

Aus der Klinik für Allgemein–, Viszeral– und Kinderchirurgie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Trudo Wolfram Knoefel

Evaluierung des Leucin-Rich-Alpha2-  
Glycoproteins als Marker in der Diagnostik der  
pädiatrischen Appendizitis

Dissertation:

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadja Müllmann

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Knoefel

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. vom Dahl

**Meinen Eltern in Dankbarkeit und Liebe gewidmet**

# Zusammenfassung

Die Diagnostik der akuten pädiatrischen Appendizitis ist bis heute eine Herausforderung [1–4]. Der Mangel an eindeutigen klinischen oder laborchemischen Parametern erhöht das Risiko verzögerter Diagnosestellung, Komplikationen sowie hoher negativer Appendektomieraten [5–7]. Kentsis *et al* beschrieben 2010 in ihrer Studie über 49 Kinder mit suspekter Appendizitis neue Urinmarker für die akute Appendizitis. Leucin-rich-alpha-Glycoprotein-1 (LRG) fiel hierbei mit sehr hoher diagnostischer Sicherheit auf (AUC von 0,97 bis 0,99) [8, 9]. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der diagnostischen Sicherheit von LRG anhand eines großen Patientenkollektivs. 200 Kinder (Jungen: 91, Mädchen: 109, mittleres Alter: 11 Jahre) wurden von Oktober 2011 bis März 2013 in die Studie aufgenommen. Klinische und laborchemische Parameter für akute Bauchschmerzen wurden dokumentiert und ausgewertet sowie Urinproben gewonnen. Die endgültige Diagnose wurde klinisch gestellt, oder im Falle der akuten Appendizitis mit Hilfe des histopathologischen Befundes verifiziert. Die Quantifizierung von LRG erfolgte mittels Massenspektrometrie, nachdem festgestellt wurde, dass mit Hilfe eines *Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay* (ELISA) auf Grund von Interferenzen keine validen Daten gemessen werden konnten. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der LRG-Mengen im Urin von Kindern mit und ohne Appendizitis (AUC 0,803). Die LRG-Konzentration ermöglichte die Unterscheidung in Kinder mit und ohne Appendizitis. Die von Kentsis *et al* beschriebene, große Trennschärfe von LRG zur Unterscheidung von Kindern mit und solchen ohne akute Appendizitis bestätigte sich jedoch in vorliegender Studie nicht. Die Kombination von LRG mit dem klinischen Parameter „kontralateraler Loslassschmerz“ erhöhte die *Area under the Curve* (AUC) auf 0,921. Eine Diskriminierung des Schweregrades der Appendizitis anhand der LRG-Konzentration war nicht möglich. Für die Nutzung des Markers im klinischen Alltag sind weitere Untersuchungen sowie die Entwicklung einer schnelleren Untersuchungsmethode nötig.

## Abkürzungen:

<b>[c]</b>	Konzentration	<b>m</b>	männlich
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>M</b>	Molarität (mol/l)
<b>CV</b>	<i>Coefficient of Variation</i>	<b>mg</b>	Milligramm
<b>AA</b>	Akute Appendizitis	<b>min</b>	Minuten
<b>APAF-1</b>	Apoptotic peptidase activating factor-1	<b>ml</b>	Milliliter
<b>AUC</b>	Area under the Curve	<b>mm</b>	Millimeter
<b>BMFZ</b>	Biologisch-Medizinisches-Forschungszentrum	<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>BNP</b>	brain-natriuretic-peptide	<b>n</b>	Anzahl der Probanden
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>NAA</b>	Nicht-Appendizitis-Gruppe
<b>CRP</b>	C-Reaktives Protein	<b>ng</b>	Nanogramm
<b>CT</b>	Computertomographie	<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Ammoniumhydrogencarbonat
<b>dl</b>	Deziliter	<b>nm</b>	Nanometer
<b>DruckS</b>	Druckschmerz	<b>ORM</b>	Orosomucoid = Alpha-1-acid-Glycoprotein
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>	<b>p</b>	Signifikanzniveau
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay</i>	<b>Pat</b>	Patient
<b>fmol</b>	Femtomol	<b>ROC-Kurve</b>	<i>Receiver-Operator-Characteristics-Kurve</i>
<b>FWHM</b>	<i>Full Width at Half Maximum</i>	<b>s.</b>	siehe
<b>g</b>	Erdbeschleunigung	<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>G-CSF</b>	Granulozyten – Kolonie-stimulierender Faktor	<b>sec</b>	Sekunden
<b>HWI</b>	Harnwegsinfekt	<b>Sens</b>	Sensitivität
<b>J</b>	Jahre	<b>SIRS</b>	Systemisches-inflammatorisches-Response-Syndrom
<b>kDa</b>	KiloDalton	<b>Spez</b>	Spezifität
<b>KLL</b>	Kontralateraler Loslassschmerz	<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>l</b>	Liter	<b>W</b>	Weiblich
<b>LRG</b>	Leucin-rich-alpha2-Glycoprotein	<b>µg</b>	Mikrogramm
		<b>µl</b>	Mikroliter
		<b>µm</b>	Mikrometer

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1. Die pädiatrische Appendizitis.....	1-3
1.2. Anatomie und Embryologie.....	3-4
1.3. Histologie der Appendizitis.....	5
1.4. Ein historischer Überblick.....	6-10
1.5. Epidemiologie und Ätiologie.....	10-11
1.6. Diagnostik.....	11-18
1.6.1 Anamnese.....	11-12
1.6.2 Klinische Untersuchung.....	12-13
1.6.3 Scores.....	14
1.6.4 Klinische Chemie.....	14-15
1.6.5 Sonographie.....	16
1.6.6 Bildgebende Diagnostik.....	16-18
1.6.7 Explorative Laparoskopie.....	18
1.7. Therapieoptionen.....	18-22
1.7.1 Der konservative Therapieansatz.....	18-19
1.7.2 Die operative Therapie.....	19-22
1.8. Leucin-rich-alpha2-Glycoprotein als neuer diagnostischer Marker .....	22-26
1.8.1 Die Bostoner Vorstudie.....	22-24
1.8.2 Leucin-rich-alpha-2-Glycoprotein.....	24-26
1.9. Ziele der Arbeit.....	26-27

## 2. Material und Methoden

2.1. Ein- und Ausschlusskriterien.....	28
2.2. Vorbereitung.....	28
2.3. Dokumentation.....	29-30
2.4. Probenentnahme und –verarbeitung.....	30-31
2.5. Probenvorbereitung.....	31-32

2.6. Massenspektrometrie.....	32-33
2.7. Statistische Analyse.....	33-34
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Patientenkollektiv.....	35
3.2 Patienten mit Appendizitis.....	35-36
3.3 Differentialdiagnosen.....	36-37
3.4 Klinische Parameter.....	37-39
3.5 Quantifizierung von Leucin-rich-alpha2-glycoprotein.....	39-48
3.6 LRG-Konzentration im Krankheitsverlauf.....	48-50
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	51-52
4.2 Methodendiskussion.....	52-55
4.2.1 Dokumentation.....	52
4.2.2 Probenentnahme und –verarbeitung.....	52-54
4.2.3 LRG-Quantifizierung.....	54-55
4.3 Diskussion der Ergebnisse.....	55-66
4.3.1 Klinische und laborchemische Parameter.....	55-56
4.3.2 Histologisches Grading.....	57-58
4.3.3 Differentialdiagnosen.....	58-62
4.3.4 Leucin-rich-alpha2-Glycoprotein als Marker für akute Appendizitis .....	62-66
<b>5. Schlussfolgerungen</b>	
.....	67-68
<b>6. Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	
.....	69-76
<b>7. Anhang</b>	
.....	77-83

# 1. Einleitung

## 1.1 Die pädiatrische Appendizitis

Im Bewusstsein der Bevölkerung wird die Appendix in erster Linie durch relativ häufige Entzündungen mit teils schweren Krankheitsverläufen wahrgenommen. Die Appendizitis ist eine meist unspezifische Entzündung der Appendix vermiformis [10]. Im Volksmund wird sie fälschlicherweise als Blinddarmentzündung bezeichnet. Der Blinddarm umfasst das gesamte Zökum einschließlich des Wurmfortsatzes. Nur letzterer ist bei einer Appendizitis entzündet. Aus semantischen Gründen werden im Folgenden die Begriffe dennoch synonym verwendet. Sofern nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, beziehen sich die folgenden Informationen auf kindliche Appendizitiden.

Kinder klagen häufig über Bauchschmerzen. Etwa 5% der Konsultationen in der Notaufnahme betreffen Bauchschmerzen, die weniger als drei Tage andauert haben. 1% aller Kinder mit Bauchschmerzen, die eine Notaufnahme konsultieren, zeigen eine operationsbedürftige Appendizitis [11]. Dennoch ist die Appendizitis die häufigste Ursache für Notfalloperationen des Abdomens. Sie ist für ein Drittel aller Hospitalisationen von Kindern mit Bauchschmerzen verantwortlich [12]. Die Diagnostik der Appendizitis bei Kindern stellt besondere Anforderungen an den behandelnden Arzt. Vor allem Kleinkinder haben Angst vor Fremden oder assoziieren den weißen Kittel mit unangenehmen Erlebnissen, zum Beispiel Impfungen. Die Anamneseerhebung und Untersuchung werden durch das Schreien eines Kleinkindes deutlich erschwert [13]. Die Kinder selbst sind oft zu einer detaillierten Anamnese nicht in der Lage. Auch die Befragung der Eltern ermöglicht häufig keine vollständige Anamnese. So können beispielsweise oft keine genauen Angaben zur Schmerzintensität oder –qualität gegeben werden. Bei kleinen Kindern fällt den Eltern oft nur eine unspezifische Veränderung des Kindes auf, ohne dass dafür eine direkte Ursache ausgemacht werden kann. Jugendliche hingegen haben

häufig Hemmungen über den eigenen Körper sowie Körperfunktionen zu sprechen [13]. Auch die körperliche Untersuchung ist bei verängstigten Kindern erschwert. Die Palpation des Abdomens ist bei schreiendem Kind nur in den Atempausen möglich. Auch die oft erforderliche Position des Kindes auf dem Arm der Eltern kann die Untersuchung erschweren [13].

Zudem zeigen Kinder häufig atypische Symptome bei einer akuten Appendizitis. Becker *et al* fanden beispielsweise bei 82% der untersuchten Kinder keinen Temperaturanstieg und bei 32% der Kinder den maximalen Druckschmerz in einem anderen als dem rechten unteren Quadranten [2]. Kinder unter drei Jahren präsentierten sich häufig mit Durchfällen als Hauptsymptom einer akuten Appendizitis [14].

Der Zeitraum bis zur endgültigen Diagnosestellung ist bei ein - bis zweijährigen Kindern daher durchschnittlich doppelt so lange wie bei fünfjährigen Kindern mit vergleichbaren Beschwerden (3,8 gegenüber 1,6 Tagen) [6]. Durch das noch unvollständig ausgebildete Omentum majus kann eine mögliche Perforation nicht wie bei Erwachsenen ummantelt werden, sondern breitet sich schnell im Abdomen aus. Häufige und ausgeprägte Peritonitiden sind die Folge [13]. Bei Vorschulkindern ist zum Diagnosezeitpunkt die Erkrankung in 56% der Fälle schon bis zur Perforation fortgeschritten. Bei Kindern unter zwei Jahren lag die Perforationsrate in Studien sogar bei 100% [7]. Aus diesem Grund wird die Indikation zur Appendektomie bei Kindern großzügig gestellt. Ziel ist die Vermeidung von Komplikationen und Perforationen. Der Preis dieses großzügigen Vorgehens ist eine hohe negative Appendektomierate von 8,9 bis 24,9% [15, 16]. Die höchsten Raten entfallen auf Kinder unter fünf Jahren [16].

Zu den häufigsten Komplikationen einer akuten Appendizitis gehören eine Ausbreitung der Entzündung auf umgebendes Gewebe und ein darauf folgender Anschluss an das Blutssystem mit konsekutiver Sepsis. Es zeigt sich in 31,1% der Fälle eine systemische Entzündungsreaktion (*Systemic*

*Inflammation Response Syndrome* = SIRS) und eine damit verbundene verlängerte Aufenthaltsdauer im Krankenhaus sowie erhöhte Morbidität [17].

## 1.2 Anatomie und Embryologie

Embryologisch entwickelt sich die Appendix vermiformis, auch Wurmfortsatz genannt, bereits ab der achten Schwangerschaftswoche. Sie liegt am distalen Ende des Zökums und ist durch ihr - im Vergleich zum Zökum - langsames Breitenwachstum zu identifizieren. Zunächst medial dem Zökum anliegend, richtet sie sich im Verlauf der embryologischen Entwicklung Richtung ileozökaler Klappe aus. Ab dem siebten Schwangerschaftsmonat bilden sich vereinzelte Lymphfollikel in der Appendixwand aus, die sich bis zur Pubertät weiter vermehren [18]. Das Größenwachstum der Appendix ist bis zum dritten Lebensjahr weitgehend abgeschlossen [19].

Nach posterior grenzt die Appendix oft an den Musculus Psoas. Anterior können sich das Omentum majus, Schlingen des Dünndarms oder die mit Peritoneum ausgekleidete Bauchdecke befinden [18]. Die Länge kann stark variieren, wie der Pathologe Donald Collins 1932 herausstellte. Er beobachtete bei 4.680 vermessenen Wurmfortsätzen eine Längenvarianz von 0,3 bis 24,5cm. Durchschnittlich ergab sich eine Länge von 8,21cm, wobei Männer eine um 0,68cm signifikant längere Appendix aufwiesen als Frauen [20].

Ein Jahr später zeigten Wakeley *et al*, dass auch die Lage der Appendix variabel ist. Bei den 10.000 durch sie untersuchten Patienten zeigte sich in 64,5% eine nach ileozökale oder retrokolisch gelagerte Appendix. Diese Lage stellte damit die häufigste Variante dar. Die zweithäufigste Lage war mit 32,4% der nach pelvin gelegene Wurmfortsatz. Nur ca. 1% der Appendizes kamen vor dem Ileum zu liegen [21].

Die arterielle Versorgung der Appendix erfolgt in der Regel durch die Arteria appendicularis. Diese entspringt in 95% der Fälle entweder direkt oder indirekt aus der Arteria ileocolica oder der Arteria iliaca [22]. Die Arteria appendicularis

bildet, im Gegensatz zu den Arterien des restlichen Dickdarms, keine Arkaden aus, sondern versorgt das Organ in Form einer Endarterie. Sie verläuft im Mesenteriolum der Appendix [18]. Der venöse Abfluss erfolgt über die Vena appendicularis zur Vena ileocolica und weiter in die Vena mesenterica superior zum Pfortadersystem [23].

Der Lymphabfluss zeigt ebenfalls eine Besonderheit im Vergleich zum restlichen Darmtrakt. Während die normalen Lymphbahnen der Appendix gemeinsam mit den übrigen Lymphbahnen des Darmtraktes verlaufen, drainieren die Lymphfollikel in der Wand der Appendix in das Lumen der Appendix und verlaufen nicht über Lymphbahnen und Lymphknoten [18].

Histologisch entspricht der sonstige Wandaufbau der Appendix im Wesentlichen dem des restlichen Dickdarms. Außen, verbunden mit dem Mesenteriolum, befindet sich die Serosa. Nach innen anschließend liegt die Tunica muscularis, welche aus einer zirkulären und einer longitudinalen Schicht besteht. Die longitudinale Muskelschicht ist an der Spitze der Appendix mit den Taenien des Kolons verbunden [18]. Die luminal liegende Mucosa ist durch zahlreiche enterochromaffine Zellen sowie Lymphfollikel charakterisiert. Diese lassen die Zugehörigkeit der Appendix zum mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe erkennen [10].

Lange Zeit wurde die Appendix nur als rudimentäres Organ des Magendarmtraktes verstanden. Diese Ansicht wurde erst im frühen 20. Jahrhundert teilweise revidiert [24]. Als Bestandteil des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes ist sie an immunologischen Prozessen beteiligt [10]. Ebenfalls wird eine Funktion als Reservoir der natürlichen Darmflora diskutiert. Es wird vermutet, dass der Erhalt der Appendix vermiformis protektiv gegen Koloncarcinome wirkt [25, 26]. Auch in der Eigenorganspende hat die Appendix in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. So kann ein gesundes Organ beispielsweise als Ersatz für Harnleiter in Betracht gezogen werden [27].

### 1.3 Histologie der Appendizitis [10]

Die Appendizitis verläuft typischerweise in den unten beschriebenen Stadien. Teilweise gehen diese ineinander über. Es kann zu Reversibilität der Stadien mit Ausheilung der Entzündung kommen.

1. Primäraffekt: Umschriebener Entzündungsherd mit leukozytären Infiltraten, Erosionen und Fibrinexsudaten.
2. Phlegmonöse Appendizitis: Die Infiltrate bestehen in allen Wandschichten. Makroskopisch imponiert die Appendix geschwollen und gerötet. Im Lumen kann sich ein eitriges Exsudat zeigen.
3. Ulzerophlegmonöse Appendizitis: Zusätzlich zu den oben beschriebenen Charakteristika treten tiefe Ulzerationen der Wand auf.
4. Abszedierende Appendizitis: Es finden sich multiple Abszesse. Die Entzündung kann sich, im Sinne einer Durchwanderung auch auf umgebende Strukturen wie das Mesenteriolum ausbreiten.
5. Gangränöse Appendizitis: Große Nekrosezonen werden durch Bakterien besiedelt. Perforationen sind in diesem Stadium häufig.

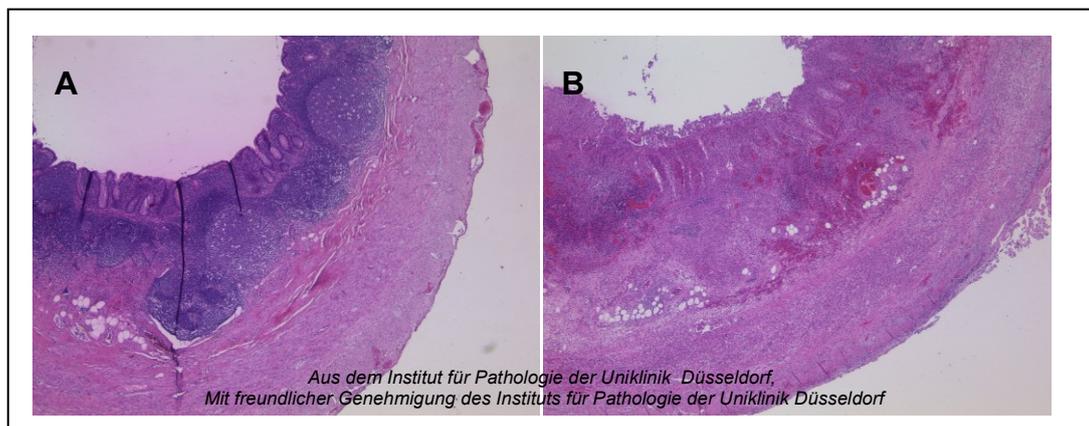


Abbildung 1 Histologie der Appendix, A: gesunde Appendix, B: ulzerophlegmonöse Appendizitis

## 1.4 Ein historischer Überblick

Um das Jahr 200 nach Christus war der Anatom Galen ein Vorreiter der Wissenschaft. Ihm gelang es durch das Sezieren von Tieren umfangreiche anatomische Kenntnisse zu erlangen. Seine Lehren blieben in Ermangelung kompetenter Kritiker lange Zeit unumstritten. Sie setzten sich bis ins Mittelalter hinein als die führende medizinische Doktrin durch. Da Galen vor allem Affen seziierte, welche keine Appendix vermiformis aufweisen, ist in seinen Aufzeichnungen der Wurmfortsatz nicht zu finden. Daher konnte lange Zeit kein Zusammenhang zwischen Unterbauchschmerzen und der Appendix vermiformis hergestellt werden [28].

Die älteste Aufzeichnung eines eindeutig erkennbaren Wurmfortsatzes findet sich in einem Bild des italienischen Gelehrten Leonardo da Vinci aus dem Jahre 1492. Dieses wurde allerdings erst im 18. Jahrhundert veröffentlicht [29]. Doch auch andere Mediziner und Gelehrte beschäftigten sich ab dem Mittelalter mit der Appendix. Die Aufzeichnungen Bengario da Carpis 1522 sprachen erstmalig von einem „Additivum“ am Zökum. Andreas Vesalius, ein flämischer Anatom des 16. Jahrhunderts kam zu der Ansicht, dass dieses Additivum das „wahre“ Zökum darstellt, da es - im Gegensatz zum restlichen Kolon - tatsächlich blind ende [28].

Erste differenzierte Beschreibungen einer Entzündung dieses Additivums gehen auf das Jahr 1711 zurück. Das Beschwerdebild wurde in jener Zeit als (Rechts)-Seitenkrankheit bezeichnet. Lorenz Heister, ein deutscher Anatom und Botaniker (1683 – 1758) machte als Erster auf den möglichen Zusammenhang zwischen der Seitenkrankheit und einer Entzündung des Wurmfortsatzes aufmerksam. Bei einer Sektion, so liest man in seinen Aufzeichnungen, sei er neben einem geröteten Dickdarm auf einen schwarzen Wurmfortsatz gestoßen. Als er den verhärteten und verwachsenen Wurmfortsatz genauer ansehen wollte, riss dieser ein und Eiter entleerte sich in den Bauchraum. Heister konstatierte, dass diese eitrige Entzündung der Ursprung der Beschwerden der „Seitenkrankheit“ gewesen sein müsse. Deshalb riet er, im Gegensatz zu den

damals gängigen Therapieverfahren wie Aderlass und Blutegeltherapien, zu Behandlungen mit warmen Klistieren unter anderem mit Kamillenblüten, um die Entzündung einzudämmen [61,65].

Trotz der neu gewonnenen Erkenntnisse dauerte es noch viele Jahre bis die ersten Operationen einer Appendizitis möglich waren. Es mangelte an akzeptierten Theorien zur Pathogenese, Antisepetik und Narkoseverfahren. 1735 führte Claudius Amyand, ein französischer Chirurg im Dienste der englischen Armee, die erste Blinddarmoperation an einem 11-jährigen Jungen durch. Eigentlich war eine Hernie der Grund für den Eingriff, jedoch befand sich in dem Herniensack auch eine entzündete Appendix [29, 28]. Noch heute wird diese Form der Appendizitis als Amyand-Appendizitis bezeichnet [30]. 100 Jahre später, im Jahre 1848, führte der Engländer H. Hancock zum ersten Mal eine erfolgreiche Operation durch, die die Eiterdrainage einer entzündeten Appendix zum Ziel hatte. Nach der Genesung seines Patienten empfahl er diese Vorgehensweise als Standardtherapie für den perityphylitischen Abszess [*Typhlos*: griechisch für Wurmfortsatz], wie die Blinddarmentzündung in dieser Zeit verstanden wurde. Er sprach sich außerdem dafür aus, die Operation frühzeitig durchzuführen, noch bevor der Abszess an der Haut sichtbar würde oder Adhäsionen an der Bauchdecke entstünden [28]. Auch der Amerikaner Willard Parker stimmte dieser Auffassung 1867 zu. Da sich zu dieser Zeit Joseph Lister mit der Lehre der Antisepetik einen Namen machte [31], die der Chirurgie einen großen Auftrieb verschaffte, setzte sich nun die Auffassung Parkers und auch Hancocks durch, Operationsindikationen großzügig zu stellen.

Reginald H. Fitz entschied 1886 den Jahrhunderte andauernden Streit, ob die „Seitenkrankheit“ vom Zökum oder der Appendix ausging: Er prägte den Begriff „Appendizitis“ und empfahl eine frühe und vollständige Entfernung des entzündeten Organabschnitts [18]. Bis dato war die Appendizitis als perikolische oder perityphlitische Entzündung bezeichnet worden. Mit der Klärung der Pathologie war der Grundstein für einen ursächlichen chirurgischen

Ansatz gelegt. Die „Seitenkrankheit“ erfuhr neue Aufmerksamkeit durch Chirurgen und Pathologen [32].

