

# Der diagnostische Erfolg von transienter Elastographie und Fibrosemarkern zur Erkennung einer Leberbeteiligung bei erwachsenen Mukoviszidosepatienten

**Katrin Menéndez Menéndez**



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Der diagnostische Erfolg von  
transienter Elastographie und Fibrosemarkern  
zur Erkennung einer Leberbeteiligung bei  
erwachsenen Mukoviszidosepatienten**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

**Katrin Menéndez Menéndez**

aus Havanna (Kuba)

Gießen 2014

Aus dem Zentrum für Innere Medizin - Schwerpunkt Gastroenterologie  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen

*Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. E. Roeb*

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Elke Roeb

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Tag der Disputation: 29.09.2015

## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Arbeiten veröffentlicht:

### Originalarbeiten:

RATH T, **MENENDEZ MENENDEZ K**, KÜGLER M, HAGE L, WENZEL C, SCHULZ R, GRAF J, NAEHRLICH L, ROEB E, RODERFELD M. TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. 2012; Dig Liver Dis. 44:780-7.

RATH T, HAGE L, KÜGLER M, **MENENDEZ MENENDEZ K**, ZACHOVAL R, NAEHRLICH L, SCHULZ R, RODERFELD M, ROEB E. Serum proteome profiling identifies novel and powerful markers of cystic fibrosis liver disease. 2013; PLoS One. 8 (3): e58955.

RATH T, ZWASCHKA L, HAGE L, KÜGLER M, **MENENDEZ MENENDEZ K**, NAEHRLICH L, SCHULZ R, RODERFELD M, ROEB E. Identification of neutrophil activation markers as novel surrogate markers of CF lung disease. 2014; PLoSOne. 9 (12): e115847.

### Abstractveröffentlichungen:

KÜGLER M, **MENENDEZ MENENDEZ K**, SCHULZ R, GEIDEL C, NÄHRLICH L, TSCHUSCHNER A, WEISS M, RODERFELD M, ROEB E. Transiente Elastografie und YKL-40 im Serum ermöglichen eine Früherkennung der Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten. Z Gastroenterol 2011; 49; P395.

KÜGLER M, **MENENDEZ MENENDEZ K**, RATH T, SCHULZ R, GEIDEL C, NÄHRLICH L, TSCHUSCHNER A, WEISS M, RODERFELD M, ROEB E. TIMP-2, Serum-Marker einer portalen Hypertension bei Mukoviszidosepatienten. Z Gastroenterol 2012; 50; P3-21.

KÜGLER M, **MENENDEZ MENENDEZ K**, RATH T, SCHULZ R, GEIDEL C, NÄHRLICH L, TSCHUSCHNER A, WEISS M, RODERFELD M, ROEB E. Portale Hypertension korreliert mit Fibrose-Biomarkern bei Patienten mit Zystischer Fibrose. *Der Gastroenterologe*; March 2012; Volume 7; Issue 2; pp 163-176.

KÜGLER M, **MENENDEZ K**, RATH T, SCHULZ R, GEIDEL C, NÄHRLICH L, RODERFELD M, ROEB E. Transiente Elastographie und Serummarker ermöglichen die Diagnose einer Leberbeteiligung bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten. *Z Gastroenterol* 2013; 51; K301.

*Meinem Vater Pedro Pablo Menéndez Ponce  
Meiner Mutter Ingrid Menéndez Ponce*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung .....	1
2	Literaturübersicht.....	4
2.1	Krankheitsbild „Zystische Fibrose“ .....	4
2.1.1	Definition.....	4
2.1.2	Geschichtliche Daten.....	4
2.1.3	Epidemiologie.....	5
2.1.4	Genetik .....	5
2.1.5	CF-assozierte Leberbeteiligung (CFLD).....	7
2.1.5.1	Pathogenese der CFLD.....	7
2.1.5.2	Prävalenz der CFLD .....	9
2.1.5.3	Auswirkungen der CFLD .....	9
2.2	Diagnose der CFLD.....	11
2.2.1	Körperliche Untersuchung.....	11
2.2.2	Invasive Diagnostik .....	12
2.2.2.1	Leberbiopsie .....	12
2.2.3	Nicht invasive Diagnostik.....	15
2.2.3.1	Indirekte Fibrosetests.....	15
2.2.3.2	Direkte Fibrosetests .....	18
2.2.3.3	Physikalische Methoden.....	21
3	Patienten und Methoden .....	25
3.1	Patienten .....	25
3.2	Transiente Elastographie.....	27
3.2.1	Aufbau des Fibroscan® 502 .....	27
3.2.2	Durchführung der Messungen .....	28
3.3	Laborgeräte und Materialien .....	30
3.3.1	Geräte.....	30
3.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.3.3	Chemikalien und Reagenzien .....	31
3.3.4	Antikörper .....	31
3.3.5	Kommerzielle Kits.....	33
3.4	Serumproben.....	33
3.4.1	Gewinnung und Lagerung der Serumproben.....	33



3.4.2	Routinelaboruntersuchungen und Bestimmung der Fibrosemarker .....	34
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	34
3.5.1	Prinzipien des ELISA.....	34
3.5.1.1	Sandwich-ELISA .....	35
3.5.1.2	Kompetitiver ELISA .....	35
3.5.2	Durchführung des ELISA am Beispiel von TIMP-2 .....	36
3.6	Statistische Auswertung.....	37
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Klinische Patientendaten.....	41
4.2	Mutation und CFLD.....	42
4.3	Geschlecht und CFLD .....	44
4.4	Transiente Elastographie und CFLD.....	45
4.5	Expression von Fibrosebiomarkern bei CF-Patienten mit CFLD .....	46
4.6	CF-assoziierte portale Hypertension (PHT) .....	48
4.6.1	Transiente Elastographie und PHT .....	48
4.6.2	Fibrosebiomarker und PHT.....	49
4.7	Diagnostische Relevanz von transienter Elastographie und Fibrosemarkern für die Erkennung von CFLD und PHT .....	51
4.8	Erhöhte Lebersteifigkeit und Routinelaborparameter .....	52
5	Diskussion.....	54
5.1	Ergebnisdiskussion .....	54
5.2	Einführung .....	54
5.2.1	Risikofaktoren für die Entwicklung einer CFLD .....	57
5.2.2	Erhöhte Lebersteifigkeit bei Patienten mit CFLD .....	59
5.2.3	Erhöhte Lebersteifigkeit und portale Hypertension.....	59
5.2.4	Die diagnostische Bedeutung von Fibrosebiomarkern .....	62
5.3	Limitationen der Studie .....	66
5.4	Ausblick .....	69
6	Zusammenfassung.....	71
7	Summary .....	73
8	Abbildungsverzeichnis.....	74
9	Tabellenverzeichnis .....	75
10	Literaturverzeichnis.....	76
11	Abkürzungsverzeichnis .....	89

