mich mehr als herzlich bei meinen Mitdoktoranden Zino Ruchay, Theresa Pflaum und Melda Das dafür bedanken, dass mir immer mit vielen helfenden Händen zur Seite standen und wir zusammen durch so spannende und manchmal auch durchaus stürmische Zeiten gehen durften. Es hat mir mehr als viel Freude bereitet mit ihnen zu arbeiten.

Zuletzt möchte ich mich besonders sowohl bei meiner Familie und meinen engen Freunden dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Wissenschaftliche Publikationen:

2014:

Fritscher-Ravens, A., Schoch, S., Brasch, J., Röcken, C., Moesinger M., Ellrichmann, M., Bethge, J. & Böttner, M. (2014). Mo1573 Activation of Eosinophils as a Marker of Low-Grade Inflammation Underlying Food-Intolerance in Patients With IBS-Like Symptoms. *Gastrointestinal Endoscopy*, 79(5), AB488.

2015:

Fritscher-Ravens, A., Möisinger, M. J., Ruchay, Z., Ellrichmann, M., Röcken, C., Brasch, J., & Milla, P. J. (2015). Mo1593 Food Hypersensitivity in Patients with Urticaria and IBS Revealed by Confocal LASER Endomicroscopy: Appropriate Antigen Exclusion Diet Improves Both the Urticarial and IBS Symptoms. *Gastrointestinal Endoscopy*, 81(5), AB477-AB478.

Fritscher-Ravens, A., Möisinger, M. J., Ellrichmann, M., Ruchay, Z., Röcken, C., Brasch, J., & Milla, P. J. (2015). Mo1617 Histological and Lavage Markers for Food Allergy Are Not Reliable Predictive of Food Intolerance in Patients with IBS Proven to Be Food Intolerant on Confocal LASER Endomicroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 81(5), AB485.

2016:

Ruchay, Z., Roecken, C., Moesinger, M., Pflaum, T., Milla, P. J., & Fritscher-Ravens, A. (2016). Mo1060 The Impact of an Exclusion Diet on Lymphocytic Duodenitis in Patients with IBS and Food Intolerance Diagnosed on Confocal Laser Endomicroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 83(5), AB447.

Pflaum, T., Milla, P. J., Roecken, C., Moesinger, M., Ruchay, Z., & Fritscher-Ravens, A. (2016). Su1208 Structural and Functional Abnormality of the Duodenal Epithelial Barrier in Patients with IBS and Food Intolerance Detected on Confocal Laser Endomicroscopy. *Gastroenterology*, 150(4), S496.

2017:

Moesinger, M., Ruchay, Z., Pflaum, T., Roecken, C., Schuppan, D., Brasch, J., ... & Fritscher-Ravens, A. (2017). Are there Prognostic Parameters for the Diagnosis of Food Sensitivity? Analysis of different Parameters in IBS Patients Reacting to Food Antigens at Confocal Laser Endomicroscopy (CLE) and Improved > 80% following Blinded Sham Controlled Exclusion Diet and Long-Term Antigen Exclusion Compared to Healthy Controls. *Gastroenterology*, 152(5), S641.

Pflaum, T., Roecken, C., Milla, P. J., Boettner, M., Schuppan, D., Moesinger M., ... & Ellrichmann, M. (2017). 128-Increased Immunohistochemical/PCR Proven Permeability of Duodenal Tight Junctions in Patients with IBS and Wheat Intolerance Initially Shown on Confocal Laser Endomicroscopy (CLE). *Gastroenterology*, 152(5), S36.

Ruchay, Z., Pflaum, T., Moesinger, M., Milla, P. J., Roecken, C., Schuppan, D., ... & Fritscher-Ravens, A. (2017). 156-Double Blind Randomized Controlled Cross-Over Study Using Confocal Endomicroscopy to Differentiate Wheat from Non-Coeliac Gluten Sensitivity (NCGS) in IBS Patients Using Antigen Exclusion vs Sham vs Low Fodmap's Diet to Determine Successful Treatment. *Gastroenterology*, 152(5), S43.

2018:

Ruchay, Z., Das, M., Moesinger, M., Pflaum, T., Milla, P. J., Roecken, C., ... & Fritscher-Ravens, A. (2018). Mo1052-Confocal Endomicroscopy (CLE) Based Double Blind Randomized Controlled Cross-Over Study Provides Objective Measurement of Food Sensitivity in IBS Patients, their Somatization, Anxiety and Depression. *Gastroenterology*, 154(6), S-684.

Moesinger, M., Ruchay, Z., Pflaum, T., Das, M., Milla, P. J., Roecken, C., ... & Fritscher-Ravens, A. (2018). Mo1050-IBS Patients with Reaction to Wheat and Other Food Antigens Proven on Confocal Laser Endomicroscopy (CLE) have Prognostic Parameters for Disease, Irrespective of the Antigen They React to. *Gastroenterology*, 154(6), S-683.

Pflaum, T., Roecken, C., Ruchay, Z., Milla, P. J., Moesinger, M., Das, M., ... & Fritscher-Ravens, A. (2018). 289-Food Intolerance in IBS is due to an Eosinophil Activation Syndrome. *Gastroenterology*, 154(6), S-72.

2019:

Fritscher-Ravens, A., Pflaum T., Mösinger M., Ruchai Z., Röcken C., Milla PJ, Das M, Böttner M, Wedel T, Schuppan D.. (2019) 'Many Patients with Irritable Bowel Syndrome Have Atypical Food Allergies Not Associated with Immunoglobulin E', *Gastroenterology*, pp. 109–118.

Praktische Erfahrungen:

27.12.2017 – heute

Tätigkeit als Assistenzärztin im
Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Abteilung Innere
Medizin, Herr Dr. Baumgarten

Berlin, den 07.07.2019 Marie-Jelena Mösinger