An der Wende zum 20. Jahrhundert experimentierten mehrere Chirurgen verschiedener Länder an der Operationstechnik bei Appendizitis [28]. 1891 publizierte George R. Fowler eine frühe Operationstechnik für die Appendizitis. In seiner Publikation „*The operative Technique of Appendicitis*“ betonte er explizit die Wichtigkeit der Desinfektion des Operationsgebietes vor der Schnittsetzung. Außerdem empfahl er eine intraabdominelle Drainage und Reinigung mit Hilfe von Zink-Oxid-Gaze. Seine Erfahrungen legten eine Drainage der Appendix in solchen Fällen nahe, in denen die Entzündung bereits das umgebende Gewebe infiltriert hatte [33]. Ein Meilenstein in der Behandlung der Appendizitis waren die Erkenntnisse des Amerikaners Charles McBurney. Er entdeckte, dass sämtliche seiner Appendizitis-Patienten Druckschmerzen an derselben Stelle der Bauchdecke aufwiesen. Dieser Punkt befand sich auf einer gedachten Linie zwischen der rechten Spina iliaca anterior superior zum Bauchnabel, ca. 1 ½ bis 2 Inches (1 Inch = 2,54cm) von der Spina entfernt [32]. Diese, nach seinem Entdecker als McBurney-Punkt benannte Lokalisation dient auch heute noch als wirksamer klinischer Indikator für eine Appendizitis. Ebenfalls beschrieb McBurney 1894 die heute noch gängige Technik der vollständigen offenen Appendektomie. Er empfahl die Appendix frühzeitig und vor allem vollständig zu entfernen, da die Todesursache der „Seitenkrankheit“ eine von der Appendix ausgehende Sepsis sei. Diese Maßnahme war zu der damaligen Zeit neuartig, da man zuvor nur Teile der Appendix entfernt oder eine Eiterdrainage vorgenommen hatte. Auch der Zugang der Appendektomie konnte durch McBurney reformiert werden. Er schlug vor, den damals verbreiteten sagittalen Schnitt am Lateralrand der Aponeurose des Musculus rectus abdominis durch einen queren Schnitt zu ersetzen, der transmuskulär durchgeführt wurde. Dieser, heute als Wechselschnitt bekannte Operationszugang, verläuft schräg zur Medianlinie. Ein Drittel des Schnittes sollte sich dabei oberhalb einer gedachten Linie zwischen Spina iliaca superior anterior und dem Umbilicus befinden. Danach wurden die Muskelschichten

entlang ihres Verlaufes gespalten. Zuvor war der Zugang durch die Linea alba erfolgt. Der Vorteil der McBurney von diesem Operationsverfahren überzeugte, war eine deutlich niedrigere Rate an postoperativen Narbenhernien [34].

Ins öffentliche Bewusstsein gelangte die Operation der Appendizitis spätestens durch einen prominenten Fall. Der Prinz von Wales Edward VII erkrankte kurz vor seiner geplanten Krönung zum König von Großbritannien im Sommer 1902 an einer Entzündung des Blinddarms. Nach vergeblichen Therapieversuchen seines Hofarztes wurde der Kronprinz schließlich von dem britischen Chirurgen Frederick Treves operiert. Die eitrige Appendix wurde drainiert und der Patient konnte, nach einer kurzen Genesungsphase, mit wenigen Tagen Verspätung gekrönt werden. Die positiven Behandlungsergebnisse verhalfen dieser Operationsindikation weltweit rasch zur Durchsetzung [29].

Eine Kuriosität: Im Jahre 1961 führte der russische Chirurg Leonid Rogazov seine eigene Appendektomie durch. Er war der behandelnde Arzt eines sowjetischen Expeditionsteams, das einige Wochen zuvor in der Antarktis angekommen war, um dort eine neue Polarbasis aufzubauen. Nachdem er einige Tage mit den Symptomen der akuten Appendizitis im Bett gelegen und alle ihm möglichen konservativen Therapieoptionen ausgeschöpft hatte, entschloss er sich, seinen entzündeten Blinddarm selbst zu entfernen. Unterstützung von außen war auf Grund der Wetterbedingungen nicht möglich. Die Operation glückte ihm am 30. April 1961 und er genas in wenigen Wochen vollständig [35].

Einen weiteren Meilenstein in der Geschichte der Appendizitis setzte der deutsche Gynäkologe K. Semm. Dieser revolutionierte 1983 die bis dahin regelhaft laparotomisch durchgeführten Appendektomien. Er veröffentlichte eine Anleitung zur Operation in Schlüssellochtechnik bei akuter Appendizitis. Bis dato war die Laparoskopie vornehmlich gynäkologischen Eingriffen vorbehalten. Semm stellte die Indikationen für einen laparoskopischen Eingriff bei chronischen und subakuten Appendizitiden sowie Entzündungen mit

Ausbreitungen auf die Adnexen [36]. Diese Operationsmethode wird heute an vielen Häusern regelhaft angewandt (s. Therapieoptionen der Appendizitis).

In den vergangenen 10 Jahren experimentierten Chirurgen an einer revolutionären neuen Operationstechnik, die sich natürlicher Körperöffnungen bedient und keine Narben an der Haut hinterlässt. 2005 konnten bei Tierexperimenten die Eileiter von sechs Schweinen durch den Magen entfernt werden [37]. Diese als *Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery* (NOTES) bezeichnete Technik, wird in experimentellen Studien heute auch an Patienten mit Appendizitis angewendet und evaluiert [38]. Evidenz basierte Ergebnisse liegen noch nicht vor.

## 1.5 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz der akuten Appendizitis in Europa und Nordamerika erlebte im Zeitraum zwischen 1975 und 1984 aus ungeklärten Gründen einen deutlichen Rückgang um rund 15%. Seitdem liegt die Inzidenz bei 100 / 100.000 [39, 40]. Männer erkranken 1,5-mal häufiger an einer Appendizitis als Frauen. Ebenfalls ist bei Männern das Risiko einer Perforation im Vergleich zu Frauen zweifach erhöht [41]. 8,6% der Männer erkranken Zeit ihres Lebens. Bei Frauen ist die Wahrscheinlichkeit mit 6,7% etwas geringer [39]. Das Lebenszeitrisiko einer Appendektomie unterzogen zu werden, ist bei Frauen mit 23% deutlich gegenüber dem der Männer erhöht (12%) [39]. Grund hierfür sind bei Frauen häufiger vorkommende abdominale Beschwerden, bei denen eine Appendizitis nicht ausgeschlossen werden kann und zur Sicherheit oder zum Ausschluss eine Operation erfolgt.

Das Auftreten der akuten Appendizitis zeigt eine saisonale Häufung in den Sommer- und Wintermonaten. Es wird eine virale oder bakterielle Korrelation vermutet, die bisher noch nicht empirisch bestätigt werden konnte [42, 39, 43]. Hellhäutige Patienten haben ein 1,5fach erhöhtes Risiko an einer Appendizitis zu erkranken als nicht-hellhäutige Patienten [39].

Die Inzidenz der akuten Appendizitis ist in den Altersgruppen 10 bis 19 (34,5%) und 20 bis 29 Jahre (25,8%) am höchsten. Je jünger ein Kind ist, desto unwahrscheinlicher leidet es unter einer akuten Blinddarmentzündung [41]. Die höchste positive Appendektomie, also Appendektomie bei später positivem histopathologischem Befund, zeigt sich in der Altersgruppe der 10- bis 19-jährigen [39]. Kinder, die unter Adipositas leiden, zeigen häufiger eine bereits perforierte Appendix bei Diagnosestellung als normalgewichtige Kinder (45 zu 30%) [44].

Die Ätiologie der Appendizitis ist nicht endgültig geklärt. Eine gängige Theorie geht von einer Lumenobstruktion der Appendix aus. Diese kann beispielsweise durch Kotsteine oder Fremdkörper hervorgerufen werden. Durch die Obstruktion kommt es zu einer Schleimretention im Appendixlumen, was wiederum zu einer Schwellung der Schleimhäute führt. Außerdem kommt es zu bakterieller Überbesiedelung durch den verlängerten Verbleib des Schleimhautsekretes im Appendixlumen. Die Mukosaschwellung breitet sich schließlich auch auf die tieferen Wandschichten des Blinddarmes aus, was wiederum eine Minderperfusion betroffener Abschnitte hervorruft und eine bakterielle Durchwanderung der Appendixwand zur Folge hat. Eine länger andauernde Unterversorgung mit Blut kann schließlich zu Wandnekrosen mit konsekutiver Perforation führen [43, 45]. Ebenfalls diskutiert werden eine ballaststoffarme Ernährung und genetische Prädisposition. So konnte gezeigt werden, dass Kinder, die unter Appendizitis litten, doppelt so häufig Appendizitiden in der Familienanamnese hatten, als Kinder, die keine Appendizitis aufwiesen [43].

## 1.6 Diagnostik

### 1.6.1 Anamnese:

In der Anamnese der betroffenen Patienten zeigt sich eine Bandbreite von diskreten Beschwerden bis zu schwersten Krankheitsbildern reichend. Patienten berichten klassischerweise über einen epigastrisch oder periumbilical

beginnenden Bauchschmerz, der im Verlauf von wenigen Stunden in den rechten Unterbauch wandert. Dies ist ein häufiges Symptom der akuten Appendizitis (Sensitivität (Sens): 0,14-0,69; Spezifität (Spez): 0,84-0,9) [42, 46, 47]. Eine kontinuierliche Zunahme der Schmerzintensität ist ebenfalls ein Hinweis auf eine akute Appendizitis (Sens: 0,64; Spez: 0,62) [46]. Undulierende Beschwerden im Verlauf sind eher untypisch für diese Erkrankung. Übelkeit und Erbrechen hingegen treten häufig im Verlauf von Appendizitiden auf (Sens: 0,29-0,82), sind aber nicht spezifisch für diese Erkrankung (Spez: 0,34-0,79) [46, 48, 42]. Vor allem bei kleinen Kindern sind Durchfälle bei einer Appendizitis zu beobachten. Da dieses Symptom zu einer Verschleierung der wahren Diagnose führt, ist eine verzögerte Diagnosestellung häufig [14].

### 1.6.2 Klinische Untersuchung

Auch die klinischen Untersuchungsbefunde zeigen eine große Varianz. Die Interpretation der Befunde ist stark von der Erfahrung und der fachlichen Ausrichtung des Untersuchers abhängig.

Bei der klinischen Untersuchung kann meist ein Druckschmerz mit *punctum maximum* (Punkt mit maximaler Ausprägung des Schmerzes) über dem rechten unteren Quadranten des Abdomens ausgelöst werden (Sens: 0,64; Spez: 0,72) [46].

Kann am Druckpunkt nach McBurney (s. oben) Druckschmerz ausgelöst werden, ist dies ein Hinweis auf eine Beteiligung der Appendix. Die Lage des Blinddarms spielt dabei eine wichtige Rolle. Der bereits zuvor beschriebene McBurney-Punkt projiziert sich, wenn positiv meist auf die Basis der Appendix. Auch nach dorsal umgeschlagene Wurmfortsätze können hier schmerzhaft imponieren [32].

Beim Rovsing-Zeichen wird der Kolonrahmen kräftig antiperistaltisch von links nach rechts entlang des Kolon transversum in Richtung des Blinddarms ausgestrichen. Es entstehen Schmerzen beim Anstoßen der Kotsäule an die

entzündete Appendix [49]. Ein positives Rovsing- Zeichen macht eine akute Appendizitis zu 90% wahrscheinlich [50].

Der kontralaterale Loslassschmerz, auch Blumberg-Zeichen genannt, lässt auf eine Entzündung des Peritoneums schließen. Diese kann im Verlauf einer akuten Appendizitis entstehen. Hierbei wird eine 3-5cm tiefe Palpation des linken Unterbauches vorgenommen und der Druck für einen Zeitraum von 30 Sekunden angehalten. Der Patient sollte dabei abgelenkt werden. Gibt er beim Loslassen Schmerzen im rechten Unterbauch an, so ist der kontralaterale Loslassschmerz positiv (Sens: 0,12-0,88; Spez: 0,74-0,88) [42, 47, 48, 46].

Ebenfalls ein Zeichen der beginnenden Peritonitis können Schmerzen beim Hüpfen, Husten oder Beklopfen des Unterbauches sein (Sens: 0,73-0,89; Spez: 0,51-0,7) [47].

Liegt der entzündete Wurmfortsatz auf dem Musculus Psoas, kann das Psoas-Zeichen ausgelöst werden. Der liegende Patient hebt das rechte gestreckte Bein gegen den Widerstand eines Untersuchers an. Hierbei entsteht Schmerz im rechten Unterbauch wenn die Entzündung den Psoasmuskel mit einbezieht (Sens: 0,23 -0,44; Spez: 0,86 - 0,94; bei Kindern zwischen drei und 12 Jahren)[47].

Eine diffuse Abwehrspannung kann ein Hinweis auf eine generalisierte Peritonitis sein, die in der Folge einer perforierenden Appendizitis entstehen kann (Sens: 0,54- 0,77; Spez: 0,63-0,61) [47].

Die einzelnen Untersuchungsbefunde können irreführend sein und bergen das Risiko Patienten mit einer Appendizitis zu übersehen oder Patienten mit anderen Diagnosen fälschlicherweise einer Appendizitistherapie zu unterziehen.

### 1.6.3. Scores

Um die diagnostische Sicherheit zu erhöhen wurden verschiedene Scores zur Validierung der Befunde entwickelt. So werden beispielsweise im *Alvarado-Score* oder dem *Pediatric-Appendicitis-Score* (PAS) für verschiedene Parameter Punkte vergeben.

Schmerzwanderung, Appetitlosigkeit, Übelkeit/Erbrechen, Druckschmerz im rechten Unterbauch und kontralateraler Loslassschmerz, Körpertemperatur über 38°C, Leukozytose über 10.000/µl und der Anteil der polymorphen Neutrophilen über 75% ergeben maximal zehn Punkte [42, 51, 52].

Punktwerte von neun oder zehn machen das Vorhandensein einer Appendizitis wahrscheinlich. Werte von unter fünf Punkten hingegen machen eine Appendizitis unwahrscheinlich [42]. Werte zwischen sechs und acht liegen im Graubereich und erlauben keine eindeutige Aussage. Retrospektive Studien zeigten Mittelwerte von 7,8 - 8,2 Punkten bei Kindern mit akuter Appendizitis, und einem Mittelwert von 6,2 bei Kindern ohne Blinddarmentzündung [53]. Kinder unter vier Jahren zeigten signifikant niedrigere Werte im PAS als Kinder höheren Alters, obschon diese Patientengruppe häufig bereits eine fortgeschrittene Erkrankung aufwies [54].

Das diagnostische Dilemma lässt sich also auch mit Hilfe der Scores letztendlich nicht beheben, da die Werte beider Gruppen nah beieinander liegen und sich überschneiden.

### 1.6.4 Klinische Chemie

Im Falle eines begründeten Verdachts auf eine akute Blinddarmentzündung werden im klinischen Setting Blut- und Urinwerte überprüft. Laborchemisch kommen die allgemeinen Entzündungswerte im Blut zur Diagnostik der Appendizitis zum Einsatz:

Die Leukozytose, definiert als mehr als >10.000 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, ist bei vielen differentialdiagnostisch in Erwägung zu ziehenden Erkrankungen zu finden. Sie ist als Marker für Appendizitis auf Grund ihrer niedrigen Spezifität nicht ausreichend (Sens: 0,83-0,93; Spez: 0,36-0,67) [4, 42, 55]. Der Anteil der Neutrophilen unter den Granulozyten hingegen zeigt eine hohe Spezifität (0,9) für eine akute Appendizitis. Bei geringer Sensitivität (Sens: 0,61) ist dieser Wert dennoch nicht als Marker für eine akute Appendizitis ausreichend [55]. Die Linksverschiebung im Blutbild, also der vermehrte Anfall unreifer neutrophiler Granulozyten, zeigte eine variable Sensitivität von 0,28 – 0,59 bei einer guten Spezifität von 0,87 bis 0,90.

Das verzögert ansteigende akute Phase Protein „C-Reaktives Protein“ (CRP) ist in der Diagnostik der frühen Appendizitis wenig von Nutzen (Tag eins: *Area Under Curve* (AUC): 0,6). Im Verlauf einer Appendizitis steigt der Wert, so dass er beispielsweise an Tag drei einer Appendizitis eine AUC von 0,88 zeigt [4]. Insgesamt, also ohne Tageskorrelation liegt die Sensitivität bei 0,69-0,86 und die Spezifität bei 0,3-0,65 [56–58].

Urinanalysen können ebenfalls Hinweise auf eine Appendizitis geben oder Differentialdiagnosen erhärten. Vor allem wird die Urinanalyse zum Ausschluss urogenitaler Erkrankungen verwendet. Dabei werden sowohl Anzahl als auch Form und Anordnung von Leukozyten und Erythrozyten im Urin ausgewertet. Auch der Nachweis von Nitrit und der pH-Wert können Hinweise geben [59]. Das Keimspektrum der im Urin gefundenen Bakterien kann Differentialdiagnosen erhärten oder ausschließen. Der häufigste nachgewiesene Keim des Urogenitaltraktes ist *E. coli*, der durch die enge Nähe von Harnwegen und Darmtrakt übersiedelt. Aber auch Keime, die zu sexuell vermittelten Infektionen gehören, können mit Urinanalysen nachgewiesen werden [59].

### 1.6.5. Sonographie

Eine weitere Methode der Appendizitisdiagnostik bildet die Sonographie des rechten Unterbauches. Diese Untersuchung ist stark untersucherabhängig. Wenn möglich wird die Appendix dargestellt. Dies gelingt in 37- 55 % der Fälle [60, 3]. Beurteilt wird dann der maximale Durchmesser der Appendix. Ein positiver Befund wurde beispielsweise von Goldin *et al* als über 7mm definiert (Sens: 0,89; Spez: 0,95) [61]. Konnte sogar der Wanddurchmesser einer einzelnen Wand bestimmt werden, so zeigte dieser bei Goldin *et al* ab mehr als 1,7mm Dicke eine Sensitivität von 92% und eine Spezifität von 100% [61]. Als weitere potentielle Symptome im Ultraschall wurden 2011 von Goldin *et al* folgende Befunde identifiziert: Darstellung eines Fäkolithen (Sens: 0,3; Spez: 0,96), Hyperämie (Sens: 0,56; Spez: 0,98) und freie Flüssigkeit (Sens: 0,2; Spez: 0,99) [61]. Auch bei positiven Ultraschallbefunden, lag die negative Appendektomie rate zwischen 5 bis 18,3% [62, 60].

Die Durchführung einer Ultraschalluntersuchung zur Diagnostik einer akuten Appendizitis führte zu keiner Reduktion der Aufenthaltsdauer im Krankenhaus und hatte ebenfalls keinen positiven Effekt auf das Auftreten von ungünstigen Verläufen [63]. Zusammenfassend konnten mit Hilfe der Ultraschalluntersuchung kostengünstig und ohne Strahlenbelastung weitere Hinweise auf eine Appendizitis gewonnen werden. Eine eindeutige Diagnose war allerdings auch mit dieser Methode nicht möglich.

### 1.6.6 Bildgebende Diagnostik

Bei nicht eindeutigen Ultraschallbefunden kann eine bildgebende Diagnostik wie Computertomographie oder Magnetresonanztomographie zur weiteren Eingrenzung der Differentialdiagnosen hinzugezogen werden.

Die Computertomographie (CT) hat in der Diagnostik der pädiatrischen Appendizitis auf Grund der hohen Strahlenbelastung eine untergeordnete Bedeutung. Ein positiver Befund zeigt einen Durchmesser der Appendix von über 6mm. Es können ebenfalls weitere Zeichen einer Entzündung im rechten

Unterbauch z.B. ein die Appendix umgebendes Ödem, sowie Appendikolithen oder eine Lymphadenopathie festgestellt werden [64]. Die CT-Untersuchung zeigte eine Sensitivität zwischen 97,2 und 98,6%, sowie eine Spezifität zwischen 62,5 und 100% [65–67]. Eine 2010 in den Niederlanden eingeführte Leitlinie zur Diagnostik der Appendizitis legt den Einsatz einer Bildgebung bei Erwachsenen nahe. Retrospektive Studien nach Einführung dieser Leitlinie zeigten eine Reduktion der Hospitalisierungsdauer von 2,75 auf 1,91 Tage. Auch die Kosten des Krankenhausaufenthaltes zeigten eine Reduktion von 2.481 auf 1.887€ [68]. Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass die negative Appendektomiequote von vorher 15% durch die Anwendung von Bildgebung wie Computertomographie nur unwesentlich, auf 12% verbessert werden konnte [69].

CT-Untersuchungen beinhalten eine für den kindlichen Körper schädliche Strahlenbelastung. Im Vergleich zu Erwachsenen wird bei Kindern auf Grund des höheren Wasseranteils der Zellen mehr Strahlung absorbiert [70]. Die auf molekularer Ebene verursachten Zellschäden können mit einer Latenz von zehn bis 40 Jahren z.B. zu Neoplasien führen. Da Kinder diese Zeitspanne in der Regel überleben, ist dies ein relevantes Risiko strahlenbelasteter Untersuchungen [70]. Das erhöhte Risiko für Erkrankungen des blutbildenden Systems nach Strahlenbelastung erklärt sich durch die unterschiedliche Verteilung des blutbildenden Systems im Vergleich zu Erwachsenen. Konzentriert sich die Blutbildung bei Erwachsenen eher auf den Körperstamm, so ist bei Säuglingen und Kindern die Blutbildung auf Stamm und Extremitäten verteilt [70].

Um dieses Risiko zu umgehen, wird bei Kindern die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Sie zeigt eine gute Sensitivität (81-97,6%) und Spezifität (82-98%) [71–73]. Der Einsatz von Kontrastmittel bei der MRT-Untersuchung zeigte keine Besserung der Sensitivität und Spezifität [74]. Bei kleinen Kindern ist eine MRT-Untersuchung nur in Narkose möglich, da das Kind während der Untersuchung vollkommen still liegen muss. MRT-

Diagnostik ist nicht flächendeckend verfügbar und nach wie vor mit hohen Kosten verbunden. Daher wird diese Untersuchung trotz guter Ergebnisse nicht regelhaft angewandt.

### 1.6.7 Explorative Laparoskopie

Erhärtet sich durch die oben genannten Ergebnisse ein hinreichender Verdacht auf eine Blinddarmentzündung kann eine explorative Laparoskopie durchgeführt werden. Liegt tatsächlich eine Appendizitis vor, kann im selben Eingriff die Therapie im Sinne einer Appendektomie erfolgen. Zeigt sich makroskopisch eine gesunde Appendix, so kann nach anderen abdominellen Ursachen der Beschwerden, wie z.B. einem Meckel'schen Divertikel oder einer stielgedrehten Ovarialzyste gesucht werden [75]. Diese können häufig ebenfalls im gleichen Eingriff behandelt werden. Ist makroskopisch keine Krankheitsursache erkennbar, so kann eine beginnende oder mikroskopische Appendizitis vermutet werden. Bei relevanter Appendizitis - spezifischer Klinik kann in diesen Fällen trotz unauffälliger Appendix eine Appendektomie vorgenommen werden [75]. Die Sinnhaftigkeit einer vorsorglichen Appendektomie ist jedoch umstritten [76].