12	Danksagung .....	91
13	Lebenslauf .....	93
14	Erklärung .....	94

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die zystische Fibrose (CF) ist eine genetisch bedingte autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Aufgrund einer Mutation kommt es zur Ausbildung eines fehlerhaften CFTR-Kanals in verschiedenen exokrinen Drüsen des menschlichen Körpers. Im hepatobiliären System befindet sich der CFTR-Kanal – ein cAMP-abhängiger Chlorid-Kanal – an der apikalen Membran der Cholangiozyten und im Gallenblasenepithel (1). Die Störung seiner Funktion führt zur Sekretion eines wasserarmen, hochviskösen Sekrets, welches kumuliert und somit zu einer Obstruktion der intrahepatischen Gallengänge führt. Aufgrund dieser Obstruktion entwickelt sich nach und nach eine periportale Fibrose, deren Endstadium eine Zirrhose darstellt (2). Patienten mit zystischer Fibrose zeigen durchschnittlich in 27% bis 35% der Fälle eine Leberbeteiligung (3;4).

Obwohl einige Aspekte der Pathogenese der CF-assoziierten Lebererkrankung (CFLD) bisher noch unklar sind, lässt sich bereits jetzt sagen, dass sie als erste hereditäre Lebererkrankung gilt, bei der lediglich die Cholangiozyten, nicht aber die Hepatozyten betroffen sind (5).

Aufgrund frühzeitiger Screeningverfahren, vielfältiger Diagnose- und Therapiemöglichkeiten sowie verbesserter Lebensumstände nimmt die Lebenserwartung der CF-Patienten stetig zu. Dies ermöglicht zum einen eine bessere Langzeitüberwachung der Patienten, zum anderen ist dadurch die Voraussetzung für die Beobachtung einer großen Anzahl an klinischen Ereignissen (z.B. in der Leber) gegeben. Es hat sich gezeigt, dass die CFLD neben den Lungenschäden eine der Hauptkomplikationen der zystischen Fibrose ist, die das Überleben und die Lebensqualität der Patienten stark einschränkt.

Die CF-assoziierte Lebererkrankung ist für 2,5% der Gesamtsterblichkeit der CF-Patienten verantwortlich und stellt die dritthäufigste Todesursache der Mukosviszidosepatienten dar (6;7).

Die Diagnose einer beginnenden Fibrosierung der Leber im Rahmen der CFLD gestaltete sich bislang sehr schwierig, da die CFLD trotz ihres progredienten Verlaufs, bis zum Auftreten von Symptomen des Endstadiums, häufig asymptomatisch verläuft.

Bisher galt die Leberbiopsie als Goldstandard zur Diagnose von hepatischen Veränderungen (8).

Dabei handelt es sich jedoch um ein invasives Verfahren, welches zudem mit einem hohen Stichprobenfehler aufgrund der heterogenen Verteilung der Leberläsionen behaftet ist. Ferner repräsentiert ein Leberstanzbiopsiezylinder lediglich ein Areal von 1:25000 – 1:50000 der gesamten Leber (9).

Wie bereits im Rahmen der HCV-induzierten Hepatopathie nachgewiesen worden ist, wird die Aussagekraft eines Leberbiopsates auch dadurch in Frage gestellt, dass eine signifikante Intra- und Interbeobachter-Variabilität besteht (10).

Aufgrund der oben genannten Einschränkungen der Leberbiopsie wurde ein erheblicher Forschungsaufwand betrieben, um nicht-invasive Methoden zur Diagnose einer CFLD zu etablieren. Einige Studien haben die Aussagekraft der transienten Elastographie (TE) im Hinblick auf die Lebersteifigkeit bei CF-Patienten untersucht (11-13).

Obwohl diese Studien vielversprechende Ergebnisse lieferten, ist eine Überprüfung dieser Daten im Rahmen von unabhängigen Studien an großen Patientenkollektiven wünschenswert.

Ein wachsendes Verständnis über die Pathogenese der Leberfibrose hat dazu geführt, dass zunehmend verschiedene Serumfibrosemarker diagnostisch eingesetzt wurden. Diese Fibrosemarker entstammen pathophysiologisch der extrazellulären Matrix (ECM). Im Rahmen der Leberfibrosierung kommt es zu einer gesteigerten Ablagerung von ECM-Komponenten, wie z. B. Kollagenen, Proteoglycanen und Glycoproteinen. Die Ablagerung der extrazellulären Matrix erfolgt dabei im Disse'schen Raum, dem Spaltraum zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen der Lebersinusoiden. Sie führt nicht nur zu einem verminderten Blutfluss innerhalb der Leber, sondern auch zu einer Verschlechterung der biosynthetischen Funktion der Hepatozyten sowie zu einer reduzierten Clearanceleistung der Zellen. Der Nachweis von Fibrosebiomarkern im Serum von Patienten erlaubt somit Rückschlüsse auf den Fibrosierungsprozess innerhalb der Leber (14).

### *Ziele der vorliegenden Arbeit*

1. Untersuchung der Validität der transienten Elastographie im Hinblick auf eine Leberbeteiligung bei CF-Patienten
2. Erforschung neuer Fibrosebiomarker, die eine Hepatopathie bei CF-Patienten im Serum widerspiegeln
3. Prüfung der Korrelation zwischen einer Leberbeteiligung bei CF-Patienten und einer Erhöhung bzw. Erniedrigung Hepatopathie-assoziiierter Serumparametern (z.B. Gesamtbilirubin, Thrombozytenzahl, Cholinesterase)

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Krankheitsbild „Zystische Fibrose“

#### 2.1.1 Definition

Die Mukoviszidose oder zystische Fibrose (CF) ist die häufigste angeborene und frühletale genetische Erkrankung der weißen Bevölkerung. Als Folge des genetischen Defektes wird ein für die zelluläre Chloridpermeabilität verantwortliches Protein nicht oder nur funktionsuntüchtig gebildet. Die Mukoviszidose stellt eine Erkrankung der exokrinen Drüsen dar, die aufgrund des Defektes ein wasserarmes, meist hochvisköses Sekret produzieren.

Die am häufigsten betroffenen Organsysteme sind die Schweißdrüsen, das Pankreas, die Lungen und die Vasa deferentia beim Mann. Wesentlich seltener kommt es zu einer Beteiligung der Leber und des Gastrointestinaltraktes. Der Phänotyp des Krankheitsbildes ist extrem heterogen hinsichtlich der Schwere und der Art der betroffenen Organe. Morbidität und Mortalität werden in erster Linie durch die respiratorische Manifestation bestimmt.

#### 2.1.2 Geschichtliche Daten

Mutationsfrequenzanalysen zeigen, dass die zystische Fibrose eine relativ alte Erkrankung ist. Erste Mutationen traten wohl bereits gegen Ende der letzten Eiszeit (40000-30000 v. Chr.) in Vorderasien und Südwesteuropa auf. Zu einer Verbreitung des Krankheitsbildes kam es unter anderem durch Völkerwanderungen, Eroberungszüge auf dem europäischen Kontinent sowie durch die Kolonialisierung. Seit dem Mittelalter sind anekdotische Schilderungen einzelner, durchaus CF-typischer Symptome überliefert (15).

Eine erstmals umfassende Schilderung der Symptome und der Veränderungen innerhalb der Organe lieferte 1938 Dorothy H. Andersen von der Columbia-Universität in New York.

Viele Jahre blieb der zugrunde liegende Defekt unbekannt, bis 1989 Lap-Chee Tsui den Gendefekt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 nachwies (16-18).

### 2.1.3 Epidemiologie

Die Mukoviszidose ist die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung unter Kaukasiern. Die Erkrankungsquote liegt bei etwa 1 zu 3500 Lebendgeborenen (19). Deutlich seltener tritt die zystische Fibrose bei anderen Bevölkerungsgruppen auf: in der schwarzen Bevölkerung liegt die Inzidenz bei etwa 1 zu 15000 Lebendgeburten und unter Asiaten bei 1 zu 10000 (20-22).

Rund 10000 Menschen leben in Deutschland mit dieser bisher unheilbaren Erbkrankheit (Statistisches Bundesamt Deutschland, Zweigstelle Bonn, H101 – Krankenhausstatistik, Todesursachenstatistik).

Die Genträgerfrequenz (Heterozygotie) an klinisch gesunden Genträgern beträgt in europäischen Populationen etwa 1:20 bis 1:30 (15).

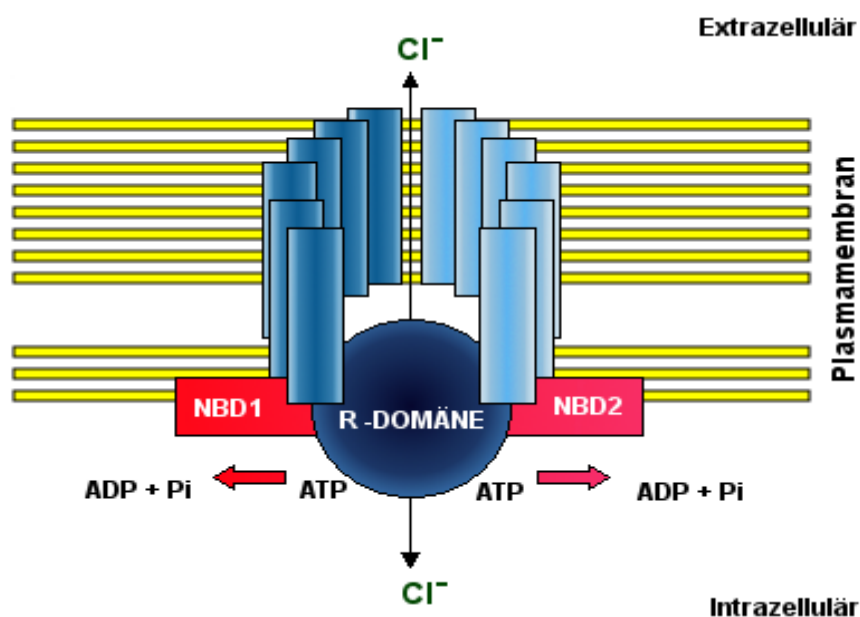
### 2.1.4 Genetik

Die zystische Fibrose wird autosomal-rezessiv vererbt. Das für den molekularbiologischen Defekt verantwortliche Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 in der Position 7q31-32 lokalisiert. Das betroffene CFTR-Gen (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) kodiert ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes Protein. Dabei handelt es sich um ein integrales Protein, welches zu den cAMP-regulierten Ionenkanälen gehört. Es besteht aus zwei Untereinheiten, die aus jeweils sechs Transmembrandomänen zusammengesetzt sind und den eigentlichen Transportkanal bilden. Zusätzlich verfügt das Protein über zwei Nukleotid-Bindedomänen (NBD 1 und 2) und eine zytoplasmatische regulatorische Domäne (R-Domäne). Die R-Domäne wird durch die Proteinkinase A phosphoryliert und somit aktiviert. Das CFTR-Protein besitzt noch weitere Bindedomänen für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Auf diese Weise reguliert es unter anderem den Transport von Bikarbonat. Es zählt zudem zu den Mitgliedern der ATP-bindenden ABC-Transporter (23). Der CFTR-Transporter befindet sich an der apikalen Membran sekretorischer Epithelzellen der Atemwege, des Pankreas, der Schweißdrüsen, des Darmes, der Gallengänge sowie der Vasa deferentia.

Durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels wird der CFTR-Kanal aktiviert. Die nachfolgende  $\text{Cl}^-$ -Sekretion durch den Kanal führt zur Ausbildung eines negativen luminalen Potentials sowie zu einem osmotischen Gradienten, der die Sekretion von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}_2\text{O}$  auslöst und den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch erleichtert. Dadurch wird ein alkalischer pH-Wert aufrechterhalten und das Sekret bleibt dünnflüssig.

Durch Veränderungen des CFTR-Gens wird das CFTR-Protein modifiziert und die Kanalfunktion bleibt aus. CFTR-Mutationen schränken auf diese Weise den Chloridionen-Transport aus der Zelle ein oder bringen ihn zum Erliegen. Daraus resultiert ein Konzentrationsunterschied, da sich viele Ionen in der Zelle, aber nur wenige im Sekret befinden. Aufgrund der in der Zelle vorherrschenden osmotischen Kräfte wird dem Sekret Wasser entzogen. Das Sekret wird viskös, kann dadurch schlecht abgebaut werden und verstopft so die Gänge verschiedener exokriner Drüsen im menschlichen Körper.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft den strukturellen Aufbau eines CFTR-Kanals innerhalb der Zellmembran.



**Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines CFTR-Kanals innerhalb der Zellmembran.**

Zu sehen sind die beiden Membrandomänen des CFTR-Kanals (hier in hell- und mittelblau dargestellt), welche aus jeweils sechs Transmembrandomänen zusammengesetzt sind. Sie bilden den Ionenkanal. Zusätzlich sind die Nukleotid-Bindedomänen (NBD1, NBD2) in roter Farbe abgebildet. Die zytosplasmatische regulatorische Domäne (R-Domäne) ist in dunkelblau dargestellt. Das an die Nukleotidbindungsfalten NBD1 und NBD2 bindende ATP wird für das Öffnen und Schließen des Kanals benötigt.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Abbildung wurde modifiziert nach <http://users.ox.ac.uk/~genemed/cysticfibrosis/protein.html> [zuletzt abgerufen am 16.06.2014]



Bisher konnten über 1300 Mutationen auf dem CFTR-Gen nachgewiesen werden. Die mit etwa 70-75% häufigste Mutation des CFTR-Gens ist die  $\Delta F508$ -Mutation.  $\Delta F508$  bezeichnet das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin in der Position 508 im Protein. Andere häufige Mutationen in Deutschland sind R553X; CFTRdele2, 3 (21kb), R347P, G551D, G542X, N1303K und 3849+10kb C-T (15).

Es ist bisher nicht gelungen, eine strenge Assoziation zwischen Genotyp (Mutation) und einer der vielen klinischen Ausdrucksformen (Phänotyp) nachzuweisen.

### 2.1.5 CF-assoziierte Leberbeteiligung (CFLD)

Bei der CF-assoziierten Lebererkrankung (CFLD) kommt es typischerweise zu einer zunächst lokal begrenzten biliären Zirrhose, welche durch eine Obstruktion der Gallenkanäle sowie durch eine fortschreitende periportale Fibrose ausgelöst wird.

Eine Leberbeteiligung findet sich bei etwa einem Drittel der CF-Patienten. Sie stellt neben respiratorischen Ursachen einen wichtigen Grund für eine erhöhte Mortalität dar (Mortalität 2,5 %) (7).

#### 2.1.5.1 Pathogenese der CFLD

Im hepatobiliären System ist der CFTR-Kanal ausschließlich an der apikalen Membran der Cholangiozyten und im Gallenblasenepithel, nicht aber auf den Hepatozyten lokalisiert (1).

Aufgabe des CFTR-Kanals ist es, die Flüssigkeits- und Elektrolytkonzentration der Galle zu regulieren. Fehlt dieser Kanal oder ist seine Funktion gestört, resultieren daraus vielfältige pathologische Veränderungen.

Histologische Umbauvorgänge im Bereich der Cholangiozyten (wie beispielsweise irreguläre Formen, Nekrose sowie periduktale Kollagenablagerungen) konnten regelmäßig bei CF-Patienten nachgewiesen werden (24). Die abnorm veränderten Cholangiozyten scheinen dabei den ersten Schritt in der Entwicklung einer periportalen Fibrose darzustellen (2).

Des Weiteren führen Störungen der Muzinproduktion zu einer erhöhten Viskosität der Gallenflüssigkeit (25;26).

Die Akkumulation von eosinophilem Material und die damit verbundene Verlegung der Gallengänge ist eines der frühesten histologischen Merkmale, die bei Säuglingen und Kindern mit zystischer Fibrose gefunden wurden (27).

Sie erhöht die Anfälligkeit des Gallengangepithels gegenüber pathogenen Keimen und ermöglicht so eine Schädigung durch zytotoxische Komponenten. Periduktale Entzündung, Gallengangsproliferation und periportale Fibrose sind die Folgen.

Für die Entwicklung der Leberläsionen im Rahmen der CFLD scheint die Aktivierung von Kupffer-Zellen sowie von hepatischen Sternzellen, die darauf mit einer Kollagensynthese reagieren, mitverantwortlich zu sein. Die Aktivierung der Sternzellen kann auf unterschiedliche Weise verursacht werden. Sokol und Durie vermuten eine direkte Schädigung der Cholangiozyten mit nachfolgender Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (28). Eine weitere Option wäre die sekundäre Schädigung der Hepatozyten – u. a. hervorgerufen durch die Retention hydrophober Gallensäuren – die ebenfalls zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Produkten der Fettperoxidation führt (29).

Dieser Prozess beginnt zunächst lokal begrenzt in der Leber, nahe der Periportalfelder. Er wird daher als fokale biliäre Zirrhose bezeichnet, die sich weiter zu einer multilobulären Zirrhose ausbreitet.

Diese imponiert weniger durch Probleme seitens der hepatozellulären Insuffizienz als durch portale Hypertonie und Splenomegalie sowie deren Komplikationen (Panzytopenie und Blutgerinnungsstörungen). Ein palpabler und sonographisch messbarer Hypersplenismus zählt zu den späten Zeichen einer bereits fortgeschrittenen portalen Hypertension. Dies gilt ebenfalls für die Thrombozytopenie, die eine Blutung aus Ösophagusvarizen, eine weitere Komplikation des Pfortaderhochdrucks, oft unstillbar macht.

Die Entwicklung einer Leberzirrhose über die Stadien der Cholestase und Fibrosierung kann Jahrzehnte dauern und sollte als Kontinuum angesehen werden (28).

Bei einer Minderheit der CF-Patienten, insbesondere bei Kindern, kann die Lebererkrankung jedoch auch rasch progredient verlaufen und somit das dominierende Problem darstellen. Der Grund für eine derartig rasche Progredienz konnte noch nicht evaluiert werden.

Eine spezifische CFTR-Mutation, die für das Auftreten oder die Schwere einer CFLD verantwortlich ist, scheint nicht zugrunde zu liegen (30;31). Man vermutet vielmehr einen multifaktoriellen Prozess (2).

Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer Lebererkrankung sind vielfältig. Dazu zählen eine Pankreasinsuffizienz, eine schwere Mutation, das männliche Geschlecht, ein post partum aufgetretener Mekoniumileus und das Alter bei Diagnosestellung (3;29-31).

Einige dieser Risikofaktoren – insbesondere der Mekoniumileus – werden allerdings kontrovers diskutiert (4;31;32).

CF-Gen-unabhängige Erbfaktoren (so genannte *modifier genes*) könnten einen zusätzlichen Einfluss auf Art und Ausmaß der CFLD haben (33).

Gen-Polymorphismen, die zu einer Überregulierung von Entzündung und Fibrose führen, sowie oxidativer Stress könnten ebenfalls eine Rolle spielen (34).