## 1.7 Therapieoptionen

### 1.7.1 Der konservative Therapieansatz

Bei der konservativen Therapie kommen Antibiotika zum Einsatz. Der Patient erhält außerdem eine orale Nahrungskarenz und parenterale Flüssigkeitssubstitution sowie Bettruhe. An diese Therapie schließt sich aktuell im symptomfreien Intervall, ca. sechs Wochen nach Abklingen der Symptomatik, eine Appendektomie an [77]. Es gibt Hinweise, dass eine routinemäßige Intervallappendektomie keinen Nutzen hat und diese Vorgehensweise aufgegeben werden sollte [78]. Kirby et al beschrieben mit 10% eine deutlich höhere Rate an schweren Komplikationen bei einer konservativen Therapie gegenüber einer operativen Therapie (0,8%) [79]. Die

Erfolgsquote lag in Studien zwischen 68 und 95%. In fünf bis 14% traten jedoch Rezidive auf [77]. Trotzdem gibt es Indikationen für eine konservative Therapie:

Bei schweren Entzündungsreaktionen innerhalb des Abdomens kann die operative Versorgung erschwert sein. Der Stumpf der Appendix kann bei gleichzeitigem Vorliegen von Phlegmonen oder Abszessen schwerer zu verschließen sein [77]. Hierbei kann die antibiotische Therapie zum Einsatz kommen, um die Entzündung zu verringern und anschließend bessere operative Resultate zu ermöglichen [80].

Auch bei unkomplizierten Appendizitiden kann eine konservative Therapie in Erwägung gezogen werden. Voraussetzungen dafür sind kein Nachweis von Abszess, Perforation, Sepsis, disseminierte Peritonitis bei nicht-schwangeren und immunkompetenten Erwachsenen. Verschlechtert sich der Zustand des Patienten oder fallen die Leukozyten nicht innerhalb von 48 Stunden ab, sollte die operative Versorgung angestrebt werden [80]. Flum *et al* zeigten die Notwendigkeit einer operativen Versorgung nach initialer Antibiotikatherapie in 0 bis 53% der Fälle [80].

Risikofaktoren wie Fäkolithen, Dünndarmobstruktion und erhöhte CRP-Werte (über 4mg/dl) jedoch sollten zu einer operativen Therapie der Appendizitis führen, da sie mit erschwerten Krankheitsverläufen und / oder Rezidiven vergesellschaftet sind [77].

### 1.7.2 Die operative Therapie

In den meisten Fällen ist die chirurgische Therapie der Appendizitis indiziert. Durch eine notfallmäßige operative Therapie wird, im Vergleich zum konservativen Vorgehen kein erneuter Krankenhausaufenthalt im Intervall notwendig. Ebenfalls kann durch die sofortige endgültige Therapie das Risiko einer rezidivierend auftretenden Appendizitis verringert werden [77].

Die Operation sieht eine vollständige Entfernung des entzündeten Organs vor. Unter Sicht erfolgt die Skelettierung der Appendix. Anschließend werden die versorgenden Gefäße abgesetzt, die Appendix entfernt und der Stumpf verschlossen. Unter den heute gängigen gibt es zwei relevante Operationsmethoden.

#### 1. Die konventionelle laparotomische Appendektomie

Die auch als „offene“ Appendektomie bezeichnete Operation galt lange als Goldstandard in der Therapie der Blinddarmentzündung. Bis ins späte 20. Jahrhundert hinein war sie die einzige chirurgische Interventionsmöglichkeit [36].

Der häufigste Zugang erfolgt über den oben erwähnten, von McBurney geprägten, Wechselschnitt im rechten unteren Quadranten des Abdomens. Anwendbar bei abgegrenzten Entzündungsherden, weist er eine niedrigere Rate an postoperativen Narbenhernien und einen verhältnismäßig kurzen Hautschnitt auf [34]. Er kann jedoch nur geringfügig erweitert werden [45].

Ebenfalls wird der als pararektaler Schnitt bekannte Zugang verwendet. Er wird vor allem bei unbekannter Krankheitschwere oder weiter fortgeschrittenen Appendizitiden genutzt. Die Schnittführung erfolgt parallel zum Rand des Musculus rectus abdominis und kann je nach Befund ausgiebig erweitert werden [45].

Bei schweren Krankheitsbildern wie z.B. bereits perforierter Appendix kann eine mediane Unterbauchlaparotomie notwendig werden. Sie ermöglicht eine großflächige Exploration des gesamten Abdomens und eine Lavage [Spülung] bei ausgeprägter Peritonitis [45]. Zeigt sich intraoperativ eine Darmperforation oder ein Volvulus sollte ein Verfahrenswechsel auf die mediane Laparotomie erfolgen, um eine bestmögliche Behandlung zu gewährleisten [45].

Das Auftreten postoperativer Komplikationen ist stark abhängig vom Ausbreitungsgrad der Entzündung. 3% der unkomplizierten, aber 40% der

komplizierten Appendizitiden zeigen Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, intraabdominelle Abszesse und Adhäsionen [45].

## 2. Die laparoskopische Appendektomie

Die seit 1983 praktizierte laparoskopische Appendektomie wurde nach anfänglicher Skepsis der chirurgischen Gesellschaft bald zu einer anerkannten Therapiemethode der Appendizitis. Anstelle eines großen Hautschnittes, werden in der Regel drei kleine Schnitte für den Zugang der Trokare nötig. Der Trokar für die Optik wird meist über einen paraumbilicalen Schnitt platziert. Anschließend werden die beiden Arbeitstrokare im linken Unterbauch und über dem McBurney-Punkt eingesetzt. Diese Lokalisationen können jedoch je nach Befund variieren, weswegen sie nach einer ersten Sichtung des Befundes platziert werden sollten. Das weitere Vorgehen gestaltet sich ähnlich dem Prinzip der offenen Operation [45].

Das Auffinden der entzündeten Appendix kann sich bei der laparoskopischen Therapie schwieriger gestalten als bei der offenen Variante. Die Vergrößerung durch die Optik führt hingegen zu einer besseren Darstellung der Gefäße. Dadurch kommt es seltener zu Verletzungen von Gefäßen. Im Falle einer Gefäßverletzung ist die Versorgung jedoch erschwert. Bei starken Blutungen muss auf eine offene Technik gewechselt werden [45]. Ein weiterer Nachteil der laparoskopischen Appendektomie ist die längere Operationsdauer. Orhan *et al* verzeichneten bei komplizierten Appendizitiden, also solchen bei denen eine Perforation, eine Gangrän, eine perityphlitische Entzündungsreaktion oder ein intraabdomineller Abszess vorlagen, bei 30% der Appendektomien eine Überschreitung der Dauer von 120 Minuten. Bei unkomplizierten Appendizitiden war nur bei 15% eine mehr als 120-minütige Operation vonnöten. Mehr als die Hälfte der unkomplizierten Appendizitiden konnte in dieser Studie weniger als einer Stunde Operationszeit versorgt werden [81]. Die Komplikationen einer laparoskopischen Appendektomie gleichen denen der offenen Operation [82]. Der Vorteil der Laparoskopie ist das niedrigere Risiko für das Auftreten von

Wundheilungsstörungen und Hernien. Außerdem erholen sich Patienten schneller von laparoskopischen Eingriffen, was eine Verkürzung der Hospitalisierungsdauer zur Folge hat [45]. Daher wird der Eingriff heute trotz höherer Kosten und größerem Zeitaufwand in vielen Kliniken eingesetzt [83]. In laparoskopisch erfahrenen Kliniken ist die Therapie der offenen Appendektomie überlegen [84].

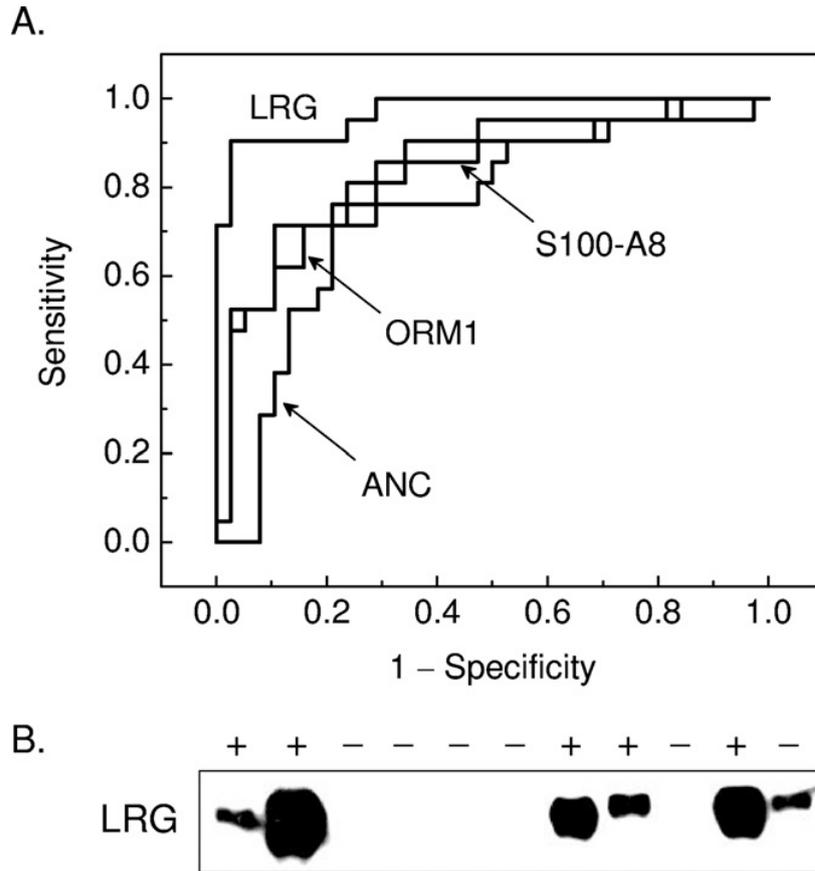
## 1.8 Leucin-rich-alpha2-Glycoprotein als neuer diagnostischer Marker

### 1.8.1 Bostoner Studie zu LRG1[8, 9]

Nachdem festgestellt wurde, dass keine der bisherigen diagnostischen Fortschritte, inklusive der hochauflösenden Bildgebung und laborchemischer Parameter, die Diagnostik der pädiatrischen Appendizitis eindeutiger machen konnten, beschäftigt dieses diagnostische Dilemma weiterhin die heutigen Forschungseinrichtungen.

Kentsis *et al* führten 2010 eine prospektive Kohortenstudie an 67 Kindern mit Bauchschmerzen durch, die suspekt auf eine akute Blinddarmenzündung waren. Hierbei begaben sie sich auf die Suche nach molekularen Bestandteilen, die spezifisch für eine akute Appendizitis waren. Untersucht wurde Urin, da dieser bei so gut wie allen Patienten zu beinahe jedem Zeitpunkt nicht-invasiv zu gewinnen ist.

Der Vergleich der Appendizitis-Kohorte mit der Nicht-Appendizitis-Kohorte zeigte erhöhte Werte von Leucin-Rich-alpha2-Glycoprotein (LRG), S100-A8 und alpha-1-acid-glycoprotein (ORM) in der Appendizitis-Kohorte. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad der Appendizitis unterschiedliche Konzentrationen an Markern zur Folge hatte. So zeigte LRG Potential in der Abgrenzung einer fokalen Appendizitis gegenüber einem Normalbefund. S100-A8 hingegen erschien besonders bei fortgeschrittenen Appendizitiden erhöht. Selbst mikroskopische Appendizitiden konnten durch eine Erhöhung des LRG im Urin der Patienten nachgewiesen werden [8].



**Abbildung 2 A:** ROC-Kurve von LRG= Leucin-rich-alpha-2-Glycoprotein, S100-A8, ORM1= 1-acid glycoprotein 1, ANC= Anzahl der Neutrophilen; **B:**Anreicherung von LRG in Westernblots bei zufällig ausgewählten Urinproben += histologische bestätigte Appendizitis, - = histologisch ausgeschlossene Appendizitis (aus Kentsis et al [8])  
*Mit freundlicher telepostalischer Genehmigung von Kentsis et al*

Abbildung 2 zeigt die *Receiver-Operator-Characteristics-Curve* (ROC-Kurve) der untersuchten Markerproteine. ROC-Kurven sind visuelle Indikatoren der diagnostischen Güte einer Untersuchung. Es werden Sensitivität und Spezifität gegeneinander aufgetragen. Ergibt sich eine große Fläche unter der Kurve oder *Area under the Curve* (AUC) bedeutet dies eine hohe Sensitivität und Spezifität, wobei 1,0 der Maximalwert ist. Eine AUC von 0,5 würde das Resultat einer Zufallsverteilung anzeigen. LRG zeigte bei Kentsis *et al* eine AUC von 0,97. Damit scheint LRG ein Parameter mit hoher Sensitivität und Spezifität für eine akute Appendizitis zu sein. Kentsis *et al* zeigten, dass es einen Schwellenwert

für die Konzentration von LRG gibt, der eine Unterscheidung in Appendizitis und Nicht-Appendizitis mit hoher Sicherheit zulässt. Somit identifizierten sie LRG als hochspezifischen Marker für die Appendizitis.

Patienten mit renalen oder urologischen Erkrankungen stellten hierbei jedoch eine Ausnahme dar. In diesen Gruppen war die Auswertung der LRG-Konzentrationen nicht ausreichend für die sichere Diagnostik der Appendizitis [8].

Eine erste Evaluierung des LRG erfolgte 2012 ebenfalls durch Kentsis *et al* anhand von 49 Kindern mit Verdacht auf Appendizitis. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass LRG eine hohe AUC von 0.98 bis 0.99 produziert. Auch hier gab es keine Überschneidungen zwischen den LRG-Konzentrationen des erkrankten und des nicht-erkrankten Kollektivs bestehen [9].

### 1.8.2 Leucin-rich-alpha-2-Glycoprotein

Leucin-rich-alpha2-glycoprotein wurde bereits im Jahre 1977 identifiziert [85]. Es handelt sich um ein Glycoprotein, bestehend aus 312 Aminosäuren, das sich durch Leucin-reiche Wiederholungen auszeichnet [86]. Die Aminosäure Leucin ist stark hydrophob. Sie findet sich häufig in Membranen oder nach innen gekehrten Abschnitten von Proteinen, die von Wasser abgeschirmt werden sollen [87]. LRG ist auf dem Chromosom 19 kodiert [85]. Das Leucin-rich-alpha2-Glycoprotein wird von diversen Zellen sezerniert. So sind unter anderem Granulozyten, Kardiozyten, Hepatozyten, hochendotheliale Venolen des Mesenteriums und Leukozyten als Sekretionsorte von LRG bekannt [85, 88, 89]. Eine Granulozytenaktivierung durch *granulocytes-colony-stimulating-factor* (G-CSF) hatte die Sezernierung von LRG zur Folge. Die Sekretion erfolgte dabei bereits in der frühen Phase der Granulozytendifferenzierung. Daher wurde angenommen, dass LRG an der Differenzierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt ist [85]. LRG befindet sich in den gleichen Kompartimenten wie die Myeloperoxidase, ein Enzym, das in die Regulierung von

Entzündungsreaktionen eingreift [89]. LRG fungiert außerdem als Leukozytenaktivator und dient der Chemotaxis [8]. Ebenfalls scheint es die Lebenszeit von neutrophilen Granulozyten zu verlängern [89]. Somit ist LRG über Leukozyten an Entzündungsreaktionen beteiligt und scheint an der Regulierung derselben mitzuwirken.

In Leberzellen zeigte sich eine starke Expression von LRG durch Stimulation von Interleukin 6 und 1-beta, ähnlich wie bei akute Phase Proteinen. Auch LRG scheint der Gruppe der akute Phase Proteine anzugehören [90]. Die Bestimmung der LRG-Konzentration mittels *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) ist in einigen Studien nach Modifikation der Studienprotokolle erfolgreich verlaufen [8]. Es zeigten sich jedoch auch Interferenzen, z.B. mit Cytochrom C bei der Konzentrationsbestimmung mittels ELISA. Cytochrom C, ein mitochondriales Protein, fungierte als Induktor der Apoptose von Zellen [91]. Hiervon waren vor allen Dingen Lymphozyten betroffen. LRG band an derselben Stelle wie der *apoptotic peptidase activating factor-1*(Apaf-1), ein Enzym, das wiederum die Apoptose der Zellen induzierte [92]. War LRG an Cytochrom C gebunden, so inhibierte es die Apoptose und schützte sie vor der Toxizität des Cytochroms C [92].

LRG fungierte also sowohl als Aktivator von Granulozyten als auch als Protektor von Lymphozyten. Es war beteiligt an Entzündungsreaktionen und deren Regulierung und scheint der Gruppe der akute-Phase-Proteine anzugehören.

Ein Anstieg der LRG-Konzentration in Blut- und Urinproben ist bereits bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen bekannt, die vor allem Erwachsene betrifft. Unter den Malignomerkrankungen war es sowohl im Magen-Darm-Trakt, bei Gallengangskarzinomen oder kolorektalen Karzinomen, als auch bei Ovarial- und Mammakarzinomen in erhöhter Konzentration zu finden [93–95]. Auch in der Aktivitätsbestimmung der Colitis ulzerosa zeigte LRG einen Nutzen. Es korrelierte mit dem Schweregrad des Schubes der Patienten [96]. Watson *et al*

zeigten, dass LRG in der Frühdiagnostik der Herzinsuffizienz bei hypertensiven Patienten dem bisher genutzten *brain-natriuretic-peptide* (BNP) überlegen war. Es wird davon ausgegangen, dass LRG als Indikator einer entzündlichen Veränderung auch die Vorläufer einer Endokardfibrose mit folgender Herzinsuffizienz anzeigen kann [88]. In der Therapiekontrolle bei Shunt-Operationen von Normaldruckhydrocephalus zeigte die LRG-Konzentration ebenfalls eine positive Korrelation mit dem Therapieerfolg [97]. Auch als potenzieller Marker für die Aktivität einer rheumatoiden Arthritis ist LRG im Gespräch [98].

Da diese Erkrankungen in der Regel im höheren Lebensalter auftreten, sollten diese keine relevanten Einflüsse auf die Spezifität der LRG - Werte bei Kindern mit Appendizitis haben.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Die Diagnostik der akuten Appendizitis bei Kindern ist mit einer hohen Fehlerquote belastet. Es mangelt bis heute an eindeutigem diagnostischem Werkzeug für den Ausschluss oder die Sicherung einer Appendizitis. Dies führt häufig zu falsch positiven oder falsch negativen Befunden und nicht zielführender Behandlung.

Kentsis et al beschrieben 2010 und 2012 verschiedene Urinmarker für die akute Appendizitis. Leucin-rich-alpha2-Glycoprotein zeigte hier ausgezeichnete Eigenschaften für die Diagnostik der akuten Appendizitis (AUC 0,97 bis 0,99). Die kleine Stichprobengröße und das selektionierte Patientengut schränken die Aussagekraft der Untersuchung ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der Aussagekraft der LRG-Konzentration im Urin von Kindern mit Bauchschmerzen zur Diagnostik oder zum Ausschluss der akuten Appendizitis. Die LRG-Konzentration wurde hierfür mittels Massenspektrometrie bestimmt. Die Überprüfung der Eignung von LRG als Marker wurde an einem größeren Patientenkollektiv durchgeführt. Da in

vorherigen Studien nur Kinder mit bereits bestehendem Verdacht auf eine akute Appendizitis eingeschlossen wurden, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Testung von LRG als Marker für akute Appendizitis an einem unselektierten Patientenkollektiv. Ebenfalls wurde die von Kentsis *et al* beschriebene Korrelation von LRG-Konzentrationen zum Schweregrad der Appendizitis überprüft.

Nebenaspekte waren die wiederholte Erhebung der LRG-Konzentrationen im Krankheitsverlauf sowie die Untersuchung des Einflusses der Lagerung der Urinproben auf die Konzentrationsverhältnisse.

Ziele der vorliegenden Arbeit beinhalteten weiterhin eine Evaluierung klinischer und laborchemischer Parameter. Die klinischen und laborchemischen Parameter wurden hinsichtlich Sensitivität und Spezifität für eine Appendizitis ausgewertet und mit bereits vorhandenen Daten aus der Literatur verglichen.

Es erfolgte eine Diskussion der erhobenen Ergebnisse in Bezug auf die Vorergebnisse von Kentsis *et al* und ein Vergleich mit aktueller Literatur sowie eine abschließende Bewertung von LRG als potentielltem Urinmarker für akute Appendizitis.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Kinder unter einem Jahr und nach Vollendung des 18. Lebensjahres wurden von der Studie ausgeschlossen. Ebenso ausgeschlossen wurden Patienten, deren Eltern nicht in die Studie einwilligten, sowie solche, bei denen keine Urinprobe gewonnen werden konnte.

Die Eltern wurden über die Studie und die datenschutzrechtlichen Bestimmungen aufgeklärt. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Untersuchung wurde durch die Erziehungsberechtigten erteilt.

### 2.2 Vorbereitung

Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigte die prospektive Studie mit dem Aktenzeichen 3724 im Oktober 2011. Die Studie wurde am Universitätsklinikum Düsseldorf, einem Krankenhaus der Supramaximalversorgung durchgeführt. Die Kinderchirurgie besteht hier als Funktionsbereich der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie.

Die notwendige Fallzahl wurde mit Hilfe von G-Power Version 3.1.9.2. berechnet. Es wurden die Sensitivität und Spezifität der 2012 von Kentsis *et al* durchgeführten Studien verwendet. Die Fallzahl für die aussagekräftige Erkennung eines potentiellen Unterschiedes lag bei 20 Patienten mit und 20 Patienten ohne Appendizitis. Um gegebenenfalls auch Aussagen in Bezug auf die unterschiedlichen Differentialdiagnosen machen zu können, wurden 200 Patienten in die Studie mit aufgenommen. Diese Anzahl von Patienten führte zu einer Power von 0,99 für die Erkennung eines Unterschiedes.

### 2.3. Dokumentation

Die Dokumentation der Patienteninformationen erfolgte anhand eines dafür entwickelten Dokumentationsbogens bei Bauchschmerzen in sechs Abschnitten (s. Anhang 1).

Bezüglich der Anamnese wurde der Beginn der Beschwerden, sowie die Schmerzintensität erfasst. Ebenfalls wurden eine potentielle Schmerzwanderung, Appetitlosigkeit und Übelkeit sowie Erbrechen dokumentiert. Wurde ein Klyisma erfolgreich zur Beschwerdelinderung verabreicht, wurde auch diese klinische Maßnahme dokumentiert. Der körperliche Untersuchungsbefund umfasste Druckschmerz im rechten Unterbauch, kontralateralen Loslassschmerz, sowie Schmerzen beim Hüpfen, Klopfen oder Husten. Die Körpertemperatur wurde mittels Ohrthermometer bestimmt. Die Intervalle unter 37,4°C für kein Fieber, zwischen 37,4 und 38,5°C für erhöhte Temperatur und über 38,5°C für Fieber wurden in Anlehnung an den ALVARADRO-Score und den *Pediatric-Appendicitis-Score* (PAS) gewählt. Blutentnahmen waren kein fester Bestandteil Teil des Studienprotokolls und wurden nur nach individueller Abwägung durchgeführt. Wurde eine labormedizinische Blutuntersuchung vorgenommen, wurden Leukozytenwerte und C-Reaktives Protein (CRP) auf dem Bogen dokumentiert. Die *cut-off*-Werte orientierten sich ebenfalls an den Werten, die für die Berechnung des PAS und des ALVARADRO-Scores die Grundlage bildeten. Der vierte Abschnitt des Bogens war für die Dokumentation einer eventuellen Sonographie vorgesehen. Auszuwählen war hierbei der Ausbildungsgrad des Sonographeurs. Da der Befund häufig durch einen Zweituntersucher validiert wurde, stand die Dokumentation in zweifacher Ausfertigung zu Verfügung. Dokumentiert wurde die Darstellbarkeit der Appendix, sowie sein Größendurchmesser, die Kompressibilität, eine Wandverstreichung, Netzkappen oder ein perityphlitischer Abszess. Im fünften Abschnitt wurde die Histologie des Operationspräparates erfasst. Die Einteilung erfolgte anhand der zuvor beschriebenen Studien Einschätzung im histologischen Befund. Der letzte Abschnitt dokumentierte

einen Anruf bei den Eltern der Patienten zwei Wochen nach Aufsuchen der Notaufnahme zum Ausschluss einer eventuell zwischenzeitlich in einem anderen Krankenhaus erfolgten Appendektomie.