#### 2.1.5.2 Prävalenz der CFLD

Die Datenlage bezüglich der Prävalenz der CFLD variiert sehr stark. Dies kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche diagnostische Kriterien angewandt werden und dass verschiedene Studienpopulationen untersucht wurden. Es hat den Anschein, dass die Prävalenz vom Kindes- zum mittleren Erwachsenenalter zunimmt. Danach scheint es keinen weiteren signifikanten Anstieg zu geben (35). Unlängst wurden prospektive Studien zur Bewertung der Inzidenz und der Risikofaktoren für die Entwicklung einer CFLD durchgeführt. Eine langfristige Follow-up-Studie, die mit diversen Kohorten an CF-Patienten durchgeführt wurde, deren „Leber-Status“ man genauestens untersucht hat, ergab eine Inzidenz zwischen 27 und 35% (3;4;36).

Studienberichten zufolge zählt die Hepatopathie zu den frühen Komplikationen der Mukoviszidose, wobei die Risikofaktoren für eine Leberschädigung bereits seit frühester Kindheit bestehen.

#### 2.1.5.3 Auswirkungen der CFLD

Eine CFLD entwickelt sich in der Regel vor der Pubertät. Sie verläuft meist asymptomatisch und zeichnet sich durch eine langsame Progredienz aus. In erster Linie tritt die Leberbeteiligung durch eine tastbare Hepatomegalie, die während der routinemäßigen körperlichen Untersuchung entdeckt wird, in Erscheinung.

Eine Hepatomegalie ist häufig, geht jedoch nicht immer mit einer Veränderung der Leberhistologie oder einer Erhöhung der Leberwerte im Serum der Patienten einher.

Bisher geht man von der Theorie aus, dass sich die Leberzirrhose aus einer zunächst begrenzten biliären Fibrose entwickelt. Dennoch findet dieser Prozess nur bei etwa 10% der Patienten statt (4).

Im Gegensatz zu anderen Lebererkrankungen stellt das Leberversagen bei zystischer Fibrose ein eher spätes Ereignis dar. Weitaus häufiger sind hämodynamische Komplikationen, wie die frühe Entwicklung eines Pfortaderhochdruckes, die zur Ausbildung von Ösophagusvarizen führt (37-39).

Eine 2005 durchgeführte Fall-Kontroll-Studie hat die Auswirkungen von CF-assozierten Varizenblutungen untersucht (39). Sie zeigte, dass Varizenblutungen im Mittel in einem Alter von 20 Jahren auftreten (9,7 bis 30,9 Jahre). Die mittlere Überlebenszeit nach der ersten Episode einer solchen Blutung lag, laut Studienergebnissen, bei 8,4 Jahren. Bei Leberzirrhose anderer Genese betrug die 1-Jahres-Überlebensrate nur 34% (40).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Varizenblutung bei gleichzeitigem Fehlen einer dekompensierten Leberzirrhose dennoch mit einem Langzeitüberleben der CF-Patienten vereinbar ist (39).

Haben sich erst einmal eine Zirrhose sowie eine portale Hypertension ausgeprägt, besteht für die CF-Patienten ein erhöhtes Risiko, verschiedene extrahepatische Komplikationen zu entwickeln. Hierzu zählen unter anderem eine zunehmende Unterernährung, eine hepatische Osteodystrophie sowie eine Verschlechterung des Lungenstatus.

Die Pathogenese der Unterernährung bei Patienten mit CFLD ist multifaktoriell. Sie beinhaltet einen erhöhten Ruheenergieverbrauch, Malabsorption – verursacht durch die Effekte der Cholestase sowie durch eine Pankreasinsuffizienz – und eine mangelhafte Aufnahme und Metabolisierung von Nährstoffen (41).

Viele der CF-Patienten bilden eine dekompensierte Leberinsuffizienz erst im Erwachsenenalter aus. In der Regel dann, wenn auch die Entwicklung einer Glukoseintoleranz und eines Diabetes mellitus häufiger auftreten. Ferner kann eine bereits fortgeschrittene CFLD eine Insulinresistenz hervorrufen und stellt somit einen Risikofaktor für die Ausbildung eines CF-assozierten Diabetes mellitus dar (42). Die Existenz einer CFLD scheint kein zusätzlicher Risikofaktor für die Ausbildung einer gestörten Knochenmineralisation zu sein (43).

Dennoch zeigten Colombo und Kollegen, dass sich schwere Osteopenien bei einer Gruppe von Patienten mit multilobulärer Zirrhose und portaler Hypertension beobachten lassen. Diese Osteopenien besserten sich signifikant nach einer Lebertransplantation, nicht aber nach konservativer Therapie (44). Dies ist vermutlich auf eine Wiederherstellung der Leberfunktion und des Galleflusses nach der Transplantation zurückzuführen.

In Bezug auf die Lunge können eine Leberzirrhose und ein Pfortaderhochdruck zu einer Verschlechterung des respiratorischen Status führen. Die Ursachen hierfür sind in der Hepatomegalie, einem sich ausbildenden Aszites und im Auftreten intrapulmonaler Shunts zu sehen. Des Weiteren kann es zu wiederholten respiratorischen Infektionen mit multiresistenten Keimen kommen, die häufige Hospitalisierungen und eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität nach sich ziehen (2).

## 2.2 Diagnose der CFLD

Die genaue Kenntnis des Fibrosestadiums ist von entscheidender Bedeutung für Prognose, Verlauf sowie Therapieindikationen bei Patienten mit CFLD. Jährliche Screeninguntersuchungen zur Erfassung präsymptomatischer Zeichen sind daher empfehlenswert.

CFLD-Patienten sollten einer sorgfältigen Überprüfung bzgl. der Entwicklung einer Leberzirrhose, einer portalen Hypertension oder eines Leberversagens unterzogen werden (45).

In der Vergangenheit wurde die Diagnose einer CFLD meist aufgrund von Komplikationen einer portalen Hypertension oder einer terminalen Leberinsuffizienz gestellt. Heute führen bereits eine persistierende Hepatomegalie, eine Splenomegalie oder aber eine dauerhafte Leberenzymhöhung zu einer weiterführenden Diagnostik.

### 2.2.1 Körperliche Untersuchung

Die körperliche Untersuchung der CF-Patienten im Hinblick auf Veränderungen im Bereich der Leber stellt einen wichtigen Schritt zur Erkennung und Verlaufsbeobachtung einer Hepatopathie dar. Dabei sollte das Augenmerk des Untersuchers v. a. auf die Lebergröße sowie auf die Struktur und die Konsistenz des Leberrandes gelegt werden. Das Auftreten einer Splenomegalie bei einem Patienten mit vermuteter Leberbeteiligung sollte den Arzt dazu verleiten, an die Entwicklung einer portalen Hypertension zu denken. Eine sorgfältige Untersuchung hinsichtlich verschiedener Leberhautzeichen (Spider naevi, Palmarerythem, Ikterus etc.) sollte sich anschließen (45).

## 2.2.2 Invasive Diagnostik

### 2.2.2.1 Leberbiopsie

Bisher gilt die Entnahme von Biopsaten aus der Leber als Goldstandard zur Beurteilung des Fibrorestadiums.

Die Biopsie liefert wichtige Informationen über die in der Leber vorherrschende Schädigung (Leberverschattung oder lokalisierte biliäre Zirrhose) sowie über die Ausdehnung der periportal Fibrose (46).

Weiterhin können Aussagen über die Ausbreitung des fibrotischen Prozesses in der Leber und über das Ansprechen auf eine adäquate Therapie getroffen werden.

In der folgenden Tabelle sind die technischen Voraussetzungen zur Anfertigung sowie Aufarbeitung und Beurteilung von Leberbiopsaten aufgeführt.

<b>Technische Voraussetzungen</b>
<b>1. Biopsie</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>genügende Größe des entsprechenden Biopsates (Länge <math>\geq</math> 15 mm, Durchmesser: 1,2-1,8 mm)</b></li><li>- <b>zügige, adäquate Fixation (empfohlen wird eine neutralgepufferte 2,5- bis 4%-ige Formaldehydlösung = 6,25- bis 10%-iges Formalin)</b></li><li>- <b>umfassender Untersuchungsauftrag inklusive aller relevanten klinischen Fragestellungen und Daten sowie serologischen Parameter</b></li></ul>
<b>2. Bearbeitung und Beurteilung</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>genügende Zahl an Schnittstufen (mind. 8)</b></li><li>- <b>ausreichende Färbungen (zumindest HE-, Faser- und Eisenfärbung, empfohlen: (D-)PAS-Färbung)</b></li><li>- <b>umfassende Beurteilung unter Berücksichtigung der Parameter Chronizität, Grading, Staging und Ätiologie</b></li></ul>

**Tabelle 1: Technische Voraussetzungen einer Leberbiopsie; Kriterien zur Bearbeitung und Beurteilung von Leberbiopsaten (47)**

Ein Nachteil der Leberbiopsie ist ihre Invasivität. Daher ist dieses Verfahren häufig mit Unannehmlichkeiten für den Patienten und in seltenen Fällen auch mit schwerwiegenden Komplikationen verbunden. Bei 10-30% der Patienten tritt nach einer Biopsie ein postinterventioneller Schmerz auf, in circa 0,1-0,01% der Fälle hat eine Biopsie sogar einen tödlichen Ausgang zur Folge (48).

Ferner wird die Aussagekraft des bioptisch gewonnenen Materials durch Intra- und Interbeobachter-Variabilität und Probenfehler eingeschränkt (9;10;49-55).

Der Probenfehler (*sampling error*) beruht unter anderem darauf, dass ein Leberbiopsat nur etwa einem 25000-stel bis einem 50000-stel der Leber entspricht (9). Darüber hinaus beträgt die Variabilität der histologischen Beurteilung selbst bei erfahrenen Pathologen bis zu 20% (56).

Hinzu kommt, dass der fibrotische Umbau des Lebergewebes insbesondere in frühen Krankheitsstadien sehr inhomogen verläuft. Die Leberfibrose entwickelt sich zunächst fokal begrenzt und beginnt meist in der Nähe der Portalfelder. Daher muss bereits bei der Gewinnung eines Leberbiopsats mit einer gewissen Fehlerquote gerechnet werden. So konnten Studien in 10-28% von perkutanen Leberbiopsien einen Unterschied von mindestens einem Fibrorestadium aufzeigen (49;54). Laparoskopische Studien konnten wiederum eine Diskrepanz von mindestens einem Fibrorestadium in 33% der Biopsien aus dem rechten und linken Leberlappen nachweisen (53).

In einer Simulationsstudie an über 10000 virtuellen Leberbiopsien aus 17 Leberresektaten konnten Bedossa et al. zeigen, dass die Genauigkeit des Fibrorestagings mit der Länge von simulierten Biopsiezylindern in engem Zusammenhang steht (10). Zu diesem Zweck wurden 17 Leberresektate von Patienten mit chronischer Hepatitis C in unterschiedlichen Fibrorestadien retrospektiv untersucht. Die Leberresektionen wurden in erster Linie aufgrund benigner sowie maligner Tumoren durchgeführt. Die Resektate wurden unter dem Mikroskop in optische Felder unterteilt, die von ihrer Fläche her Leberstanzylindern unterschiedlicher Länge entsprachen. Bedossa und Kollegen fanden heraus, dass eine korrekte Diagnose des Fibrorestadiums in nur 65% der Biopsien mit einer Länge von 15 mm und in 75% der Biopsien mit einer Länge von 25 mm gestellt werden konnte.

Für das exakte Staging einer Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C werden momentan eine Biopsielänge von  $\geq 20$  mm und/oder 11 komplette Portalfelder gefordert (57). Es wird jedoch eingeräumt, dass diese Länge selbst an hepatologischen Spezialzentren nur in der Minderheit der Biopsien erreicht wird.

Die Aussagekraft der Leberbiopsie wird auch dadurch limitiert, dass sehr heterogene Scoring-Systeme existieren.

Der Schweregrad einer Fibrose wird histopathologisch meist anhand eines semi-quantitativen Scorings bestimmt. Je nach Erkrankungsentität existieren unterschiedliche Scoring-Systeme.

Bei chronischer Virushepatitis wird das Fibrosestadium entweder auf einer fünfstufigen Skala (F0-F4) nach Knodell (58), Scheuer (59) bzw. METAVIR (60) klassifiziert oder auf einer siebenstufigen Skala (F0-F6) nach Ishak (61).

Dabei entspricht F2-F4 (bzw. F3-F6) einer klinisch relevanten Fibrose, F3-F4 (bzw. F4-F6) einer schweren Fibrose und F4 (bzw. F5-F6) einer Zirrhose (48).

Im Folgenden ist eine Tabelle der histologischen Klassifikationssysteme zur Einschätzung des Fibrosestadiums am Beispiel der chronischen Virushepatitis aufgeführt.