#### 2.4 Probenentnahme und -verarbeitung:

Die Probenentnahme erfolgte in der Notfallambulanz der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Es wurden sterile Urinbecher mit Deckel à 100ml (Firma Sarstedt) verwendet, die durch die Patienten, wenn möglich, mit Mittelstrahlurin gefüllt wurden. Die Urinproben wurden durch das Pflegepersonal mit Hilfe einer Pipette (Hypodermic Needle-Pro-edge-Safety Device, smiths medial) in sterile 11ml Flacons (BD Vacutainer Z Plus Urine Tube) umgefüllt. Die Gefäße wurden mit einem Patientenetikett beklebt, welches nur Namen und Geburtsdatum des Patienten umfasste. Datum und Uhrzeit der Urinentnahme wurden dokumentiert.

In der Zeit vom 11.11.2011 bis zum 24.09.2012 wurden die Proben nach folgendem standardisierten Prozedere aufbereitet.

Nachdem die Probe in die 11ml Gefäße umgefüllt worden war, wurde der Urin sofort im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Es wurden drei Aliquots von 0,5ml erstellt. Die Aliquots wurden innerhalb von acht Stunden bei -80°C eingefroren. Vor der Analyse durch Massenspektrometrie wurden die Proben aufgetaut und weiter verarbeitet. Es erfolgte eine zehn-minütige Zentrifugation mit 3068g bei 4°C (Zentrifuge R 5810 R, Eppendorf).

Zunächst wurde eine Analyse mittels *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) durchgeführt. Diese Analyse ergab keine sinnvollen Ergebnisse. Daher wurde das Studienprotokoll auf Folgendes umgestellt, um Zellbestandteile, die beim Einfrieren platzen könnten, herauszufiltern.

Ab dem 01.09.2012 wurden die Proben bereits vor dem Einfrieren bei -80°C zehn Minuten mit 3068g bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge R 5810 R, Eppendorf).

Der Überstand wurde in drei Aliquots á 5ml überführt und für die weitere Analyse bei -80°C gelagert.

Um den Einfluss der Aufbereitungsmethode auf die Konzentrationen von LRG in den Urinproben als systematischen Fehler ausschließen oder quantifizieren zu können, wurden in der Übergangszeit je drei Aliquots nach dem ersten und nach dem zweiten standardisierten Prozedere verarbeitet. Anhand der doppelten Verarbeitung konnten später die beiden Protokolle miteinander verglichen werden.

Die Aliquots wurden mit einer Studiennummer versehen, damit nicht direkt auf die Identität des Spenders zurückgeschlossen werden konnte.

## 2.5 Probenvorbereitung

Die Messung der LRG-Konzentration der nach oben genanntem Protokoll vorbereiteten Proben erfolgte als Auftrag durch das Biologisch-Medizinische-Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf. Der Vollständigkeit halber ist im Folgenden das von den Kollegen zur Verfügung gestellte Protokoll der weiteren Prozessierung der Proben für die Messung, sowie der Algorithmus der eigentlichen Messung beschrieben.

Der Urin von Kindern mit unklaren abdominellen Schmerzen wurde für 5 Minuten bei 1000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend eine Stunde lang bei 14,000g und 4°C in Ultrafiltrationseinheiten mit 3kDa Ausschlussgröße (Millipore) konzentriert. 400µl einer wässrigen Lösung aus 8M Harnstoff und 50mMTris (pH 7,4) wurden hinzugegeben und in der Filtrationseinheit für 60 Minuten bei 18°C und 14,000g zentrifugiert. Konzentrierte Proteine wurden reduziert, indem 100µl Reduzierungspuffer (10mM DTT, 8M Harnstoff, 50mMTris, pH 7,4) für 45 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt wurden. Um Thiole zu alkylieren, wurden 10µl eine Alkylierungslösung (0,55M Iodacetamid, 8M Harnstoff, 50mMTris, pH 7,4) hinzugefügt und die Probe im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten bei 18°C und 14,000g zentrifugiert. 300µl Verdaupuffer (wässrige Lösung von 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) wurden hinzugefügt und die Probe erneut für 45 Minuten bei 18°C und 14,000g konzentriert. Dieser Schritt wurde mit 400µl Verdaupuffer und 60 Minuten Zentrifugationszeit wiederholt. Die Proteinkonzentration der Probe wurde mit dem 660nm Protein Assay (Piere/Thermo Scientific) bestimmt. 1,5µg Protein wurde in einem Gesamtvolumen von 20,9µl Verdaupuffer mit 0,03µg Trypsin bei 37°C über Nacht verdaut. Anschließend wurde der Verdau gestoppt, indem 69,1µl 0,1%ige Trifluoressigsäure zugegeben wurden. Nach der Zugabe von schweren Peptiden (Anhang 2) wurde die Peptidmischung mit einer Oasis HLB µElution Plate (Waters) gereinigt. Hierfür wurde das mitgelieferte Protokoll des Herstellers verwendet. Die eluierten Peptide wurden mittels Vakuumkonzentrierung getrocknet und erneut in einer wässrigen Lösung aus 0,1% Trifluoressigsäure gelöst. 200ng der Peptidmischung wurden mittels quantitativer Massenspektrometrie analysiert.

## 2.6 Massenspektrometrie:

Für die Massenspektrometrie wurden ein zielgerichteter Ansatz gewählt, bei dem die LRG-spezifischen Peptide DLLLPQPDLR, GQTLAVAK und VAAGAFQGLR sowie mit schweren Isotopen markierte Standardpeptide mit gleicher Sequenz quantifiziert wurden. Die Peptidmischung aus dem tryptischen Verdau wurde mit dem UHPLC System UltiMate 3000 RSLCnano in Kombination mit dem TSQ Vantage Triplequadrupole Massenspektrometer (beide Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) analysiert. Die Peptide wurden in einer Geschwindigkeit von 20µl/min auf eine Acclaim PepMap100 Trap-Säule (3µm C18 Partikel Größe, 100 Å Porengröße, 75µm innerer Durchmesser, 2cm Länge, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) vorkonzentriert. Die Peptide wurden unter Nutzung von 0,1% (v/v) TFA als mobiler Phase über eine 20-minütigen Gradienten (5%-30% B, hierbei ist Lösung A 0,1% Ameisensäure in Wasser, und Lösung B 80% Azetonitril, 10% Trifluoroethanol, 0,1% Ameisensäure in Wasser) bei einer

Flussgeschwindigkeit von 20µl/min aufgetrennt. Hierfür wurde eine Säule mit 75µm innerem Durchmesser, 15cm Länge, 2µm C18 Partikelgröße (AcclaimPreMap RSLC, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) genutzt. Das TSQ Vantage-Massenspektrometer wurde im Positivmodus betrieben und die Proben wurden in das Massenspektrometer injiziert. Es wurden sowohl im ersten als auch im dritten Quadrupol eine Auflösung von 0,7 u FWHM verwendet. Die Messzykluszeit war 1 Sekunde (Messzeit >50ms für jeden Übergang). Im Q2 wurden die Peptide mit Hilfe von Argon Gas mittels kollisions-induzierten Dissoziierungen fragmentiert. Für jedes Peptid wurde eine spezifische Kollisionsenergie gewählt. Durch die Wahl des „iSRM“ Modus wurden drei primäre und zwei sekundäre Fragmentationen analysiert. Die analysierten Peptide und Übergänge sind in Anhang drei zusammengefasst.

## 2.7. Statistische Analyse

Die Rohdaten der Massenspektrometrie wurden mit PinPoint 1.3 (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde auf unter 10 gesetzt. Generell wurden je drei Übergänge pro leichte und schwere Peptidform für die Summierung der Peakfläche verwendet. Ionenchromatogramme wurden manuell inspiziert, Fehler in der peak-Erkennung korrigiert und Messungen mit offensichtlichen Interferenzen entfernt. Peakflächen wurden exportiert und anschließende Rechnungen wurden mit „R“ Version 3.1.1 (R Core team 2014, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) durchgeführt.

Das Limit der Quantifizierung wurde auf der Peakfläche kalkuliert. Hierfür wurde die Methode „*blank and low concentration sample*“ verwendet [99].

Die Flächenwerte der schweren Peptide wurden für die Normalisierung der individuellen Proben verwendet. Für individuelle Peptide wurde der Quotient der mittleren Fläche aller Proben und dem schweren Kanal von Messungen individueller Proben gebildet. Das Signal des leichten Kanals wurde mit diesem Quotienten multipliziert. Für die Berechnung der absoluten Peptidmenge

wurden Standardkurven generiert, indem eine komplexe Urin-Protein-Matrix, vergleichbar mit der individuellen Patientenprobe, mit verschiedenen Mengen an schwerem Peptid versetzt wurde (von 0,0195fmol bis 160fmol). Die Absolutwerte wurden mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells, unter Verwendung der Kehrwerte der Mengen schwerer Peptide als Gewichten bestimmt.

Da die berechneten absoluten Peptidmengen eine leichten Bias zeigten, der durch unterschiedliche Spaltungseffizienz des Trypsinverdau an verschiedenen Positionen an LRG oder prä- oder posttranslationaler Proteinverarbeitung zurückzuführen sein könnte, wurden die absoluten Mengen der Peptide vor Berechnung der absoluten Proteinmenge normalisiert. Zuletzt wurde die absolute Proteinmenge als Mittelwert aller ihm zugehörigen Peptide berechnet. Proteine die eine CV >100% zeigten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Diagnose der Patienten wurde nach der Messung in Relation zu den LRG-Werten gesetzt. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von „R“ sowie Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Sie erfolgte mit Unterstützung der Mitarbeiter des BMFZ. Es wurde ein zweiseitiger T-Test mit unverbundenen Stichproben durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Oktober 2012 bis April 2013 wurden 200 pädiatrische Patienten in die Studie aufgenommen. Hiervon waren 91 (45,5%) Jungen und 109 (54,5%) Mädchen. Es zeigte sich eine normalverteilte Altersstruktur mit einem mittleren Alter von 11 Jahren und 1 Monat (s. Tabelle 1). Die jüngsten Patienten waren 2 Jahre und 6 Monate alt; der älteste Patient war 17 Jahre und 10 Monate alt.

Alter (J)	1-3	3-5	5-7	7-9	9-11	11-13	13-15	15-17	>17
<b>m(n)</b>	1	9	9	14	17	18	12	8	3
<b>w(n)</b>	2	3	6	13	24	18	20	17	6
<b>Gesamt</b>	3	12	15	27	41	36	32	25	9

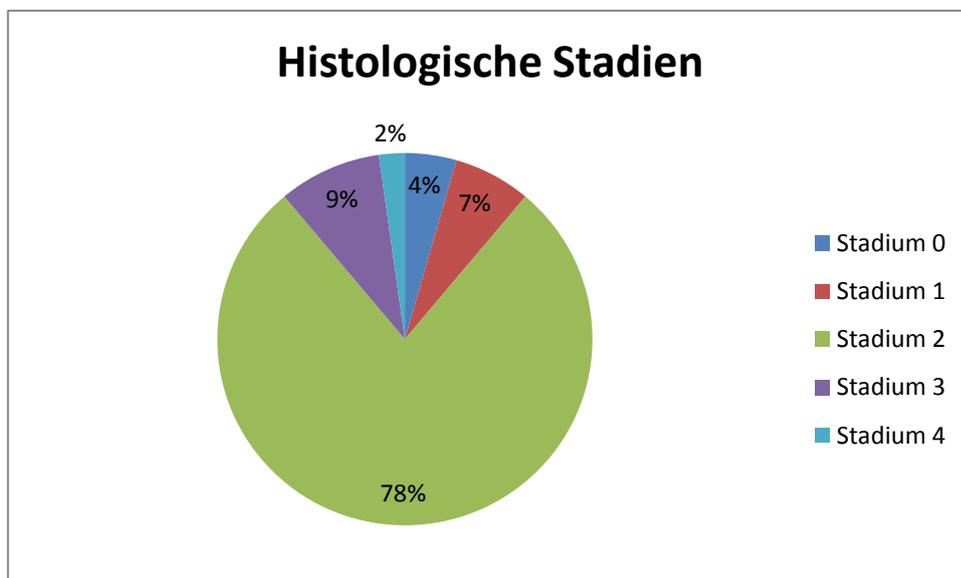
Tabelle 1 Alter und Geschlechterverteilung

### 3.2 Patienten mit Appendizitis

Von den 200 Patienten wurden 45 (22,5%) einer Appendektomie unterzogen. Hiervon waren 24 (53,3%) Jungen und 21 (46,7%) Mädchen. Die Operationspräparate wurden histologisch aufgearbeitet. Zwei (4%) der Patienten zeigten eine gesunde Appendix nach Appendektomie und sind somit als negative Appendektomierate zu bezeichnen.

Es wurden fünf histopathologische Stadien anhand der Befunde hiesiger Pathologen eingeteilt. Diese waren diskret abweichend gegenüber den oben beschriebenen Lehrbuchstadien. Stadium null bezeichnete eine gesunde Appendix ohne Hinweis auf entzündliche Veränderungen. Stadium eins kennzeichnete eine beginnende Appendizitis mit lymphofollikulärer Hyperplasie bei Koprostase. Im Stadium zwei zeigte sich eine ulzero-phlegmonöse

Appendizitis und Periappendizitis mit fibrinös eitriger Peritonitis. Die Gruppe drei umfasste Patienten mit fokal perforierter Appendizitis und fibrinös-eitriger Peritonitis, bzw. perityphlitischem Abszess. Ebenfalls umfasste sie solche mit schwerer ulzero-phlegmonöser Appendizitis und fibrinös-eitriger Peritonitis. Das Stadium vier beinhaltete einen Patienten mit perforierter, zum Teil gangränöser, phlegmonös-eitriger Appendizitis und fibrinös-eitriger Periappendizitis. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der histologischen Befunde. 78% der Patienten entfielen auf ulzero-phlegmonöse Appendizitiden (Stadium 2). Stadium eins und drei machten jeweils 7 und 9% der Fälle aus.

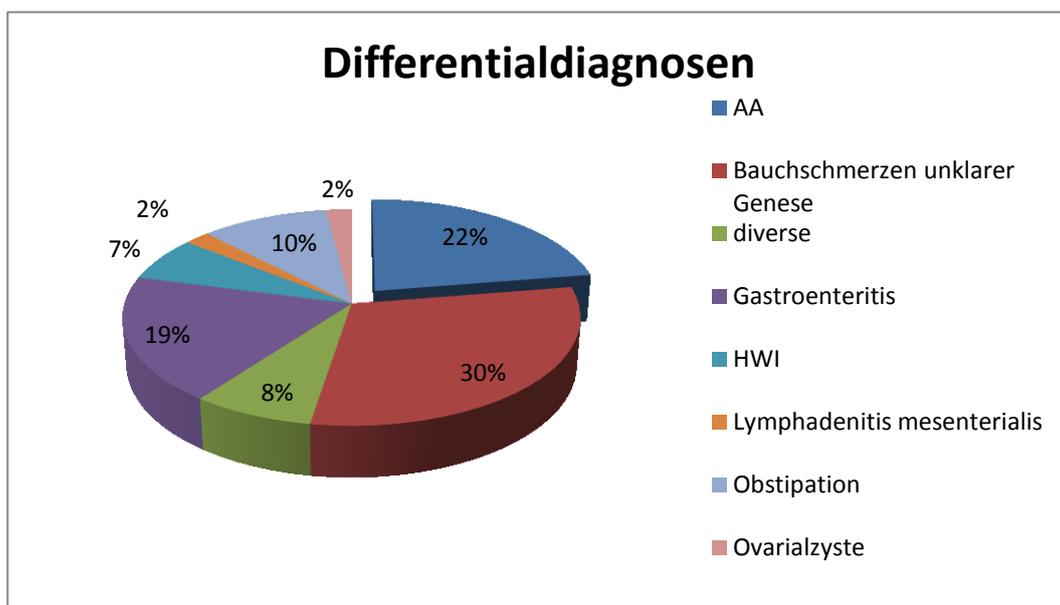


**Abbildung 3** Verteilung der histologischen Stadien

### 3.3 Differentialdiagnosen

Abbildung 3 zeigt die bei den Probanden gestellten Enddiagnosen. Bei 22% aller Patienten wurde eine akute Appendizitis diagnostiziert. Die mit 30% größte Gruppe der Patienten wurde mit der Diagnose „Bauchschmerzen unklarer Genese“ entlassen. In diesen Fällen konnte keine eindeutige Ursache

festgelegt werden. Patienten der nächstgrößeren Gruppe litten unter einer Gastroenteritis (19%). Auch Harnwegsinfekte und Obstipation waren mit 7% und 10% häufige Konsultationsanlässe bei akutem Bauchschmerz. Je 2% der Fälle litten unter einer Lymphadenitis mesenterialis oder unter Ovarialzysten. Unter der Gruppe „Diverses“ (8%) wurden Erkrankungen zusammengefasst, die keiner anderen Gruppe zuzuweisen waren. Sie umfasste je zwei Fälle von Purpura Schönlein Hennoch, obstruktiver Bronchitis und Pneumonie, sowie je einen Fall von Angina tonsillaris, ketoanämischem Erbrechen, Yersiniose bei Gastroenteritis, einer metabolischen Entgleisung bei Ahornsirupkrankheit, einer Bewusstseinsstrübung unbekannter Genese, Migräne, Cholezystolithiasis, einen Fall von Ileitis terminalis und einen Verdacht auf Zöliakie.



**Abbildung 4 Differentialdiagnosen akuter abdominaler Schmerz bei Kindern, AA = akute Appendizitis; HWI= Harnwegsinfekt;**

### 3.4 Klinische Parameter

Bei Aufnahme wurden Daten zu Anamnese, klinischer Untersuchung und laborchemischen Untersuchungen erhoben.

Die Schmerzdauer wurde bei 192 Patienten erfasst. Es wurden die Intervalle bis zwölf Stunden, bis 24 Stunden, bis zwei Tage, bis vier Tage, bis sieben Tage und mehr als sieben Tage gewählt (s. Abbildung 5). Von den Kindern mit akuter Appendizitis hatten 27,3% (n=12) der Fälle weniger als zwölf Stunden und 36,4% (n=16) weniger als 24 Stunden abdominelle Schmerzen. Somit hatten 63,7% (n=28) der Kinder mit Appendizitis maximal 24 Stunden abdominelle Schmerzen. 27,3% (n=12) der erkrankten Kinder erlebten Schmerzen bis zu zwei Tage. Auf den Zeitraum bis vier, beziehungsweise mehr als sieben Tage entfielen jeweils 4,5% (n=2) der Appendizitiden.

In der Gruppe der Kinder die keine Appendizitis hatten, litten 29,8% (n=45) der Kinder weniger als zwölf Stunden unter abdominellen Beschwerden. Weitere 23,2% (n=35) hatten die Bauchschmerzen bereits seit 24 Stunden. Somit hatten 53% (n=80) der Nicht-Appendizitis Kinder maximal 24 Stunden Beschwerden, bevor sie sich in der Notfallambulanz vorstellten. 10,5% (n=16) der Kinder hatten bis zu zwei Tage Bauchschmerzen. Weitere 15,9% (n=24) bis zu vier Tage. 8% (n=13) und 11,9% (n=18) der Kinder hatten bis zu sieben beziehungsweise mehr als sieben Tage Bauchschmerzen.

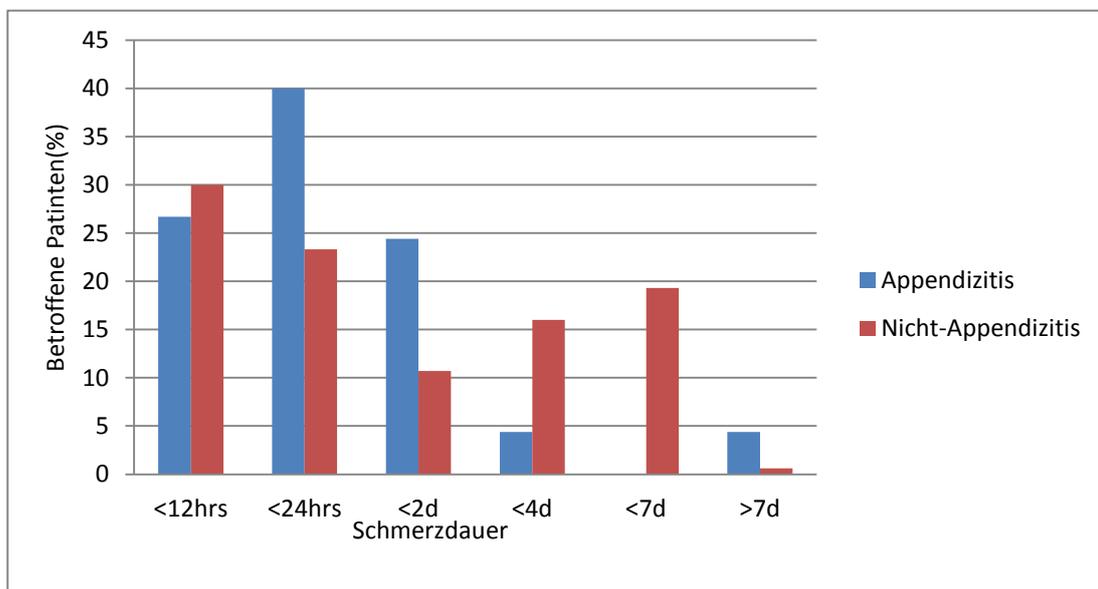


Abbildung 5 Schmerzdauer der Patienten mit Appendizitis (blau) und ohne Appendizitis (rot), hrs= Stunden, d= Tage

Bei dem Parameter Übelkeit konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Appendizitis- und Nicht-Appendizitisgruppe festgestellt werden.

Ein hochsignifikanter Unterschied mit  $p < 0,01$  zeigte der Vergleich zwischen Appendizitis- und Nicht-Appendizitis-Kollektiv für den Parameter Erbrechen.

Der Vergleich der Parameter Schmerzwanderung, Schmerzen im rechten Unterbauch und kontralateraler Loslassschmerz bei beiden Gruppen war höchstsignifikant mit  $p < 0,001$ .

Ebenfalls höchstsignifikant mit  $p < 0,001$  war der Unterschied der Appendizitis und Nicht-Appendizitis-Gruppe für Laborparameter Leukozytose, mit über 10.000/ $\mu$ l Blut und CRP –Werte über 0,5mg/dl.

Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Parameter Erbrechen und Übelkeit (s. Tabelle 2).

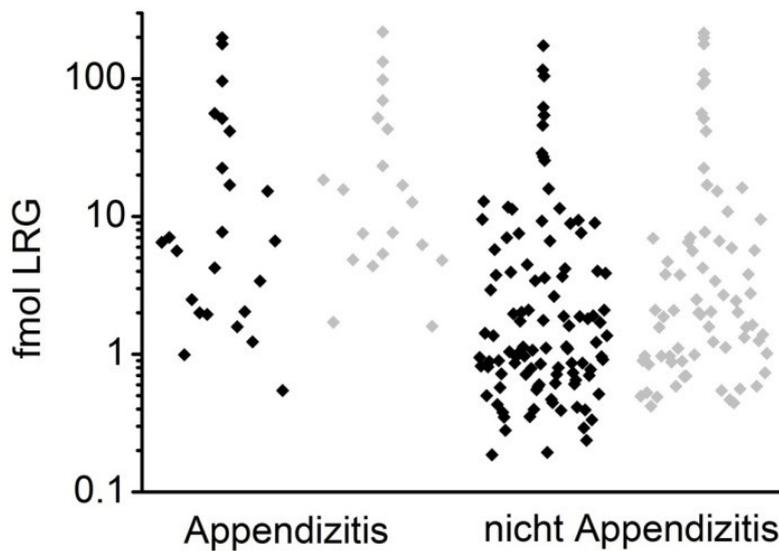
### 3.5 Quantifizierung von Leucin-rich-alpha2-glycoprotein

LRG wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie durch das Biologisch-Medizinische Forschungslabor (BMFZ) der Universität Düsseldorf quantifiziert. Es wurde der Mittelwert aus drei verschiedenen Peptiden gebildet. Im Folgenden wird die LRG-Menge auf 200ng Gesamtprotein im Urin angegeben. Die Bezeichnung Konzentration bedeutet eigentlich Menge pro Volumen. Aus sprachlichen Gründen wird der Begriff Konzentration hier dennoch für die LRG-Menge verwendet.