<b>Fibrose-stadium</b>	<b>Desmet &amp; Scheuer</b>	<b>Knodell</b>	<b>Ishak</b>	<b>METAVIR*</b>
<b>0</b>	keine Faser Vermehrung	keine Fibrose	keine Fibrose	keine Fibrose
<b>I</b>	Faser Vermehrung im Bereich der Portalfelder	Faser Vermehrung	Faser Vermehrung einiger Portalfelder +/- kurze Septen	Faser Vermehrung im Bereich der Portalfelder
<b>II</b>	(in-)komplette portoportale Septen, erhaltene Architektur	n. d.	Faser Vermehrung vieler Portalfelder +/- kurze Septen	portale Faser Vermehrung mit vereinzelt Septen
<b>III</b>	septenbildende Faser Vermehrung mit Architektur störung	portoportale oder portozentrale Septenbildung	portale Faser Vermehrung mit portoportalen Septen	viele Septen ohne Zirrhose
<b>IV</b>	Zirrhose	Zirrhose	portale Faser Vermehrung mit ausgeprägter Septenbildung	Zirrhose
<b>V</b>	n. d.	n. d.	ausgeprägte Septen mit einzelnen Knoten (inkomplette Zirrhose)	n. d.
<b>VI</b>	n. d.	n. d.	Zirrhose	n. d.

**Tabelle 2: Histologische Klassifikationssysteme zur Einschätzung des Fibrosestadiums; hier am Beispiel der chronischen Virushepatitis. [modifiziert nach (62)]**

Abkürzungen: n. d. = nicht definiert. \* = nur validiert bei chronischer Hepatitis C



## 2.2.3 Nicht invasive Diagnostik

In den vergangenen Jahren sind vermehrt nicht invasive Marker und Verfahren zur Evaluation des Fibrosestadiums zum Einsatz gekommen. Die unterschiedlichen Forschungsansätze beinhalten indirekte sowie direkte Serumfibrosemarker, Kombinationsmarker, bildgebende Verfahren und nicht zuletzt die transiente Elastographie (9).

### 2.2.3.1 Indirekte Fibrosetests

Die indirekten Fibrosetests basieren auf einer Kombination von Routinelaborparametern, die verschiedene Aspekte der Leberfunktion bzw. deren Funktionsverschlechterung beleuchten. Ihre Bestimmung ist in der Regel kostengünstig. Nachfolgend sollen einige Tests vorgestellt werden.

#### ***AST/ALT-Ratio***

Die AST/ALT-Ratio (AAR) – auch bekannt als De-Ritis-Quotient – wurde bereits vor mehr als 30 Jahren als Fibrosemarker beschrieben. Sie gibt das Verhältnis der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) an, das Hinweise auf die zugrunde liegende Erkrankung in der Leber geben kann. Der Referenzbereich der dimensionslosen AAR liegt zwischen 0,6 und 0,8.

Vereinfachend lässt sich sagen, dass eine kleine AST/ALT-Ratio ( $<1$ ) für einen eher geringen Leberschaden, wie beispielsweise im Rahmen einer Virushepatitis spricht. Wohingegen ein großer De-Ritis-Quotient auf einen schwerwiegenden Leberschaden (z. B. eine Leberzirrhose) hinweisen kann (63;64). Dieses Phänomen beruht auf einer vermehrten Freisetzung der mitochondrialen AST, einer verminderten AST-Clearance und/oder einer gestörten ALT-Synthese bei fortgeschrittener Leberläsion.

Die AST/ALT-Ratio findet überwiegend in der Leberdiagnostik Anwendung, um eine Aussage über die Schwere einer Hepatozytenläsion bzw. Leberzellnekrose treffen zu können. Die Aspartat-Aminotransferase ist zwar nicht leberspezifisch (65), liegt aber zu 80% in den Mitochondrien sowie zu ca. 20% im Zytoplasma vor. Die Alanin-Aminotransferase allerdings ist nahezu leberspezifisch (65) und weist ihre höchste Aktivität in den Hepatozyten auf. Dabei befinden sich 20% der ALT in den Mitochondrien und 80% im Zytoplasma. Je mehr mitochondriale Enzyme also freigesetzt werden, desto schwerwiegender ist die Hepatopathie.

### **Thrombozytenzahl**

Chronisch dekompensierte Hepatopathien gehen häufig mit spezifischen Gerinnungsstörungen einher. Bei ca. 40% der Leberzirrhotiker lässt sich eine verlängerte In-vivo-Blutungszeit (> 9 min) sowie eine Thrombozytopenie nachweisen (66). Das Ausmaß der Thrombozytopenie korreliert meist gut mit dem Child-Pugh-Stadium, einem Scoring-System zur Stadieneinteilung der Leberzirrhose (67).

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Child-Pugh-Kriterien zur Einteilung des Schweregrades einer Leberzirrhose:

	<b>1 Punkt</b>	<b>2 Punkte</b>	<b>3 Punkte</b>
<b>Albumin i. S. [g/dl]</b>	>3,5	2,8 – 3,5	<2,8
<b>Bilirubin i. S. [mg/dl]</b>	<2,0	2,0 – 3,0	>3,0
<b>Quick [%]</b>	>70	40 - 70	<40
<b>Aszites (Sono)</b>	0	leicht	mittelgradig
<b>Enzephalopathie</b>	0	I - II	III - IV

Addition der Punkte: Child A = 5-6

Child B = 7-9

Child C = 10-15

**Tabelle 3: Child-Pugh-Kriterien** [modifiziert nach (67)]

Typisch für die Zirrhose ist eine Thrombozytopenie, die häufig mit einer Splenomegalie und einer portalen Hypertension einhergeht. Die Ursache für die Thrombozytopenie kann sowohl in einem splenomegalen Pooling als auch in einer verminderten Thrombopoetinsynthese gesehen werden.

Lackner et al. legten fest, dass Thrombozytenzahlen  $< 150 \cdot 10^9/l$  für eine signifikante Fibrose sprechen, wohingegen bei Werten  $\geq 150 \cdot 10^9/l$  eine Zirrhose ausgeschlossen sei (68).

### **AST-to-Platelet-Ratio-Index (APRI)**

Der AST-to-Platelet-Ratio Index – kurz APRI – wurde 2003 von Wai und Kollegen an der Ann Arbor Universität beschrieben (69;70).

Der APRI errechnet sich wie folgt:

$$APRI = \frac{\frac{AST}{\text{obere Normgrenze}}}{\text{Thrombozytenzahl} \left[ \frac{10^9}{l} \right]} \times 100$$

#### **Abbildung 2: Formel zur Berechnung des APRI (70)**

Unter Verwendung optimierter Cut-off-Werte konnten im Rahmen der Studie von Wai und Kollegen eine signifikante Fibrose bei 51 % und eine Zirrhose sogar bei 81 % der Patienten mit chronischer Hepatitis C korrekt vorausgesagt werden. Die Area under the curve (AUC) für den APRI-Score zur Vorhersage einer signifikanten Fibrose und Zirrhose betrug 0,88 und 0,94 (70). Die Aussagekraft des APRI wurde durch mehrfache externe Validierung bestätigt (68;71;72).