Parameter	AA(+)	NAA(+)	Sensitivität	Spezifität	p-Wert
	AA(-)	NAA(-)			
<b>Schmerzwanderung</b>	18	23	0,51	0,82	0,0001
	17	106			
<b>Erbrechen</b>	25	55	0,69	0,59	0,0027
	11	79			
<b>Übelkeit</b>	26	66	0,67	0,55	0,0190
	13	80			
<b>Druckschmerz rechter Unterbauch</b>	40	98	0,93	0,33	<0,0001
	3	49			
<b>Kontralateraler Loslassschmerz</b>	35	26	0,85	0,81	<0,0001
	3	114			
<b>Leukozytose &gt;10.000/µl</b>	29	32	0,71	0,66	<0,0001
	12	63			
<b>CRP &gt;0,5mg/dl</b>	10	62	0,24	0,33	<0,0001
	31	31			

**Tabelle 2 Sensitivität, Spezifität und p-Werte klinischer und laborchemischer Parameter (AA=Akute Appendizitis, NAA=keine akute Appendizitis, + positiver klinischer Befund, - negativer klinischer Befund)**

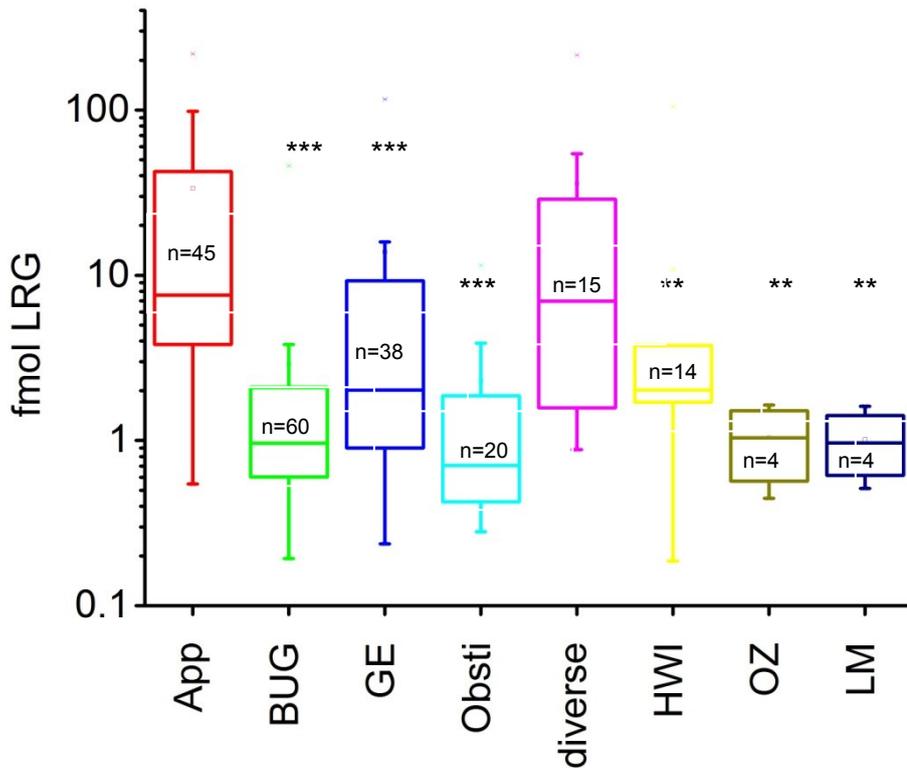
Zunächst wurde überprüft, ob die unterschiedlichen Studienprotokolle zur Aufarbeitung der Urinproben (s. Material und Methoden) zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Dieselbe Probe wurde jeweils nach der ersten und zweiten Aufbereitungsmethode gemessen. Die Konzentrationen werden in Abbildung 6 verglichen. Die grauen Punkte, die für das neue Studienprotokoll stehen, zeigen eine übereinstimmende Verteilung mit den schwarzen Punkten, die das alte Studienprotokoll abbilden.



**Abbildung 6** Logarithmierte Konzentration von LRG bei Appendizitis und nicht Appendizitis  
 Vergleich des ersten (schwarz) mit dem zweiten (grau) Studienprotokoll ; fmol = femtomol

Die Kastengrafik in Abbildung 7 zeigt die logarithmierten LRG-Konzentrationen in Bezug auf die verschiedenen Krankheitsbilder. Der umrandete Bereich umfasste 50% aller gemessenen Werte. Die Bandbreite der gemessenen Konzentrationen, dargestellt durch die vertikalen Striche ober- und unterhalb der Kastengrafik werden als Antennen bezeichnet. Sie zeigten Überschneidungen der LRG-Konzentrationen über alle Diagnosegruppen hinweg. Kinder mit Bauchschmerzen unklarer Genese, Obstipation, Ovarialzysten und Lymphadenitis hatten geringere Mittelwerte, als die Appendizitiskohorte. Die Kastengrafiken dieser Gruppen überschneidet sich nicht mit der der Appendizitiskohorte. Es zeigten sich jedoch im Bereich der Antennen für Maximal- und Minimalwerte Überschneidungen mit den Konzentrationen für die Appendizitisgruppe. Für die Patientengruppen „Diverse“, Gastroenteritis, Harnwegsinfekte und Obstipation zeigten sich bereits Überschneidungen der Kastengrafik, die die Hälfte der Werte der jeweiligen Gruppen darstellten.

Bis auf die Patientengruppe der „Diversen“ Erkrankungen waren alle Unterschiede signifikant gegenüber der Appendizitisgruppe (s. Abbildung 5).



**Abbildung 7** Kastengrafik der logarithmierten Konzentration von LRG in fmol=femtomol/l für App=Appendizitis, BUG=Bauchschmerzen unklarerer Genese, GE=Gastroenteritis, Obsti=Obstipation, diverse, HWI=Harnwegsinfekt, OZ=Ovarialzyste und LM=Lymphadenitis mesenterialis; n=Anzahl der Patienten der jeweiligen Gruppe, \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p \leq 0,001$ ; alle Signifikanzwerte beziehen sich auf den Vergleich mit AA

Der Mittelwert des LRGs bei allen Patienten betrug 13,44fmol/200ng Protein. Das Minimum betrug hierbei 0,19fmol/200ng Protein. Der Maximalwert lag bei 218,67 fmol/200ng Protein.

Der Mittelwert von LRG in der Appendizitiskohorte betrug 33,56fmol/200ng Protein. Die Patientengruppe „Diverse“ Erkrankungen wies einen höheren Mittelwert von 35,83fmol/200ng Protein auf. Alle weiteren Patientengruppen zeigten niedrigere Mittelwerte als den der Appendizitiskohorte (s. Tabelle 3).

Die niedrigsten Mittelwerte ergaben sich für die Patientengruppen mit Ovarialzysten oder Lymphadenitis mesenterialis mit 1,04 und 1,01fmol/200ng Protein.

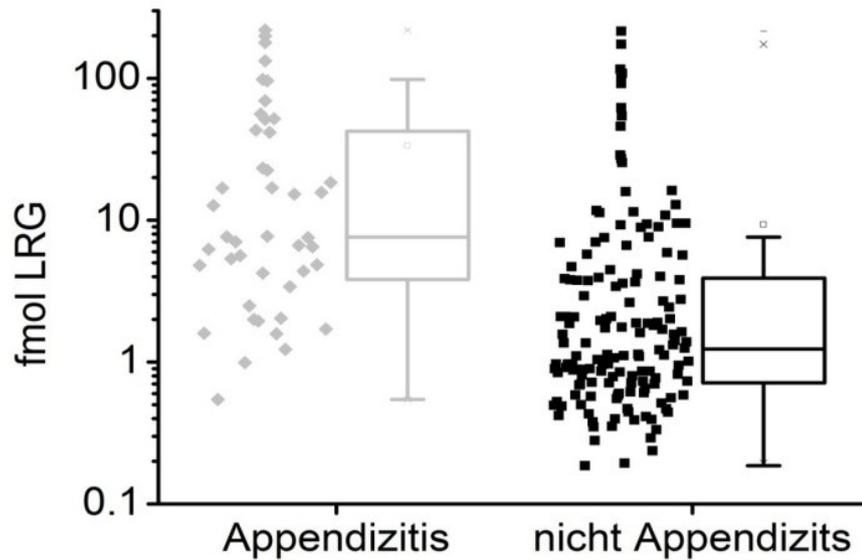
Diagnose	Mittelwert in fmol/200ng Protein	SD (+/-)
<b>Appendizitis</b>	33,6	54,2
<b>Nicht-Appendizitis allgemein</b>	9,8	28,4
<b>Unklare Bauchschmerzen</b>	2,9	6,4
<b>Gastroenteritis</b>	14,5	29,8
<b>Harnwegsinfekt</b>	10,8	28,4
<b>Obstipation</b>	2,3	3,5
<b>Lymphadenitis mesenterialis</b>	1,0	0,5
<b>Ovarialzyste</b>	1,0	0,6
<b>Diverse</b>	35,8	66,6

Tabelle 3 Mittelwerte LRG nach Krankheitsgruppen; fmol=femtomol, ng=nanogramm, SD= Standardabweichung

Anschließend wurden die LRG-Konzentrationen aller Patienten ohne Appendizitis gegen die Konzentration der Patienten mit Appendizitis graphisch aufgetragen. Abbildung 8 zeigt die logarithmierten Werte der LRG-Konzentration als Kastengrafik und als Punktwolke. Die LRG-Konzentrationen der Kinder mit Appendizitis (grau) wurden gegen die der Kinder ohne Appendizitis (schwarz) aufgetragen. Der Mittelwert der Appendizitiskohorte lag mit 33,6fmol/200ng Protein über dem der Nicht-Appendizitisgruppe mit 9,8 fmol/200ng Protein. Die Kastengrafik umfasste 50% aller gemessenen Werte und zeigte eine geringe Überschneidung zwischen beiden Gruppen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ).

Die Bandbreite der gemessenen Konzentrationen, dargestellt durch die vertikalen Striche ober- und unterhalb der Kastengrafik zeigen eine breite

Schnittmenge. Insgesamt liegt die Kastengrafik der Kinder ohne Appendizitis in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als die der Appendizitiskohorte.



**Abbildung 8** Kastengrafik und Punktelcke der LRG-Konzentrationen für die Appendizitis- und nicht-Appendizitis-Kohorte

Abbildung 9 zeigt ebenfalls einen Vergleich der LRG-Konzentrationen zwischen der Appendizitisgruppe mit der Nicht-Appendizitisgruppe. Hierbei wurden die Patienten mit Harnwegsinfekten ausgeschlossen und separat dargestellt. Die Punktelcke der Patienten mit Harnwegsinfektionen deckte einen vergleichbaren Umfang ab, wie die Punktelcke der Patienten mit nicht-Appendizitis-Erkrankungen. Der Mittelwert der Harnwegsinfekte war größer, als der der Nicht-Appendizitis Gruppe. Der Unterschied war hochsignifikant mit  $p < 0,01$ .

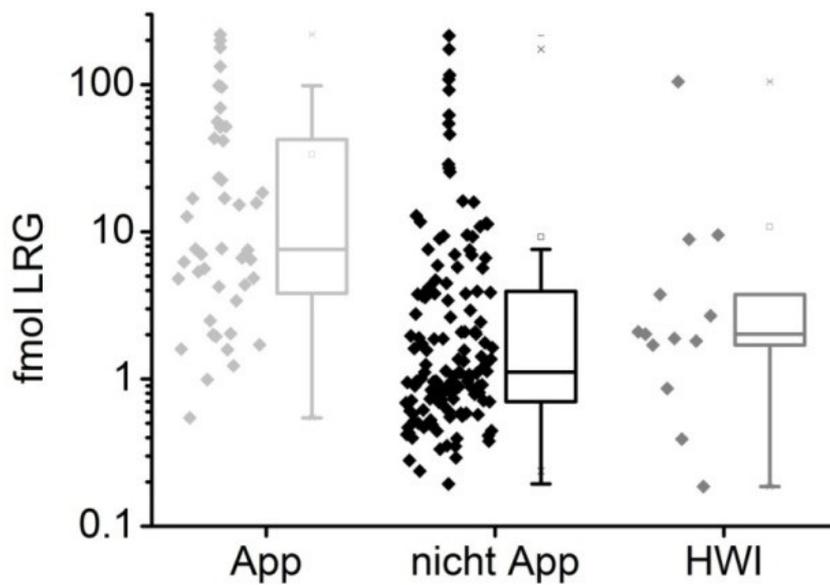


Abbildung 9 LRG für Appendizitis (App), nicht Appendizitis (ohne HWI) und Harnwegsinfekte (HWI)

Die Darstellung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen LRG-Peptide wurde in Form einer *Receiver-Operator-Characteristics-Curve* (ROC-Kurve = Grenzwertoptimierungskurve) durchgeführt.

Die ROC-Kurven in Abbildung 10 zeigen die Sensitivität und Spezifität der einzelnen LRG-Peptide sowie die des daraus gemittelten Proteins. Insgesamt ergab sich eine *Area under the Curve* von 0,803. Die einzelnen Peptide zeigten minimale Unterschiede hinsichtlich ihrer Eignung als Marker.

Der Scheitelpunkt (\*) der Kurve zeigt den Punkt an, bei dem der Quotient aus Sensitivität und 1-Spezifität den höchsten Wert erreichte. An diesem Punkt bestand eine Sensitivität von 0,773 bei einer Spezifität von 0,695. Der positive prädiktive Wert betrug hier 0,42. Der negative prädiktive Wert betrug 0,915. Die Konzentration betrug hier 2,92fmol/200ng Protein.

## ROC Kurve LRG

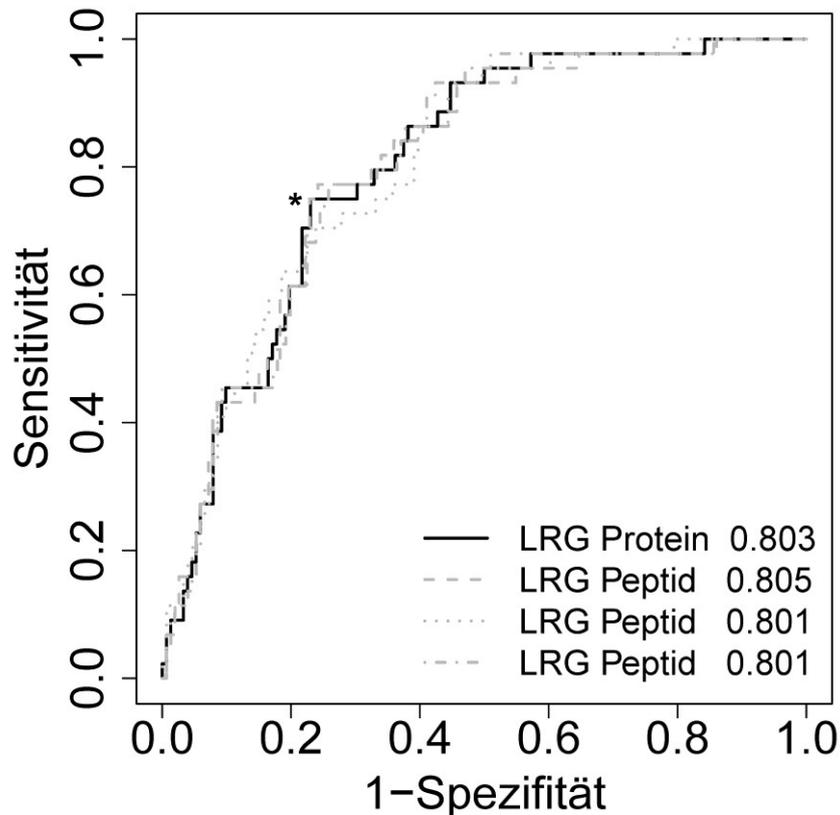


Abbildung 10 ROC-Kurve LRG-Peptide und gemittelt LRG-Protein, \* = Scheitelpunkt der Proteinkurve (Punkt der höchsten gemeinsamen Sensitivität und Spezifität)

Da im klinischen Alltag nicht nur die Konzentration eines Markers zur Diagnosestellung hinzugezogen wird, wurde LRG mit klinischen Parametern hoher Sensitivität und Spezifität kombiniert und eine neue AUC generiert (s. Abbildung 11). Die Kombination von Druckschmerz im rechten Unterbauch mit LRG führte zu einer Vergrößerung der Fläche auf 0,834. Die Kombination von LRG mit kontralateralem Loslassschmerz führte zu einer Vergrößerung der *Area under the Curve* auf 0,921.

Der Parameter Leukozytose zeigte eine AUC von 0,724. Die CRP-Konzentration über 0,5mg/dl führte zu einer AUC von 0,766 (s. Abbildung 11).

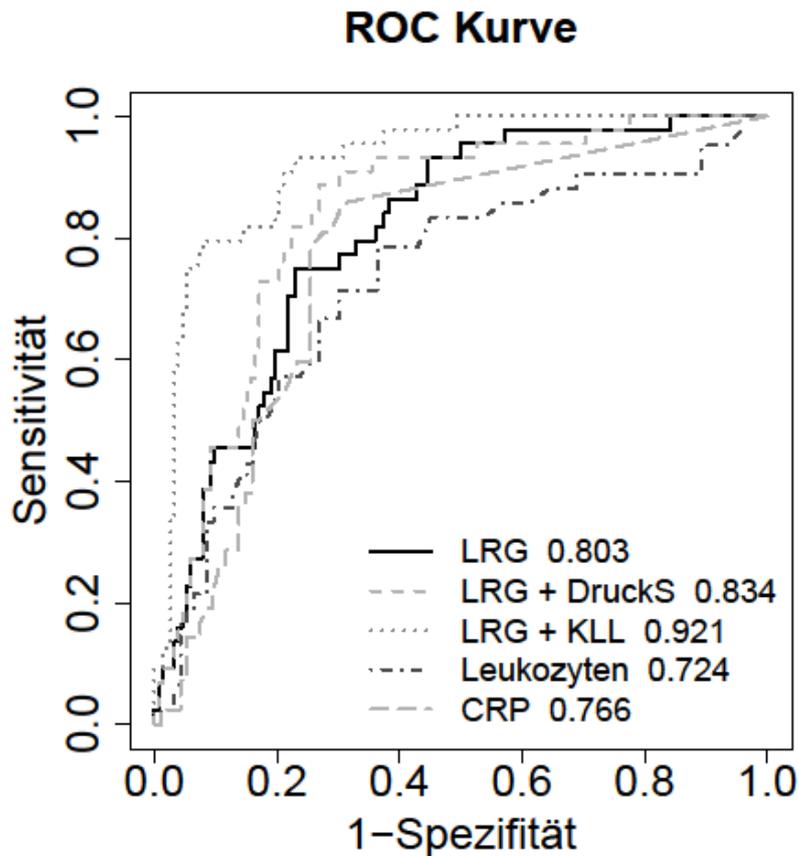


Abbildung 11 Receiver-Operator-Characteristics von LRG, LRG in Kombination mit Druckschmerz im rechten Unterbauch (DruckS), Kontralateralem Loslassschmerz (KLL), sowie ROC-Kurven bei denen die Leukozytose und die CRP-Konzentration als Marker untersucht wurde

Ebenfalls wurde die Konzentration des LRG bei Kindern mit Appendizitis in Relation zu der Schwere der Erkrankung gesetzt. Abbildung 12 zeigt die Punktwolken der einzelnen Schweregrade der Appendizitis mit den entsprechenden Konzentrationen des LRG. In der Gruppe der histologisch als Nicht-Appendizitis gesicherten Gruppe (Stadium null) an Patienten zeigte sich eine Varianz von 0,54 bis 0,97fmol/200ng Protein. Die Unterschiede der LRG-Konzentrationen der verschiedenen Schweregrade zeigten keine signifikanten Unterschiede.

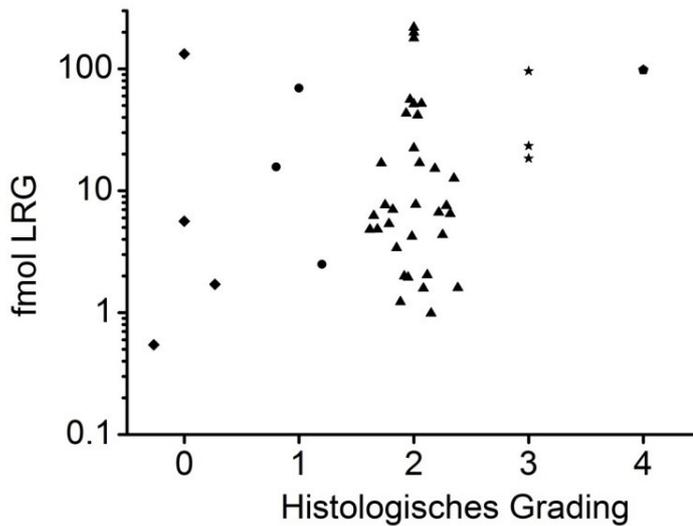


Abbildung 12 LRG-Konzentration im Vergleich zu histologischem Grading. 0=keine Appendizitis, 1= beginnende Appendizitis, 2=ulzerophlegmonöse Appendizitis 3= schwere ulzerophlegmonöse Appendizitis 4=Perforierende Appendizitis. Die Konzentrationsunterschiede der verschiedenen Schweregrade waren nicht statistisch signifikant.

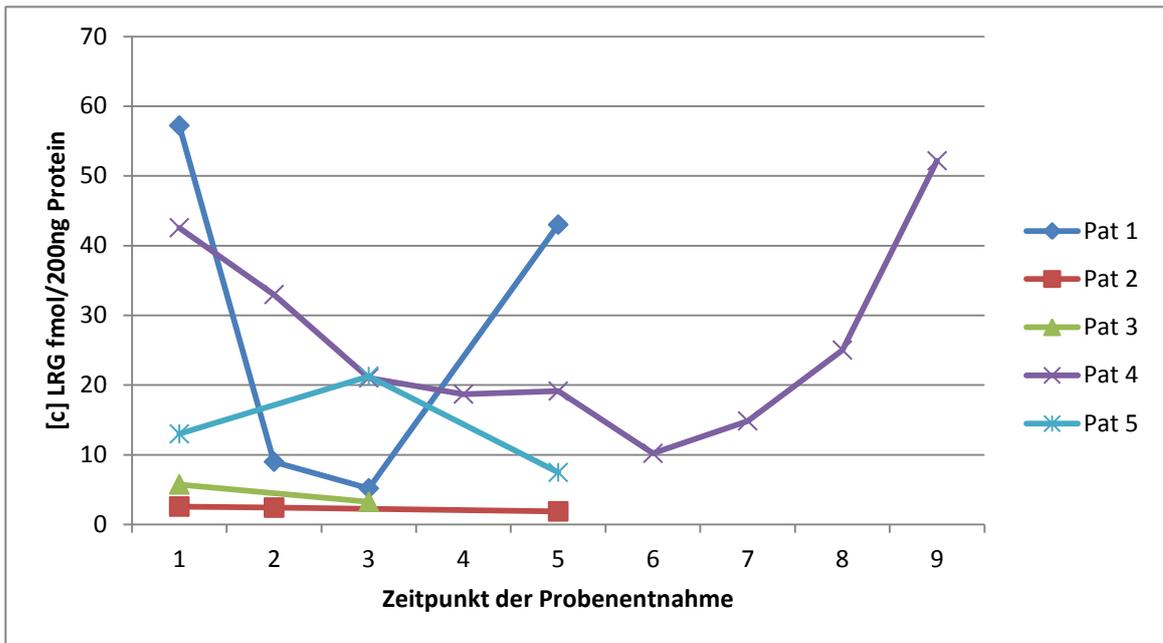
### 3.6. LRG-Konzentration im Krankheitsverlauf

Bei fünf Patienten mit akuter Appendizitis konnten Urinproben über mehrere Tage gewonnen werden. Die Proben wurden vor (\*) und nach Appendektomie erhoben. Auf Grund der geringen Patientenzahl ist eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich.

Patient	Datum	[c]LRG fmol/200ng Protein	OP-Datum	Grading
<b>Pat. 1</b> <b>m , 9,17 J</b>	17.1.12 *	57,21	18.1.2012	2
	17.1.12	8,98		
	18.1.12	5,16		
	19.1.12	43,00		
<b>Pat 2</b> <b>w, 13,29 J.</b>	10.3.12 *	2,54	10.3.2012	1
	12.3.12	2,4		
<b>Pat 3</b> <b>m, 8,23 J.</b>	23.4.12	5,73	Konservativ behandelt	-
	25.4.12	3,52		
<b>Pat. 4</b> <b>w, 9,99 J.</b>	9.5.12(früh) *	42,3	09.5.2012	2
	9.5.12(spät)	32,97		
	10.5.12(früh)	21,01		
	10.5.12(spät)	18,68		
	11.5.12(früh)	19,12		
	11.5.12(spät)	10,19		
	12.5.12(früh)	14,85		
	12.5.12(spät)	26,01		
13.5.12(früh)	52,16			
<b>Pat. 5</b> <b>w, 8,39 J.</b>	4.3.13 *	12,48	04.3.2013	2
	5.3.13	21,26		
	6.3.13	7,45		

**Tabelle 4 Verlaufspatienten, Probenentnahmedatum mit LRG-Konzentration [c], fmol = femtomol. ng= nanogramm, Operationsdatum und histologischem Grading, \* = Probenentnahme vor Operation**

Zu sehen sind schwankende Konzentrationen von LRG in den Tagesverläufen. Der dritte Patient erhielt eine konservative Behandlung, wodurch keine Unterscheidung in prä – und postoperative Werte möglich war (s. Tabelle 4 und Abbildung 13). Abbildung 13 zeigt die Verläufe der Konzentrationen von LRG an verschiedenen Tageszeitpunkten. Bei zwei Patienten war eine Tendenz zur Abnahme von LRG sichtbar. Bei den übrigen zwei Patienten zeigte sich zunächst eine Abnahme, dann jedoch einen erneuten Anstieg der LRG-Konzentration.



**Abbildung 13 Verlaufspatienten, Zeitpunkt der Probenentnahme 1 (=erster Tag früh), 2 (=erster Tag spät), 3 (=zweiter Tag früh), 4 (=zweiter Tag spät), 5 (=dritter Tag früh), 6 (=dritter Tag spät), 7 (=vierter Tag früh), 8 (=vierter Tag spät), 9 (=fünfter Tag früh) und Konzentration [c] von LRG**

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Diagnostik der pädiatrischen Appendizitis ist für Kliniker nach wie vor mit Unsicherheiten belastet. Es gibt bis heute keine eindeutigen Parameter, die mit ausreichender Sensitivität und Spezifität eine genaue Zuordnung von Patienten als erkrankt oder nicht erkrankt zulassen [2, 100, 3, 7]. In der vorliegenden Studie wurde die Eignung von in Urin bestimmtem LRG als Marker in der Diagnostik der akuten Appendizitis an 200 Kindern untersucht. Hierfür wurden Kinder im Alter von 2 Jahren und 6 Monaten bis 17 Jahren und 9 Monaten, die sich mit akuten abdominellen Beschwerden vorstellten, klinisch untersucht und Urinproben entnommen. Die Sensitivität und Spezifität verschiedener klinischer Symptome, sowie laborchemischer Parameter wurde berechnet. Unter den klinischen Parametern zeigte der kontralaterale Loslassschmerz die höchste Sensitivität (0,85) und Spezifität (0,81). Die Bestimmung von CRP aus dem Blut der Patienten war nur mit geringer Sensitivität und Spezifität verbunden (Sens: 0,24; Spez: 0,33).

Mittels Massenspektrometrie wurde die Konzentration von LRG in den Urinproben bestimmt. Eine Auswertung bezogen auf die Krankheitsbilder und Differentialdiagnosen der Appendizitis wurde durchgeführt. Es zeigte sich ein signifikant erhöhter Mittelwert für LRG (33,56fmol/200ng Protein/9,8fmol/200ng Protein) in den Urinproben der Patienten mit akuter Appendizitis. Gleichzeitig konnten breite Überschneidungen in der Varianz der Konzentrationen von Kindern mit und ohne Appendizitis gezeigt werden. Außerdem wurde die ebenfalls von Kentsis *et al* vorbeschriebene Korrelation zwischen LRG-Konzentrationen und Schweregrad der Appendizitis überprüft. Eine solche konnte in unserer Studienpopulation nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Der Zeitraum der Probensammlung umfasste sowohl bei Kentsis *et al* als auch in vorliegender Studie zwei Winter, einen Sommer und insgesamt ca. 18 Monate. Somit sind saisonale Erkrankungen in gleichem Maße in beiden Kohorten vertreten. Um saisonale Schwankungen innerhalb eines Jahres einzukalkulieren, sollte in folgenden

Studien darauf geachtet werden, dass die Dauer der Studie möglichst volle Jahre einschließt.

## 4.2 Methodendiskussion

### 4.2.1. Dokumentation

Die Dokumentation der klinischen und laborchemischen Daten erfolgte anhand eines eigens dafür hergestellten Dokumentationsbogens (s. Anhang). Durch den Dokumentationsbogen war eine einheitliche Dokumentation aller Befunde möglich. Da die Studie in einer interdisziplinären Kinderklinik durchgeführt wurde, wo das ärztliche Personal regelmäßig wechselte, waren nicht alle ärztlichen Kollegen in gleichem Maße über die Notwendigkeit der Dokumentation aufgeklärt, so dass in einigen Fällen unvollständige Angaben auf den Dokumentationsbögen vorhanden waren. Somit konnten zwar Angaben zur Sensitivität und Spezifität einzelner Parameter im Hinblick auf eine eventuell vorliegende Appendizitis gewonnen werden, eine vollständige Patientendokumentation jedoch nicht in jedem Fall.

Die histopathologischen Präparate wurden einmalig durch wechselnde Pathologen gesichtet und befundet. Die Reproduzierbarkeit des Befundes konnte somit nicht überprüft werden. Es ist also möglich, dass – vor allem bei grenzwertigen Befunden – ein Zweitprüfer zu einer anderen Einteilung des Präparates gekommen wäre, was zu einer veränderten Eingruppierung in die Stadien geführt hätte. In folgenden Studien sollte die Befundung des Operationspräparates durch mindestens zwei Pathologen erfolgen.

### 4.2.2 Probenentnahme und -verarbeitung

Die Probenentnahme erfolgte in der pädiatrischen Notfallambulanz der Uniklinik Düsseldorf durch das Pflegepersonal, die Eltern der Kinder oder - wenn die Kinder in entsprechendem Alter waren - durch die Kinder selbst. Durch diese Varianz war eine genaue Kontrolle des Abnahmevorgangs nicht in jedem Fall möglich. Es muss davon ausgegangen werden, dass nicht immer sicher Mittelstrahlurin gewonnen werden konnte, wie es das Studienprotokoll vorsah. Durch das Verwerfen des Erststrahlurins, wird eine mögliche Kontamination der Proben durch Bakterien oder andere organische Materialien vermieden [101]. Diese Varianz spiegelt den klinischen Alltag

wieder. Ein optimaler Urin-Marker für Appendizitis sollte also auch unter diesen Bedingungen ausreichend sensitive und spezifische Daten ergeben.

Urin als Untersuchungsmaterial unterliegt gewissen Schwächen. In der Routine-Urindiagnostik hat sich der erste Morgenurin bewährt. Durch die nächtliche Konzentrierung zeigt er verhältnismäßig konstante Eigenschaften (Gewicht, Konzentration, Osmolarität) [101]. Morgenurin ist bei Kindern mit Bauchschmerzen jedoch nicht regelhaft zu gewinnen, da sich die Patienten oft zu späteren Tageszeiten vorstellen. Die Diagnostik bei abdominellen Beschwerden muss zügig vonstattengehen, so dass nicht bis zum nächsten Morgen für die Urinabnahme gewartet werden kann. Durch die Verdünnung nach vermehrtem Trinken, beziehungsweise Konzentrierung nach verminderter Flüssigkeitsaufnahme im Tagesverlauf ist die Bestimmung von Normwerten erschwert. In unserer Studie wurde die Proteinmenge als Maß für die Verdünnung herangezogen und LRG in einer Probe mit 200ng Urinprotein bestimmt, um diesem Bias Rechnung zu tragen.

Die Konzentrationen der Urinbestandteile können durch das Vorliegen weiterer Erkrankungen, zum Beispiel nephrologischer Art verändert sein. Diese Information wurde durch unser Studienprotokoll nicht dokumentiert und ausgewertet, da ein Ziel der Arbeit eine Bewertung der LRG-Konzentration an unselektiertem Patientengut war.

Die genaue Dauer zwischen Urinkollektion und Operationszeit wurde nicht dokumentiert. Näherungsweise kann davon ausgegangen werden, dass die Urinabnahme nach der Erstkonsultation durch den behandelnden Arzt erfolgte. Damit wäre die Urinabnahme ca. innerhalb der ersten Stunde nach dokumentiertem Eintreffen des Patienten erfolgt. Um eine Aussage über die Verwertbarkeit der Proben zu gewinnen wurde anhand dreier Patientenproben der Einfluss auf die Lagerung und die Zeit zwischen Urinkollektion, Verarbeitung und Einfrieren der Probe untersucht. Es ergaben sich keine Unterschiede wenn die Probe zwischen 30 Minuten und 12 Stunden verarbeitet wurde.

Die Modifikation des Studienprotokolls durch Hinzufügen eines Zentrifugationsschrittes vor dem Einfrieren der Probe könnte zu einer außergewöhnlichen Varianz der ersten gegenüber der letzten Werte führen. Die in

der Übergangszeit parallel nach beiden Studienprotokollen entnommenen Proben zeigten jedoch eine gute Übereinstimmung der Messwerte (s. Abbildung 6), so dass ein systematischer Fehler durch die Änderung des Studienprotokolls unwahrscheinlich ist. In folgenden Studien sollte dennoch das zweite Protokoll verwendet werden, da es eine schnellere Vorverarbeitung der Urinprobe vorsieht, bei der Zellen, die durch das Einfrieren platzen und die Zusammensetzung beeinflussen könnten, vorher entfernt werden.

#### 4.2.3 LRG - Quantifizierung

Zu Beginn der Studie wurde versucht mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Cusabio, Catalog No. CSB-E12962h) eine Quantifizierung von LRG in den Urinproben der Patienten durchzuführen. Die mit der ELISA-Methode gemessenen Konzentrationen ergaben scheinbar zufällige Messwerte. Selbst wiederholte Messungen derselben Patientenprobe ergaben stark variierende Werte, so dass von einem prinzipiellen Problem der ELISA-Messung ausgegangen werden musste. Die Literaturrecherche ergab Hinweise auf Interferenzen von LRG in ELISA-Untersuchungen. Die Quantifizierung mittels ELISA hatte sowohl in der Kohorte von Kentsis *et al* als auch in der Studienpopulation von Kharbanda *et al* eine deutliche geringere Aussagekraft (AUC 0,63-0,8) [9, 5] im Vergleich zu den Ergebnissen der Massenspektrometrie. Sie beschrieben bei Verwendung der ELISA-Kits einen paradoxen Anstieg der LRG-Konzentration ab einer 100-fachen Verdünnung und vermuteten Interferenzen [9, 5]. Cummings *et al* beschrieben bereits 2006 Interferenzen zwischen LRG und Cytochrom C in ELISA-Untersuchungen der Seren von Mäusen, Pferden, Kühen und auch Menschen [91]. Auf Grund der nicht verwertbaren Datenlage aus den ELISAs und der Literaturrecherche wurde dieser Ansatz in vorliegender Studie nicht weiter verfolgt und auf die Methode der Massenspektrometrie zur Quantifizierung des LRG gewechselt.

Kentsis *et al* zeigten eine AUC von 0,97-0,99 bei der Bestimmung von LRG mittels Massenspektrometrie [9, 8]. Die Massenspektrometrie ist eine akkurate aber aufwendige Art der Proteinbestimmung. Sie ist nur an wenigen Standorten verfügbar und kostspielig. Die Vorbereitung der Proben und die Benutzung des Massenspektrometers setzte Expertise im Umgang mit derselben voraus. In dieser Studie wurde diese Arbeit durch das Biologisch-Medizinische-Forschungszentrum

der Universität Düsseldorf durchgeführt. Für die technische Reproduzierbarkeit wurden dieselben Proben im Verlauf insgesamt 15-mal gemessen. Es zeigten sich Standardabweichungen vom Mittelwert von 0,8 bis 1,1% je nach Peptid (s. Anhang Scatterplots) nach Normalisierung auf das mit schweren Aminosäuren markierte Referenzpeptid.

Die Untersuchung einer Probe dauerte auf Grund eines Übernachtverdaus mindestens einen Tag. Für die Routineuntersuchung im Krankenhaus ist die Massenspektrometrie zum Ausschluss für akute Appendizitis daher aktuell nicht geeignet. Für die Verwendung in der Klinik ist die Entwicklung einer schnelleren Untersuchungsmethode notwendig. Die Massenspektrometrie ist zwar aufwendig, zeitintensiv und teuer, kann aber auf Grund der hohen Präzision einen Goldstandard etablieren, an dem andere, noch zu etablierende, schnellere Verfahren abgeglichen werden könnten.

## 4.3 Diskussion der Ergebnisse

### 4.3.1 Klinische und laborchemische Parameter

Die erhobenen klinischen Parameter wurden ausgewertet und ihre Sensitivität und Spezifität berechnet. Tabelle 5 zeigt einen Vergleich dieser Ergebnisse mit den Sensitivitäten und Spezifitäten in der Literatur. Die Bandbreiten der Ergebnisse in der Literatur zeigten eine große Variabilität.

Die Spezifität von Appetitlosigkeit zeigte in dieser Studie eine etwas höhere Spezifität (0,59) im Vergleich zu den Ergebnissen der Literaturrecherche (0,4-0,5). Alle anderen Werte für Sensitivität und Spezifität lagen innerhalb der Bandbreiten der in der Literatur geschilderten Werte.

Die höchste Sensitivität für akute Appendizitis zeigten die Parameter „Druckschmerz im rechten Unterbauch“ und „Kontralateraler Loslassschmerz“. Von diesen beiden wartete aber nur der kontralaterale Loslassschmerz mit einer Spezifität (0,81) auf. Unter den klinischen Parametern zeigte er in unserer Studie die höchste Aussagekraft in der Diagnostik einer Appendizitis.

Die geringste Sensitivität zeigte sich bei der CRP-Konzentration über 0,5mg/dl (0,24). Auch die Spezifität dieses Parameters war mit 0,33 schwach. Im Vergleich mit der Literatur zeigte sich eine deutlich schwächere Aussagekraft des CRP-Wertes in unserer Studie. Da eine laborchemische Untersuchung nicht Teil des Studienprotokolls war, wurde nicht bei allen Patienten eine Blutuntersuchung vorgenommen. Die hier präsentierten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf Kinder, bei denen ohnehin eine Blutentnahme im Verlauf des Diagnosepfades notwendig wurde. Daher kann hier von einem Selektionsbias ausgegangen werden, da nur selektierte Kinder eine Blutentnahme erhielten. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu anderen Studien abfiel, welche die Eignung des CRP-Wertes in der Diagnostik der Appendizitis zum Ziel hatten. In Abbildung 11 zeigte CRP eine *Area under the Curve* von 0,766. Daraus ist zu schließen, dass durch die Wahl eines höheren *Cut-off*-Wertes eine bessere Eignung des CRP-Wertes in der Diagnostik der Appendizitis erreicht werden könnte. Da aber der CRP *Cut-off* von <0,5mg/dl ein etablierter Grenzwert ist, wurde er auch in dieser Studie so verwendet.

Parameter	Sensitivität	Sensitivität laut Literatur	Spezifität	Spezifität laut Literatur
<b>Schmerzwanderung</b>	0,51	0,33-0,68	0,82	0,57-0,87
<b>Appetitlosigkeit</b>	0,69	0,68-0,92	0,59	0,4-0,5
<b>Übelkeit/ Erbrechen</b>	0,67	0,29-0,92	0,55	0,34-0,79
<b>Druckschmerz rechter Unterbauch</b>	0,93	0,62-1,00	0,33	0,05-0,68
<b>Kontralateraler Loslassschmerz</b>	0,85	0,12-0,88	0,81	0,74-0,88
<b>Leukozytose</b>	0,71	0,68-0,93	0,66	0,36-0,67
<b>CRP &gt;0,5mg/dl</b>	0,24	0,69-0,86	0,33	0,35-0,65

Tabelle 5 Sensitivität und Spezifität klinischer und laborchemischer Parameter im Literaturvergleich[42, 55, 4, 47, 48, 57, 56, 58].

#### 4.3.2 Histologisches Grading

Das histologische *Grading* erfolgte in unserer Studie anhand der histopathologischen Befunde. Es wurden die Stadien null bis vier festgelegt. Kentsis *et al* wählten die Schweregrade normal, fokal, mild, moderat und schwer.

Schweregrad normal entsprach in unserem Studienprotokoll dem Stadium null und zeigte eine gesunde Appendix. Es ist somit gleichzusetzen mit der negativen Appendektomie rate. Diese betrug bei Kentsis *et al* 16%, in unserer Kohorte 4%.

Die Definition des Stadiums eins unseres Protokolls deckte sich mit den Schweregraden fokaler und milder Appendizitiden bei Kentsis *et al*. Hierauf entfielen in unserer Studie 7% der Patienten, bei Kentsis *et al* 21%.

Stadium zwei entsprach der Stufe moderat und beinhaltete in unserer Studienpopulation den größten Patientenanteil mit 78%. 25% der Patienten zeigten eine moderate Appendizitis bei Kentsis *et al*.

Stadium drei entsprach histologisch der Stufe schwere Appendizitis in dem Studienprotokoll von Kentsis *et al*. Mit 9% entfielen in unserer Studie deutlich weniger Patienten als in der Kentsis *et al* Kohorte (25%) auf dieses Stadium.

Ein Patient (2%) hatte in unserer Appendizitispopulation eine bereits perforierte Appendizitis mit Gangränbildung. Insgesamt ist in unserer Studienpopulation der Anteil der Appendizitiden mittleren Schweregrades höher, die milden und schweren Fälle seltener. Es ist anzunehmen, dass ein vergleichbares Patientenkollektiv erhoben worden ist. Die Studie durch Kentsis *et al* wurde an einem vergleichbaren Krankenhaus in einer vergleichbar großen Stadt mit ähnlicher Sozialstruktur erhoben, so dass der Unterschied an anderer Stelle zu suchen ist: Die hier vorgenommene Einteilung der histologischen Befunde in Stadien erfolgte nicht durch die Pathologen, sondern durch die Studienbetreuung. Hierfür wurden die von den Pathologen verwendeten Begrifflichkeiten einem Stadium zugeordnet (s.o.). Die Übergänge zwischen den Stadien müssen als fließend angesehen werden, so dass unterschiedliche Pathologen vielleicht auch zu unterschiedlichen Ergebnissen kämen. Eine vollkommen mit Kentsis *et al* übereinstimmende Einteilung ist auf Grund

unterschiedlicher sprachlicher Definitionen zwischen angloamerikanischen und deutschen Befunden problematisch.

Auch ist die negative Appendektomie-Rate in unserer Studie auffallend gering. Eine mögliche Erklärung für diese geringe Rate ist die Expertise der Kinderradiologie, in der die Sonographien mit hoher Trefferquote durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls möglich ist eine wohlwollende Interpretation von Operationspräparaten durch Pathologen. Diesem eventuellen systematischen Fehler hätte mit einer Zweitevaluierung entgegnet werden können.

#### 4.3.3 Differentialdiagnosen

Die Zuordnung der Patienten ohne Appendizitis in die Diagnosegruppen der Differentialdiagnosen erfolgte anhand der wahrscheinlichsten Diagnose nach Zusammenschau der klinischen, laborchemischen und eventuell bildgebenden Befunde. Eine eindeutige, sichere Diagnose konnte nur in wenigen Fällen gestellt werden.

Die erhobenen finalen Diagnosen zeigten bei 22% der Kinder eine akute Appendizitis. Durch den Folgeanruf bei den Eltern wurde ausgeschlossen, dass die anderen Patienten doch unter einer Appendizitis litten, die in der Folge operiert worden ist. Hierbei gab es keinen Patienten, der innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Vorstellung in hiesiger Ambulanz anderenorts appendektomiert wurde. Zwei Kinder wurden zu einem späteren Zeitpunkt einer Appendektomie unterzogen und hatten einen positiven Befund. Eine Patientin litt bei Vorstellung in hiesiger Klinik an einem Harnwegsinfekt und wurde sechs Monate später appendektomiert. Sie wies eine LRG-Konzentration von 2,09fmol/200ng Protein auf. Die zweite Patientin wurde zunächst mit der Diagnose Bauchschmerzen unklarer Genese entlassen und erhielt zwei Monate später eine Appendektomie. Die LRG-Konzentration im Urin dieser Patientin lag zum Zeitpunkt der Vorstellung hier bei 16,16fmol/200ng Protein. Bei dieser Patientin ist möglicherweise eine rezidivierende Appendizitis zu diskutieren. In folgenden Studien könnte der Zeitraum der Folgebetreuung ausgeweitet werden. Kinder, die unter rezidivierenden Bauchschmerzen leiden und später einer Appendektomie unterzogen werden, die einen positiven Befund hat, könnten unter

rezidivierenden Appendizitiden leiden. Der zeitliche Verlauf der LRG-Konzentration bei diesen Kindern könnte in weiteren Studien untersucht werden.

Die größte Gruppe unter den Differentialdiagnosen umfasste mit 30% Bauchschmerzen unklarer Genese. Bei diesen Kindern konnte trotz Diagnostik keine definitive organische Ursache für die Beschwerden gefunden werden. Kentsis *et al* bezeichneten dies als unspezifische Bauchschmerzen. Sie sahen 23,9% der Kinder mit diesen Beschwerden. Die Abgrenzung dieser Kinder von akuter Appendizitis ist im klinischen Alltag oft schwer. Da der Mittelwert der LRG-Konzentration mit 2,9fmol/200ng Protein deutlich unter dem Mittelwert der Appendizitisgruppe lag, ließ sich in einem Großteil der Fälle die Appendizitis von Bauchschmerzen unklarer Genese unterscheiden, was zu weniger falsch positiven oder falsch negativen Befunden führen könnte.

Die Patienten in der mit 19% nächstgrößeren Gruppe litten unter Gastroenteritis. In der Vergleichspopulation von Kentsis *et al* war diese Diagnose mit 2% selten vertreten. Da in jener Studie nur Kinder mit bereits bestehendem Verdacht auf Appendizitis eingeschlossen wurden, wurden diese Kinder wahrscheinlich auf Grund der Anamnese und aktuellen Beschwerden nicht in die Studie aufgenommen. Kinder, die unter Gastroenteritis litten, zeigten mit 14,52fmol LRG/200ng Protein im Mittel, im Vergleich zu den anderen Differentialdiagnosen relativ hohe Werte.

Die Gruppe „diverse“ Erkrankungen zeigte als einzige Gruppe unter den Differentialdiagnosen einen höheren Mittelwert als die Appendizitisgruppe (35,83fmol/200ng Protein).

In der Gruppe der Patienten mit „Diversen“ Erkrankungen befanden sich zwei Patienten mit Purpura Schönlein Hennoch, einer immunologischen Erkrankung, die zu Petechien und Quaddeln auf der Haut führt. Bauchschmerzen sind ein häufiges Nebensymptom der Erkrankung [102]. Sie zeigten LRG-Konzentrationen von 1,57 und 6,95fmol/200ng Protein. Sie waren sowohl klinisch als auch mit Hilfe von LRG von einer akuten Appendizitis gut abgrenzbar.

Ebenfalls in der Gruppe „diverse“ Erkrankungen zeigten sich je zwei Patienten mit Pneumonie und Bronchitis ([c]-LRG: 1,07, 28,82, 7,62 und 214,70fmol/200ng

Protein). Vor allem Pneumonien können mit Bauchschmerzen einhergehen. Bei Kindern können diese Bauchschmerzen bis in den Unterbauch ausstrahlen und eine Appendizitis vortäuschen [102]. Die genaue Funktion des LRG ist bisher unbekannt. LRG gilt jedoch als Marker für entzündliche Aktivität [5, 88, 89]. Dies könnte die hohe Konzentration bei dem an Pneumonie erkrankten Patienten erklären. Der Schweregrad der Pneumonie wurde nicht dokumentiert. Ein besonders schwerer Krankheitsverlauf könnte eine derart hohe Konzentration an LRG zur Folge haben. Die Kohorte von Kentsis et al zeigte keine Patienten mit pulmonalen Infektionen.

Die Patientin mit ketoanämischem Erbrechen in der Gruppe der „diversen“ Erkrankungen zeigte eine Erstmanifestation eines Diabetes Mellitus Typ1. Bei dieser Form kommt es häufig zu einer Pseudoperitonitis mit Bauchschmerzen, die eine akute Appendizitis in Erwägung ziehen lassen. Im Blutbild zeichnet sie sich jedoch durch nur geringe Entzündungswerte bei stark erhöhten Blutzuckerwerten bis >350mg/dl aus [102]. Trotz fehlender Entzündung war die Urinkonzentration von LRG stark erhöht (174fmol/200ng Protein). Die Ursache für diese LRG Erhöhung bei ketoanämischem Erbrechen konnte auch mittels Literaturrecherche nicht ursächlich geklärt werden.

Drei weitere Patienten der „diversen“ Gruppen litten unter einer abdominellen Ursache der abdominellen Beschwerden. Eine Cholezystolithiasis führte zu einer LRG-Konzentration von 1,25fmol/200ng Protein. Die Ileitis terminalis hatte eine LRG-Konzentration von 4,18fmol/200ng Protein zur Folge. Der Patient mit Verdacht auf Zöliakie wies eine Konzentration von 27,11fmol/200ng Protein auf. Da in der vorliegenden Studie von jeder dieser Diagnosen nur je ein Patient betroffen war, ist die Aussagekraft des LRG in der Abgrenzung gegenüber einer akuten Appendizitis noch nicht abgeschätzt werden. Da alle drei Erkrankungen zu Appendizitis-ähnlichen Beschwerden führen können und die Unterscheidung klinisch schwierig sein kann, wären hier weitere Untersuchungen interessant [102, 102]. In dem Patientenkollektiv von Kentsis et al wurde keine dieser Diagnosen dokumentiert.

Ein Patient mit Angina tonsillaris und begleitenden Bauchschmerzen wies eine Konzentration von 4,02fmol/200ng Protein auf. Auch Kentsis et al führten zwei Patienten mit Influenza oder Angina tonsillaris. Die Erkrankung ist sowohl durch die

klinische Untersuchung als auch die LRG-Konzentration in diesem Fall gut von einer Appendizitis zu unterscheiden gewesen.

Die verbleibenden drei Patienten der Gruppe „diverse“ Erkrankungen litten unter Migräne, Bewusstseinsverlust nach Cannabiskonsum und metabolischer Entgleisung bei Ahornsirupkrankheit. Diese Diagnosen lassen sich sowohl durch eine strukturierte Anamnese als auch klinische und laborchemische Untersuchungen gut von einer Appendizitis abgrenzen.

Kinder mit Obstipation (10%; Kentsis *et al* 7%) konnten mit Hilfe einer Anamnese von länger andauerndem Stuhlverhalt und Ernährungsgewohnheit oft von einer Appendizitis abgegrenzt werden. In unklaren Fällen wurde durch die Gabe eines Klysmas und Abwarten einer potenziellen Besserung die Diagnose einer Obstipation erhärtet. Bei Ausbleiben einer Besserung mussten andere Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden. An dieser Stelle musste bei Unsicherheiten im Extremfall eine exploratorische Laparoskopie zum Ausschluss einer Appendizitis erfolgen.

Die nächstgrößere Gruppe an Kindern (7%, ebenso Kentsis *et al* 7%) erkrankte an Harnwegsinfekten. Diese ließen sich mit Hilfe von Urindiagnostik schnell von einer akuten Appendizitis abgrenzen. Hierbei kamen der Urinstix sowie die quantitative Bestimmung der Urinbestandteile im Labor zum Einsatz. In der Studie von Kentsis *et al* wurde beschrieben, dass LRG bei Patienten mit einer Pyelonephritis in ähnlich hohen Konzentrationen vorlag wie bei Patienten mit einer Appendizitis [8]. Patienten mit Harnwegsinfekten hatten in vorliegendem Patientenkollektiv eine deutlich niedrigere mittlere Konzentration als Patienten mit Appendizitis (10,82fmol/200ng Protein). Die Gruppe der Patienten mit Harnwegsinfekten beinhaltete einen Patienten, der eine LRG-Konzentration von 104,9fmol/200ng Protein aufwies. Er litt unter einer Urosepsis. Schließt man diesen Patient aus der Berechnung des Mittelwertes aus, erreichen die restlichen Patienten einen Mittelwert von 2,98fmol/200ng Protein. Damit könnten einfachen Harnwegsinfekte mit Hilfe der LRG-Konzentration relativ sicher von akuten Appendizitiden unterschieden werden.

Wichtige Differentialdiagnosen der akuten Appendizitis entfallen auf die beiden in unserer Studie am seltensten auftretenden Erkrankungen Lymphadenitis mesenterialis und Ovarialzysten mit jeweils 2% (n=4) der Fälle.

Die Lymphadenitis mesenterialis (Kentsis *et al* 2,9%) zeichnet sich durch abdominelle Beschwerden verursacht durch geschwollene mesenteriale Lymphknoten aus. Sie zeigt ein ähnliches Beschwerdebild wie die akute Appendizitis und ist präoperativ häufig nicht von ihr zu unterscheiden. Die Ursache einer Lymphadenitis mesenterialis ist in den meisten Fällen auf eine Infektion mit *Yersinia pseudotuberculosis* oder Salmonellen zurückzuführen. Auch eine Darmtuberkulose kann zu vergrößerten und schmerzhaften mesenterialen Lymphknoten führen [103]. Ein Patient in der Gruppe der „diversen“ Erkrankungen litt unter einer Yersiniose ohne Lymphadenitis mesenterialis. Stattdessen litt er unter Durchfällen. Die LRG-Konzentration des Patienten lag bei 54,29fmol/200ng Protein. Er wäre damit nicht eindeutig von einer Appendizitis zu unterscheiden gewesen. Die Patienten mit Lymphadenitis mesenterialis hatten eine mittlere LRG-Konzentration von 1,01fmol/200ng Protein im Urin. Diese Konzentration weicht stark von dem Mittelwert der Gruppe der Appendizitis-Kohorte ab, so dass eine Unterscheidung der Krankheitsbilder in unserer Studie möglich gewesen wäre.

Ovarialzysten oder Ovartorsionen machten in der Studie von Kentsis *et al* 7,5% der Fälle aus. Sie waren präoperativ nicht sicher klinisch von einer akuten Appendizitis zu unterscheiden. Im Durchschnitt ergab sich eine LRG-Konzentration von 1,04fmol/200ng Protein.

Lymphadenitis mesenterialis und Ovarialzysten/-torsionen warteten mit deutlich niedrigeren Werten für LRG auf, als die an Appendizitis erkrankten Patienten. Somit könnte LRG ein geeigneter Parameter sein, um diese Differentialdiagnosen auszuschließen. Beide Patientengruppen enthielten in unserer Studie jedoch nur wenige Individuen (jeweils n=4), so dass die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse anhand weiterer größerer Studien evaluiert werden sollte.

#### 4.3.4 Leucin-rich-alpha2-Glycoproteins als Marker für akute Appendizitis

Der Konzentrationsunterschied für LRG zwischen Kindern mit und ohne Appendizitis war statistisch höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ). Diese starke Signifikanz konnte auch bei dem hier vorliegenden unselektierten Patientengut belegt werden. Eine Unterscheidung in „an Appendizitis erkrankt“ und „nicht an Appendizitis erkrankt“ ist somit durch die Anwendung der LRG-Bestimmung prinzipiell möglich.

In der Studienpopulation von *Kentsis et al* zeigte sich zwischen den LRG-Konzentrationen der Appendizitis und Nicht-Appendizitis-Kohorte eine überschneidungsfreie Zone. Damit wäre die Diagnosesicherung oder der Ausschluss einer Appendizitis mit Hilfe eines *Cut-Off* Wertes möglich. In vorliegender Studie war diese eindeutige Abgrenzung der beiden Krankheitsgruppen nicht möglich. Es zeigten sich überschneidende LRG-Konzentrationen zwischen Individuen mit und ohne Appendizitis. Ein Grund für diese unterschiedliche Verteilung der LRG-Konzentrationen, könnte in der durch *Kentsis et al* vorgenommene Vorselektierung des Patientengutes anhand klinischer Untersuchungsbefunde liegen. In der vorliegenden Studie wurden alle Kinder mit abdominellen Schmerzen in die Studie aufgenommen. Diese Vorgehensweise spiegelt am ehesten das reale Patientengut einer pädiatrischen Notfallambulanz wider. Es zeigte sich demnach, dass die LRG-Konzentration im Urin von Kindern mit und ohne Appendizitis nur in Zusammenschau mit klinischen und laborchemischen Parametern eine derartige Aussagekraft ergeben konnte. Als einzelner Urinmarker zeigte er jedoch keine eindeutige Aussagekraft.

Viele verschiedene Differentialdiagnosen kommen für eine LRG-Erhöhung in Betracht. In der Studie von *Kentsis et al* wurden elf Differentialdiagnosen erhoben von denen sieben nur einen oder zwei Patienten umfassten. Damit ist die Aussagekraft bezogen auf die Differentialdiagnosen gering. In vorliegender Studie wurden 155 Patienten mit Differentialdiagnosen der akuten Appendizitis untersucht, wodurch ein breites Spektrum an Differentialdiagnosen vorhanden war. Die beiden kleinsten Kohorten – Ovarialzysten und Lymphadenitis mesenterialis – allein umfassten je vier Patienten. Dies könnte erklären, warum die durch *Kentsis et al* vorbeschriebene breite überschneidungsfreie Zone hier nicht zu finden war. Erkrankungen die in vorliegender Studie zu sehr hohen LRG-Konzentrationen geführt haben (Pneumonie, Urosepsis, ketoanämisches Erbrechen, Yersiniose, sowie drei Patienten mit Gastroenteritis) tauchten in den Differentialdiagnosen der *Kentsis*-Gruppe nicht auf.

Vesikourethrale und renale Erkrankungen zeigten keine erhöhten Konzentrationen im Vergleich zu denen der Appendizitiskohorte. Der Erkenntnis von *Kentsis et al* folgend, dass Harnwegsinfekte und Pyelonephritiden zu erhöhten LRG-

Konzentrationen führen, wurde in Abbildung 9 die Gruppe der Harnwegsinfekte separat mit der der Appendizitiden und der der übrigen Nicht-Appendizitiden verglichen. Entgegen der Erwartungen zeigten die Patienten mit Harnwegsinfekten LRG-Konzentrationen, die mit denen der Nicht-Appendizitis-Gruppe übereinstimmten, nicht jedoch mit der Appendizitiskohorte. Einzelwerte (s.o. Patient mit Urosepsis) zeigten sehr hohe Konzentrationen. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppe Harnwegsinfekte und denen der Appendizitisgruppe war statistisch hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Somit könnten auch Harnwegsinfekte mittels LRG-Bestimmung von Appendizitiden abgegrenzt werden.

Die höchste Sensitivität und Spezifität konnte bei Festlegung des Cut-off-Wertes der LRG-Konzentration bei 2,92fmol/200ng Protein erreicht werden. Die Sensitivität betrug hier 0,77. Somit würden von 100 erkrankten Patienten 77 als solche erkannt und 33 falsch als negativ bezeichnet. Die Spezifität lag an diesem Punkt bei 0,7.

Die in Abbildung 10 generierte ROC-Kurve führte zu einer *Area under the Curve* von 0,8. Dieser Wert liegt deutlich unter dem von Kentsis et al vorgeschriebenen Bereich der AUC von 0,97 bis 0,99. Unsere Studie zeigte, dass die hohe Diskriminierung bei Kentsis et al wahrscheinlich Ausdruck des vorselektierten Patientengutes ist.

In vorliegender Studie zeigten die LRG-Konzentration allerdings eine größere AUC als die bisher im klinischen Alltag verwendeten Parameter Leukozytose über 10.000/ $\mu$ l Blut und CRP über 0,5mg/dl mit einer AUC von je 0,72 und 0,77.

Die Kombination der LRG-Konzentration mit klinischen Parametern führte ebenfalls zu einer verbesserten Leistung von LRG als Urinmarker für Appendizitis. Wurde die LRG-Konzentration mit dem sensitivsten und spezifischsten klinischen Parameter „kontralateraler Loslassschmerz“ verknüpft, ergab sich eine AUC von 0,92. Als zusätzliche Untersuchung in der Zusammenschau aller anamnestischen, klinischen, laborchemischen und bildgebenden Informationen könnte die Messung von LRG die Sicherung oder den Ausschluss einer Appendizitis optimieren.

Eine Korrelation des Schweregrades der Appendizitis mit der Höhe der LRG-Konzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

Laut Kentsis et al kann auf Grund der LRG-Konzentration nicht nur auf das Vorhandensein einer Appendizitis geschlossen werden, sondern auch auf den Schweregrad der Appendizitis. So sollte die LRG-Konzentration im Urin dazu befähigen zwischen schwerer und moderater Appendizitis zu unterscheiden. Über die übrigen Abstufungen (mild, moderat, schwer und perforiert) konnte bei Kentsis et al auf Grund der geringen Fallzahlen keine Aussage getroffen werden.

In vorliegender Studie führten die histologischen Präparate des Stadiums null zu einem LRG-Mittelwert von 0,76fmol/200ng Protein. Es handelte sich hierbei um gesunde Appendizes. Der Mittelwert der anderen Stadien kombiniert, also aller Appendizitiden lag bei 48,48fmol/200ng Protein. Der Unterschied war auf Grund der geringen Fallzahl in der Gruppe des Stadiums null statistisch nicht signifikant.

Der Mittelwert des Stadiums eins lag bei 29,23fmol/200ng Protein, der von Stadium zwei bei 31,62fmol/200ng Protein und der der Gruppe drei bei 34,82fmol/200ng Protein. Unsere Daten zeigten einen Anstieg der LRG-Konzentration mit zunehmendem Schweregrad der Appendizitis, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Im Stadium vier befand sich in unserer Studie nur ein einzelner Patient mit einer LRG-Konzentration von 98,22fmol/200ng Protein. Dieser Wert lag deutlich höher als die Mittelwerte der weniger gravierenden Stadien. Da es sich hierbei aber nicht um einen Mittelwert sondern eine Einzelmessung handelte, war eine Aussage zur Signifikanz des Unterschiedes nicht möglich. In allen Stadien waren Patienten mit ähnlich hoher Ausprägung des LRGs wie der des Patienten aus Stadium vier vorhanden. Eine mögliche Erklärung sind interindividuell unterschiedlich starke Sezernierungen von LRG. Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass die Konzentration von LRG mit zunehmendem Schweregrad einer Appendizitis ansteigt.

Die LRG-Konzentration im Urin von Kindern mit Appendizitis variiert stark im Krankheitsverlauf.

Bei fünf Patienten wurden Verlaufsproben an den ersten postoperativen Tagen gewonnen. Es handelte sich um zwei Jungen und drei Mädchen im Alter von 8,2 bis 13,3 Jahren. Ein Patient erhielt bei diskreter Klinik und sonographisch

nachgewiesenem perityphlitischem Abszess eine konservative Therapie. In Abbildung 13 ist der Verlauf der LRG-Konzentrationen zu den entsprechenden Abnahmezeiten graphisch aufgetragen. Bei zwei Patienten zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration nach der Operation (Pat. 2 und 3). Bei den anderen Patienten zeigten sich schwankende Konzentrationen mit Anstiegen und Abfällen. Eine Erklärung für diese Ergebnisse konnte nicht gefunden werden. Zu diskutieren sind die oben beschriebenen Eigenschaften des Urins nach Flüssigkeitsaufnahme oder Durstphase sowie insgesamt wechselnde Zusammensetzungen des Urins im Tag- Nacht-Rhythmus.

Auf Grund der geringen Anzahl von Verlaufspatienten war die Aussagekraft dieser Untersuchung insgesamt gering. Um den Verlauf der LRG-Sezernierung zu untersuchen, könnte diese Untersuchung mit einem größeren Patientengut und einer darauf ausgelegten Studie erneut durchgeführt werden.

## 5. Schlussfolgerung

Die Bestimmung der LRG-Konzentration im Urin von Kindern mit Bauchschmerzen zeigte einen statistisch höchstsignifikanten Unterschied zwischen Kindern mit und ohne Appendizitis. Dennoch kann die LRG-Konzentration an unselektiertem Patientengut nicht als akkurater Marker für Kinder mit Blinddarmentzündung angesehen werden, da es mit einer maximalen Sensitivität von 0,77 und Spezifität von 0,7 zu viele falsch negative und falsch positive Befunde nach sich zöge.

Einige wenige Differentialdiagnosen, meist entzündlicher Genese und schweren Verlaufes führten zu sehr hohen LRG-Konzentrationen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass bei schwer erkrankten Kindern, deren Krankheitsursache unbekannt ist, die LRG-Konzentration nicht als alleiniger Marker Aufschluss geben kann. Da im klinischen Alltag eine Vorselektierung der Patienten durch den behandelnden Arzt vorgenommen wird, könnte die Sensitivität und Spezifität der LRG-Konzentration dort deutlich höher ausfallen. So zeigte in unserer Studie bereits die Kombination von LRG mit dem klinischen Parameter kontralateraler Loslassschmerz eine Verbesserung der AUC von 0,8 auf 0,92. LRG sollte also nicht bei allen Patienten mit Bauchschmerzen angewandt werden, sondern nur bei solchen, die den Verdacht auf eine akute Appendizitis nahe legen.

LRG zeigte eine höhere AUC als CRP (0,766) und die Leukozytose (0,72). Bei der Fragestellung der akuten Appendizitis stellt LRG also einen besser geeigneten Marker dar, als CRP und Leukozytose.

Die Bestimmung der LRG-Konzentration mittels Massenspektrometrie hat zu guten Ergebnissen geführt. Als Methode der Wahl für den klinischen Alltag ist sie jedoch auf Grund der langen Dauer der Untersuchung, hoher Kosten und mangelnder flächendeckender Verfügbarkeit nicht geeignet. Eine Methode zur schnellen, kostengünstigen Bestimmung beispielsweise mittels Urinstix könnte entwickelt werden, um den Marker im klinischen Alltag zu etablieren.

Die LRG-Konzentration zeigte steigende Tendenzen mit zunehmendem Schweregrad der Appendizitis. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht

nachgewiesen werden, so dass keine Aussage zu der Schwere einer Appendizitis auf Grund der LRG-Konzentration getroffen werden kann.

Die bestimmten Sensitivitäten und Spezifitäten der klinischen und etablierten laborchemischen Parameter lagen im Bereich der in der Literatur zu findenden Werte. Keiner der bestimmten Parameter ist für die Diagnostik einer akuten pädiatrischen Appendizitis ausreichend akkurat.

Die Bestimmung von LRG im Urin von Kindern mit Bauchschmerzen ist nicht geeignet, um eine akute Appendizitis zu beweisen oder auszuschließen.

## **6. Literatur und Quellenverzeichnis**

1. Dinu et al. The etiological aspects of acute abdominal pain in children, *Revista Medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Natualisti din Iasi*, 115(4): 1018-1023, **2011**
2. Becker et al. Atypical clinical features of Pediatric Appendicitis, *Academic Emergency Medicine*, 14: 124-129, **2008**
3. Estey et al. Appendix Not Seen, *Pediatric Emergency Care*, 29, 4: 435-439, **2013**
4. Shogilev et al. Diagnosing Appendicitis: Evidence-Based Review of the Diagnostic Approach in 2014, *The Western Journal of Emergency Medicine*, 15(7):859-71 **2014**
5. Kharbanda et al. Novel Serum and Urine Markers for Pediatric Appendicitis, *Academic Emergency Journal*, 19, 1: 56-62, **2012**
6. Bansal et al. Appendicitis in children less than 5 years old: influence of age on presentation and outcome, *The American Journal of Surgery*, 204, 6: 1031-1035, **2012**
7. Mallick et al. Appendicitis in pre-school children: A continuing clinical challenge. A retrospective study, *International Journal of Surgery* 6: 371–373, **2008**
8. Kentsis et al. Discovery and Validation of Urine Markers of Acute Pediatric Appendicitis Using High-Accuracy Mass Spectrometry, *Annals of Emergency Medicine*, 55,1: 62-70, **2010**
9. Kentsis et al. Detection and Diagnostic Value of Urine Leucine-Rich alpha-2-Glycoprotein in Children With Suspected Acute Appendicitis, *Annals of Emergency Medicine*, 60,1: 78-83, **2012**
10. Böcker, DH (Hrsg.). *Pathologie 3. Auflage*, 719-721, Elsevier Verlag, **2004**
11. Scholer et al. Clinical outcomes of children with acute abdominal pain, *Pediatrics*, 98, 4:680-5, **1996**
12. Ashcraft HM. *Pediatric Surgery*. *Pediatric Surgery*: 577–585, **1980**
13. McCollough et al. Abdominal Pain in Children, *Pediatric Clinics of North America*, 53, 1: 107-137, **2006**
14. Horwitz et al. Importance of Diarrhea as a presenting symptom of Appendicitis in very young children, *The American Journal of Surgery*, 173: 80-82, **1997**

15. Kontopodis et al. Efficiency of preoperative computed tomography to reduce negative appendectomies in patients undergoing surgery for left lower quadrant abdominal pain, *Giornale di Chirugia*, 35: 223-228, **2014**
16. Flum et al. The clinical and economic correlates of misdiagnosed appendicitis, *Archiv of Surgery*, 137:799-804, **2002**
17. Raines et al. Pediatric appendicitis: The prevalence of systemic inflammatory response syndrome upon presentation and its association with clinical outcomes, *Journal of Pediatric Surgery*, 48: 2442–2445, **2013**
18. Skandalakis. *Surgical Anatomy*, Chapter 17, Appendicitis **2004**
19. Searle et al. Changes in the length and diameter of the normal appendix throughout childhood, *Journal of Pediatric Surgery*, 48, 7: 1535-1539, **2013**
20. Collins DC. The Length and Position of the Vermiform Appendix: A Study of 4,680 Specimens, *Annals of Surgery*, 96.6:1044-1048, **1932**
21. Wakeley. The position of the vermiform appendix as ascertained by an analysis of 10,000 cases, *Journal of Anatomy*, 67, 2: 277-283, 1933
22. Solanke, TFea. The blood supply of the vermiform appendix in Nigerians, *Journal of Anatomy*, 102, 2, 353-361, **1968**
23. Putz P. Sobotta: Elsevier Verlag, 22. Auflage, S.247, **2007**
24. Corner et al. The function of the vermiform Appendix and the origin of Appendicitis, *British Medical Journal*, 15,1: 325-327, **1913**
25. Yuan-Kun et al. Does a decrease of NK cells in the appendix increase the risk of developing colon cancer?, *Hepatogastroenterology*. 59(118): 1819-21, **2012**
26. Fan et al. Appendectomy and cancer - an epidemiological evaluation, *Chinese Medical Journal*, 99, 6: 523-6, **1986**
27. Murai et al. Repair of right uretral stenosis by traumatic injury with appendiceal interposition: a case report, *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.*, 104, 5: 667-70, **2013**
28. McCarty. History of Appendicitis vermiformis, The innomiate Society of Louisville, **1927**
29. Williams. Presidential Address: A History of Appendicitis With Anecdotes Illustrating Its Importance, *Annals of Surgery*, 197,5: 495-506, **2006**
30. Lippolis et al. The Aymand's hernia. Case report and review of the literature, *Annals of Italian Surgery*, 78,2: 153-157, **2007**

31. Lister et al. On the Antiseptic Principle in the Practice of Surgery, *Clinical Orthopedics and Related Research*, 468,8: 2012-2016, **1867**
32. Mc Burney. The indications for early laparotomy in Appendicitis, *Annals of Surgery*, 13,4: 233-254, **1891**
33. Fowler. The operative technique of appendicitis, *Annals of Surgery*, 13,4: 276–283, **1891**
34. Mc Burney. The incision made in the abdominal wall in cases of appendicitis with a description of a new method of operating, *Annals of Surgery*, 20,1: 38–43, **1894**
35. Rogozov et al. Auto-Appendectomy in the Antarctic: case report, *British Medical Journal*, 339: 4965 **2009**
36. Semm K. et al. Endoscopic Appendectomy, *Endoscopy*, 15: 59-64, **1983**
37. Jagannath et al. Peroral transgastric endoscopic ligation of fallopian tubes with long-term survival in a porcine model, *Gastrointestinal Endoscopy*, 61,3: 449-453, **2005**
38. Bernhardt et al. Clinical NOTES appendectomy study: comparison of transvaginal NOTES appendectomy in hybrid technique with laparoscopic appendectomy, *International Journal of Colorectal Disease*, 30, 2: 259-267, **2015**
39. Addiss et al. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the united states, *American Journal of Epidemiology*, 132,5: 910-925, **1990**
40. Ohmann et al. Neues zur Epidemiologie der akuten Appendizitis, *Chirurg*, 73:769–776, **2002**
41. Treutner et al. Epidemiologie der Appendicitis, *Chirurg*, 68 : 1–5, **1997**
42. Alvadro et al. A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis, *Annals of Emergency Medicine*, 15,5: 557-559, **1986**
43. Stringer et al. *Pediatric Surgery and Urology*; S.374, Cambridge, **2006**
44. Blanco et al. Increased incidence of perforated appendicitis in children with obesity, *Clinical Pediatrics*, 51,10: 928-932, **2012**
45. Von Schweinitz. *Kinderchirurgie*; S. 413, Springer, **2009**
46. Laurell et al. Manifestations of Acute Appendicitis: A Prospective Study on Acute Abdominal Pain, *Digestive Surgery*, 30: 198-206, **2012**

47. Colvin et al. The Presentation of Appendicitis in Preadolescent Children, *Pediatric Emergency Care*, 23,12: 849-855, **2007**
48. Kulik et al. Does This Child Have Appendicitis? A systematic review of clinical prediction rules for children with acute abdominal pain. ,*Journal of Clinical Epidemiology*, 66,1: 95-104, **2013**
49. Prosenz et al. Rovsing Sign Revisited—Effects of an Erroneous Translation on Medical Teaching and Research, *Journal of Surgical Education*, 71,5: 738-742, **2014**
50. Chong et al. Development of the RIPASA score: a new appendicitis scoring system for the diagnosis of acute appendicitis, *Singapore Medical Journal*, 51,3: 220- 225, **2010**
51. Goldman et al. Prospective validation of the pediatric appendicitis score, *Journal of Pediatrics*, 153,2: 278-212, **2008**
52. Bhatt et al. Prospective validation of the pediatric appendicitis score in a Canadian pediatric emergency department, *Academic Emergency Medicine*, 16: 591–596, **2009**
53. Pogorelić et al. Prospective Validation of Alvarado Score and Pediatric Appendicitis Score for the Diagnosis of Acute Appendicitis in Children, *Pediatric Emergency Care*, 31: 164–168, **2015**
54. Salö et al. Appendicitis in Children: Evaluation of the Pediatric Appendicitis Score in Younger and Older Children, *Surgery Research and Practice*, Article ID 438076, 6 pp, **2014**
55. Sahbaz et al. The clinical value of leukocyte count and neutrophil percentage in diagnosing uncomplicated (simple) appendicitis and predicting complicated appendicitis, *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 20, 6: 423-426, **2014**
56. Noh et al. The diagnostic values of preoperative laboratory markers in children with complicated appendicitis, *Journal of the Korean Surgical Society*, 83:237-241, **2012**
57. Kwan et al. Diagnosing pediatric appendicitis: usefulness of laboratory markers, *American Journal of Emergency Medicine*, 28, 1009–1015, **2010**
58. Kim et al. C-reactive protein estimation does not improve accuracy in the diagnosis of acute appendicitis in pediatric patients, *International Journal of Surgery*, 7, 74–77, **2009**
59. Utsch et al. Urinalysis in Children and Adolescents, *Deutsches Ärzteblatt International*, 111: 617–26, **2014**
60. D'Souza et al. The value of ultrasonography in the diagnosis of appendicitis, *International Journal of Surgery*, 13: 165-169, **2015**

61. Goldin et al. Revised ultrasound criteria for appendicitis in children improve diagnostic accuracy, *Pediatric Radiology*, 41:993–999, **2011**
62. Larson et al. Improvement in Diagnostic Accuracy of Ultrasound of the pediatric Appendix Through the Use of Equivocal Interpretive Categories, *American Journal of Roentgenology*, 204(4):849-856, **2015**
63. Douglas et al. Randomised controlled trial of ultrasonography in diagnosis of acute appendicitis, incorporating the Alvarado score, *British Medical Journal*, 321 :1–7, **2000**
64. Poortman et al. Comparison of CT and Sonography in the Diagnosis of Acute Appendicitis: A Blinded Prospective Study, *American Journal of Roentgenology*, 181,5:1355-1359, **2003**
65. Ozkan et al. The accuracy rate of Alvarado score, ultrasonography, and computerized tomography scan in the diagnosis of acute appendicitis in our center, *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 17, 4:413-418, **2014**
66. Choudhri et al. Handheld Device Review of Abdominal CT for the Evaluation of Acute Appendicitis, *Journal of Digital Imaging*, 25,4: 492-496, **2012**
67. Michailidou et al. Diagnostic imaging for acute appendicitis: interfacility differences in practice patterns, *Pediatric Surgery International*, 31: 355–361, **2015**
68. Lahaye et al. Mandatory imaging cuts costs and reduces the rate of unnecessary surgeries in the diagnostic work-up of patients suspected of having appendicitis, *European Radiology*, 25, 5: 1464-70, **2014**
69. Schok et al. Prospective Evaluation of the Added Value of Imaging within the Dutch National Diagnostic Appendicitis Guideline, *Digestive Surgery*; 31: 436–443, **2013**
70. Alzen et al. Kinderradiologie - Besonderheiten des Strahlenschutzes, *Deutsches Arzteblatt International*, 108,24: 407–14, **2011**
71. Bayraktutan et al. Diagnostic performance of diffusion-weighted MR imaging in detecting acute appendicitis in children: Comparison with conventional MRI and surgical finding, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 39: 1518–1524, **2014**
72. Orth et al. Prospective Comparison of MR Imaging and US for the Diagnosis of Pediatric Appendicitis, *Radiology*, 272,1: 233-240, **2014**
73. Moore et al. MRI for clinically suspected pediatric appendicitis: an implemented program, *Pediatric Radiology*, 42: 1056–1063, **2012**

74. Koning et al. Diagnostic performance of contrast-enhanced MR for acute appendicitis and alternative causes of abdominal pain in children, *Pediatric Radiology*, 44: 948–955, **2014**
75. Sauerland et al. Laparoscopy for abdominal emergencies, *Surgical Endoscopy*, 20: 14–29, **2005**
76. Andren-Sandberg et al. Exploratory laparoscopy at suspicion of acute appendicitis, *Rozhledy V Chirurgii - Journals*, 83, 3: 131-137, **2004**
77. Sakorafas et al. Interval routine appendectomy following conservative treatment of acute appendicitis: Is it really needed, *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 27,4: 283-86, **2012**
78. Tekin et al. Routine interval appendectomy is unnecessary after conservative treatment of appendiceal mass, *Colorectal Disease*, 10: 465–468, **2008**
79. Kirby et al. Appendectomy for suspected uncomplicated appendicitis is associated with fewer complications than conservative antibiotic management: A meta-analysis of post-intervention complications, *The Journal of Infection*, 70,2:105-110, **2015**
80. Flum et al. Clinical practice. Acute appendicitis--appendectomy or the "antibiotics first" strategy, *The New England Journal of Medicine*, 372: 1937-1943 **2002**
81. Bat et al. Clinical results of laparoscopic appendectomy in patients with complicated and uncomplicated appendicitis, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*,7,10: 3478-3487, **2014**
82. Obinwa et al. A model predicting perforation and complications in paediatric appendectomy, *International Journal of Colorectal Disease*, 30,4: 559-565, **2015**
83. Cipe et al. Laparoscopic versus open appendectomy where are we now?, *Chirurgia*, 109,4: 517-522, **2014**
84. Sauerland et al. Laparoscopy for abdominal emergencies, *Surgical Endoscopy*, 20: 14-29, **2006**
85. O'Donnell et al. Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation, *Journal of Leukocyte Biology*, 72,478-485, **2002**
86. Takahashi et al. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alpha 2-glycoprotein of human serum, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82,7:1906-1910, **1984**

87. Rassow. Biochemie, Duale Reihe, 4. Auflage, S. 67, Thiemeverlag, **2016**
88. Watson et al. Proteomic Analysis of Coronary Sinus Serum Reveals Leucine-Rich 2-Glycoprotein as a Novel Biomarker of Ventricular Dysfunction and Heart Failure, *Circulation Heart Failure*, 4,2:188-197, **2011**
89. Ai et al. LRG-accelerated differentiation defines unique G-CSFR signaling pathways downstream of PU.1 and C/EBP that modulate neutrophil activation, *Journal of Leukocyte Biology*, 83:1277-1285, **2008**
90. Shirai et al. Up-regulation of the expression of leucine-rich alpha(2)-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382: 776–779 **2009**
91. Cummings et al. Serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 binds cytochrome c and inhibits antibody detection of this apoptotic marker in enzyme-linked immunosorbent assay, *Apoptosis*,11:1121-1129, **2006**
92. Codina et al. Cytochrome c-induced lymphocyte death from the outside in: inhibition by serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1, *Apoptosis*, 15:139-152, **2009**
93. Ladd et al. Increased Plasma Levels of the APC-Interacting Protein MAPRE1, LRG1, and IGFBP2 Preceding a Diagnosis of Colorectal Cancer in Women, *Cancer Prevention Research*,5,4: 655-664, **2012**
94. Sandanayake et al. A combination of serum leucine-rich  $\alpha$ -2-glycoprotein 1, CA19-9 and interleukin-6 differentiate biliary tract cancer from benign biliary strictures, *British Journal of Cancer*, 105, 9: 1370-1378, **2011**
95. Andersen et al. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is upregulated in sera and tumors of ovarian cancer patients, *Journal of Ovarian Research*, 10,3: 21, **2010**
96. Serada et al. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis, *Inflammatory Bowel Diseases*, 18,11: 2169-2179, **2012**
97. Nakajima et al. Diagnostic value of CSF biomarker profile in idiopathic normal pressure hydrocephalus; leucine-rich  $\alpha$ -2-glycoprotein is a potential biological marker, *Clinical Neurology*, 50,11: 973-976, **2010**
98. Ha et al. Usefulness of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a disease activity biomarker in patients with rheumatoid arthritis, *Journal of Korean Medical Science*, 29,9: 1199-1204, **2014**
99. Mani et al. Statistical characterization of multiple-reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS) assays for quantitative proteomics, *BMC Bioinformatics*, 13,16: 9, **2012**

100. Boonstra et al. Less negative appendectomies due to imaging in patients with suspected appendicitis, *Surgical Endoscopy*, 29,8: 2365-2370, **2014**
101. Keil F. *Klinische Chemie, systematisch*, S. 189-193, UNI-MED-Verlag, **2000**
102. Gerd Herold. *Innere Medizin*, S. 377,698-99, 726-738, **2016**
103. Hof D. *Medizinische Mikrobiologie: Duale Reihe*, 4. Auflage, S. 358-365, Thieme Verlag **2009**

## **7. Anhang**

1. Befunderhebungsbogen bei Bauchschmerz und Datenschutzerklärung
2. Gemessene Peptide und Transitionen

# Befunderhebungsbogen bei Bauchschmerz:

Patientenaufkleber

Telefonnummer:

\_\_\_\_\_

Kinderarzt:

\_\_\_\_\_

## 1. Anamnese:

- Schmerzdauer: <12h  bis 24h  bis 2d  bis 4d  bis 7d   
über 7d
- Schmerzstärke: 0-2  3-4  5-7  8-10
- Schmerzwanderung Ja  Nein
- Appetitlosigkeit Ja  Nein
- Übelkeit/Erbrechen Ja  Nein
- Schmerzlinderung nach Klysma >2 Punkte Ja  Nein   
Entfällt

## 2. Befund vom \_\_\_\_\_ (Datum/Uhrzeit)

- Druckschmerz rechter Unterbauch Ja  Nein
- Kontralateraler Loslassschmerz Ja  Nein
- Schmerzen bei Husten/Klopfen/Hüpfen Ja  Nein

➤ Sonstiges: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 3. Messungen:

- Temperatur <37,3°C  bis 38.5°C  über 38,5°C
- Leukozytose ≤10.000/μl  ≥10.000/μl
- CRP <0.5mg /dl  ≥0,5mg/dl

- LRG (Leucin Rich alpha Glycoprotein) \_\_\_\_\_

**4. Sonographie vom \_\_\_\_\_ (Datum /Uhrzeit)**

Durchführender:

Kinderradiologe     
  OA Kinderchirurgie     
  OA     
 Pädiatrie

Untersuchung	Erste Untersuchung		Zweite	
➤ Darstellbarkeit des Appendix	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
➤ Durchmesser:	<7mm <input type="checkbox"/>	≥7mm <input type="checkbox"/>	<7mm <input type="checkbox"/>	≥7mm <input type="checkbox"/>
➤ Kompressibilität	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
➤ Aufgehobene/verstrichene Wandschichtung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
➤ Netzkappe	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
➤ Perityphlitischer Abszess	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
➤ Freie Flüssigkeit im Douglasraum	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
➤ Mesenteriale Lymphknoten	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

**5. Histologie und Kontrolle**

- Unauffällig    1)                    2)
- Phlegmonös    1)                    2)
- Gangränös     1)                    2)
- Perforiert      1)                    2)

**6. Follow-up-Call**

Patient wurde in den zwei folgenden Wochen in keiner anderen Klinik operiert.

## Studie zur Bestimmung von LRG1 im Urin von Kindern mit Verdacht auf akute Appendizitis

### Datenschutzrechtliche Einwilligung

Ich, als Sorgeberechtigter meines Kindes bin damit einverstanden, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, erhoben und auf den Servern der Klinik für Kinderchirurgie gespeichert und ausgewertet werden. Die Teilnahme an der Studie erfolgt freiwillig. Auch bin ich damit einverstanden, dass ein Beauftragter des Projektleiters zusammen mit dem Arzt kontrolliert, ob die erfassten Daten und Prüfbögen übereinstimmen.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung in die Aufzeichnung, Speicherung und Verwendung meiner Daten jederzeit widerrufen kann. Bei einem Widerruf werden meine Daten unverzüglich gelöscht.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie 7 Jahre aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit dem nicht gesetzliche, satzungsgemäße oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Die persönlichen Daten Ihres Kindes, wie Name, Vorname oder Geburtsdatum werden nicht weitergegeben. Mit Ihrer Unterschrift erklären Sie sich nur damit einverstanden, dass die ansonsten erhobenen Krankendaten in anonymisierter Form gegebenenfalls in wissenschaftlichen Veröffentlichungen verwendet werden können.

Alle Belange der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes bleiben gewährleistet.

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Sorgeberechtigter\*

\*) mit der Unterschrift bestätige ich, dass ich entweder alleine sorgeberechtigt bin oder mit dem Einverständnis des Weiteren sorgeberechtigten handle.

Ich habe heute Frau/Herrn \_\_\_\_\_ über den Ablauf der Studie sowie die Behandlungsweise im obigen Sinne aufgeklärt.

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum

\_\_\_\_\_  
Stempel der Institution/Unterschrift betreuender Arzt

## Anhang 2 Gemessene Peptide und Transitionen

Protein	Peptide	Transition			Label	Q1	Q3		
		1	2	3			1	2	3
LRG1	DLLLLQPDLR	y6	y7	b3	light	590,34	725,394	838,478	455,286
					heavy	595,344	735,402	848,486	455,286
	VAAGAFQGLR	y5	y7	y8	light	495,28	620,351	748,409	819,447
					heavy	500,284	630,359	758,418	829,455
	GQTLAVAK	y5	y6	y7	light	450,779	501,339	614,423	715,471
					heavy	454,786	509,353	622,437	723,485
S100A8	ALNSIIDVYHK	y3	y4	y5	light	636,851	447,235	546,303	661,33
					heavy	640,858	455,249	554,317	669,344
	GNFHAVYR	y3	y4	y5	light	482,243	437,25	508,287	645,346
					heavy	487,248	447,258	518,295	655,354
	GADVWFK	y3	y4	y5	light	411,711	480,26	579,328	694,355
					heavy	415,718	488,274	587,343	702,37
S100A9	NIETIINTFHQYSVK	y9	y10	b3	light	903,973	1123,552	1236,637	458,224
					heavy	907,98	1131,567	1244,651	458,224
	LGHPDTLNQGEFK	y5	y6	b4	light	485,912	608,303	722,346	520,251
					heavy	488,584	621,298	730,36	520,251
	DLQNFLK	y4	y5	b4	light	439,243	521,308	649,366	618,288
					heavy	443,25	529,322	657,38	618,288
APOD	WYEIEK	y4	y5	b4	light	434,216	518,282	681,345	721,319
					heavy	438,223	526,296	689,359	721,319
	VLNQELR	y4	y5	y6	light	436,253	545,304	659,347	772,431
					heavy	441,258	555,312	669,355	782,439
	NILTSNNIDVK	y7	y8	y9	light	615,838	789,409	890,457	1003,541
					heavy	619,845	797,424	898,471	1011,555

PLMN	AFQYHSK	y4	y5	y6	light	440,719	534,266	662,325	809,394
					heavy	444,726	542,281	670,339	817,408
	HSIFTPETNPR	y6	y8	y9	light	649,828	713,357	961,473	1074,557
					heavy	654,832	723,365	971,481	1084,566
ORM1	SVQEIQATFFYFTPnk	y8	b3	b7	light	960,481	1063,524	444,208	857,436
					heavy	964,488	1071,538	444,208	857,436
	TEDTIFLR	y3	y5	y6	light	497,764	435,271	649,403	764,43
					heavy	502,768	445,279	659,411	774,438
	SDVVYTDW	y5	y6	b2	light	556,767	712,33	811,398	302,134
					heavy	560,774	720,344	819,412	302,134

Protein	Peptide	Transition			Label	Q1	Q3		
		1	2	3			1	2	3
LRG1	DLLLPQPDLR	y6	y7	b3	light	590,34	725,394	838,478	455,286
					heavy	595,344	735,402	848,486	455,286
	VAAGAFQGLR	y5	y7	y8	light	495,28	620,351	748,409	819,447
					heavy	500,284	630,359	758,418	829,455
	GQTLAVAK	y5	y6	y7	light	450,779	501,339	614,423	715,471

## Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen waren viele mir nahestehender Menschen beteiligt, denen ich Dank schulde.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Knoefel für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die Finanzierung der am Ende ausufernden Versuchsreihen in der Massenspektrometrie. Meinem Betreuer Dr. Michael Kohl danke ich für die produktive Zusammenarbeit und die vielen spontanen Besprechungen. Es war eine wertvolle Erfahrung gemeinsam durch den Promotionsdschungel zu ziehen und am Ende sogar am Ziel anzugelangen. Dankeschön auch an Jasmin Khochfar, die in der zweiten Hälfte der Arbeit die Koordination der Probenakquise mit verantwortet hat.

Ein großer Dank gilt dem Team des BMFZ für die konsequente und gründliche Durchführung der Massenspektrometrie. Besonders danke ich hier Dr. Gereon Poschmann, der mir auch inhaltlich jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und auch in der Zeit des Schreibens stets ein Ansprechpartner für mich war.

Dem Forschungsteam der Allgemeinchirurgie danke ich für die freundliche Aufnahme in den Laboratorien für die Probenaufbereitungen. Auch hier konnte ich jederzeit meine Fragen loswerden und bekam kompetente Soforthilfe. Hervorzuheben ist an dieser Stelle Annika, die mir bei den ersten Versuchsreihen mit den ELISA-Kits geholfen hat.

Ein großer Dank geht an das Pflege- und Ärzteteam der Kindernotaufnahme. Ohne ihre unermüdliche Mitarbeit wären das Akquirieren der notwendigen Patientenzahlen und die ausführliche Dokumentation unmöglich gewesen.

Ich danke Dr. Kentsis für die Bereitstellung der Abbildungen, sowie dem Institut für Pathologie der Uniklinik Düsseldorf für das Anfertigen und zur Verfügung stellen der histopathologischen Abbildungen der Appendizitiden.

Meinen Doktorschwestern Dorothee, Katharina und Elke danke ich für die vielen Treffen und die gegenseitige Motivation doch wieder dran zu bleiben, wenn uns alles über den Kopf wuchs.

Danken möchte ich auch meinem Onkel Frank, der sich als Erster an die fachlichen Korrekturen dieser Arbeit gewagt hat und meinem Opa Mecki, der sich als Schriftsetzer um die Korrektur verdient gemacht hat. Auch meinem Bruder möchte ich für die sprachliche Korrektur dieser Arbeit danken. Durch ihn ist diese Arbeit deutlich lesbarer geworden.

Den größten Dank möchte ich meinem Mann Henning, meinen Eltern Reinhard und Gretel und Schwiegereltern Anita und Wilfried, meinen Geschwistern Dennis und Neele und meinen lieben Freunden Julia, Juliane, Kaddy, Carina und Tobi aussprechen. Sechs lange Jahre habt ihr euch in wechselnden Intensitäten das Jammern und Klagen über die Promotionsarbeit angehört. Eurer unermüdliche Unterstützung, eurem Trost und euren manchmal vielleicht ausufernden aber mindestens genauso notwendigen Ablenkungsversuchen verdanke ich den erfolgreichen Abschluss dieser Promotion. Joshy danke ich für die zahlreichen Spaziergänge bei denen er mit seiner überschwänglichen Freude und seinem temperamentvollen Gemüt dafür gesorgt hat, dass ich wieder klare Gedanken fassen konnte.

Viele Menschen haben meinen Weg durch das Studium und die Promotion begleitet. Alle Namen zu nennen würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen. Doch auch den Unerwähnten möchte ich an dieser Stelle für die vielfältigen Unterstützungen danken.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Nadja Müllmann

Düsseldorf, 29.05.2018