In einer Studie an 55 erwachsenen CF-Patienten untersuchten Karlas et al. die diagnostische Aussagekraft nicht invasiver Fibrosetests. Sie bestimmten dazu in ihrem Patientenkollektiv den APRI-Score sowie den Forns Index.

Zudem wurden alle Patienten der transienten Elastographie sowie der ARFI (acoustic radiation force impulse imaging) zugeführt. Die Fibrosetests zeigten dabei eine vergleichbare Messgenauigkeit für die Ermittlung einer CFLD sowie einer Leberzirrhose wie die transiente Elastographie und der ARFI. In der untersuchten Kohorte erzielte der APRI-Score die beste Leistung. Er stellt somit eine sinnvolle und leicht durchführbare Alternative zur nicht invasiven Untersuchung der Hepatopathie bei erwachsenen CF-Patienten dar. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der APRI-Score nicht dazu geeignet ist, eine Leberbeteiligung bei Kindern mit zystischer Fibrose nachzuweisen (13).

Dieser Unterschied könnte durch die altersabhängigen Serumspiegel der Aminotransferasen und der Thrombozyten (73) erklärt werden, was wiederum zu ungenauen oberen Normwerten und einer sich daraus ergebenden Beeinträchtigung der diagnostischen Güte führen kann (74).

#### **Fibrotest**

Französische Forscher entwickelten den Fibrotest, ein Panel von 5 Markern ( $\alpha$ 2-Makroglobulin, Haptoglobin, Apolipoprotein A1,  $\gamma$ GT und Gesamtbilirubin) zur Beurteilung einer Leberzirrhose.

Die Berechnung des Fibrotests erfolgt durch einen patentierten Algorithmus. Der Fibrotest wurde bei chronischer Hepatitis C in mehreren Studien und in einer Metaanalyse validiert (71;72;75). Mögliche Störfaktoren des Tests stellen eine Hämolyse (Haptoglobin), das Gilbert-Meulengracht-Syndrom (Bilirubin) sowie eine kürzlich stattgefundene bzw. aktuelle Infektion ( $\alpha$ 2-Makroglobulin) dar (48).

### 2.2.3.2 Direkte Fibrosetests

Das wachsende Verständnis über die Pathogenese des fibrotischen Umbaus innerhalb der Leber hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren verstärkt nicht invasive Fibrosebiomarker entwickelt wurden, die den fibrotischen Prozess widerspiegeln. Als Fibrosemarker (Biomarker) bezeichnet man die Serumspiegel verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix (ECM).

Der Prozess der Fibrosierung beruht dabei auf einem Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau verschiedener extrazellulärer Matrixproteine durch hepatische Sternzellen. Daraus resultiert wiederum eine gesteigerte Ablagerung von Matrixproteinen. Man unterscheidet zwei Arten von Fibrosebiomarkern.

Klasse I Fibrosebiomarker entstammen – pathophysiologisch betrachtet – dem Umsatz der ECM sowie von veränderten fibrogenen Zellen, insbesondere den hepatischen Sternzellen und den (Myo-) Fibroblasten (76). Sie spiegeln die Aktivität des fibrogenen sowie des fibrolytischen Prozesses und damit den Umbau der ECM wider.

Klasse I Fibrosebiomarker deuten dabei nicht auf das Ausmaß der bindegewebigen Ablagerung, d. h. auf das Fibrorestadium, hin. Zu ihnen zählen u. a. Hyaluronsäure, YKL-40 und Prokollagen-III-Peptid (PIIIP).

Klasse II Fibrosebiomarker erlauben hingegen die Einschätzung des Fibrosegrades (Ausmaß der ECM-Ablagerung) (14).

Mittlerweile existieren mehrere Testbatterien (Kombinationen von Biomarkern) zur Bestimmung einzelner Matrixkomponenten.

Ein möglicher Nachteil der direkten Fibrosetests ist die Beeinflussung durch extrahepatische Faktoren, wie eine systemische Entzündung oder eine Niereninsuffizienz.

### ***Hyaluronsäure***

Als direkter Fibrosemarker eignet sich unter anderem die Hyaluronsäure, welche in vielen verschiedenen Geweben als langkettiges, lineares Polysaccharid vorliegt und vielfältige Funktionen erfüllt. Zur Bestimmung der Hyaluronsäure werden von vielen Firmen Testkits angeboten. Die Aussagekraft hinsichtlich einer Leberfibrose wurde sowohl bei Patienten mit chronischer Hepatitis C (77) als auch bei Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung nachgewiesen (78).

Da der negative Vorhersagewert der Hyaluronsäure wesentlich höher (98%-100%) ist als der positive (61%), liegt der Hauptnutzen der Hyaluronsäurebestimmung im Serum darin, eine fortgeschrittene Fibrose bzw. eine Zirrhose auszuschließen. Die Hyaluronsäure wird von aktivierten Sternzellen gebildet und darauf folgend ins sinusoidale Blutgefäßsystem sezerniert. Dort weist sie eine Halbwertszeit von ca. 2-9 Minuten auf. Diese Eigenschaften der Hyaluronsäure machen sie zu einem viel versprechenden Fibrosebiomarker (14).

### ***Prokollagen-III-Peptid***

Prokollagen-Typ-III wird in Fibroblasten als Vorstufe des Kollagens gebildet und anschließend sezerniert. Bei der Umwandlung in Kollagen werden dabei Propeptide abgespalten.

Die Konzentration des Prokollagen-III-Peptids stellt somit ein Maß für die Synthese des Kollagens Typ-III dar, welches neben Kollagen Typ-I der vorherrschende Kollagentyp in der Leber ist.

Die Prokollagen-III-Peptid-Konzentration zeigt einen engen Zusammenhang mit der vorliegenden Fibrosierung im Rahmen von Lebererkrankungen. Seine Konzentrations-Bestimmung ist daher gut zur Verlaufsbeurteilung fibrosierender Hepatopathien geeignet (79).<sup>2</sup>

Prokollagen-III-Peptid zählt zudem zu einem der meist untersuchtesten Biomarkern einer Leberfibrose (80;81).

### ***YKL-40***

Das Glykoprotein YKL-40 wird hauptsächlich von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie vaskulären, glatten Muskelzellen gebildet.

---

<sup>2</sup> <http://www.labor28.de/pdf/laborinfo/63-prokollagen-III-peptid.pdf> [zuletzt abgerufen am 22.06.2014]

Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Zellproliferation und –differenzierung, der Angiogenese, Entzündungsprozessen, dem Umbau der extrazellulären Matrix sowie der angeborenen Immunantwort (82).

Verschiedene Studien haben erhöhte YKL-40-Konzentrationen bei Patienten mit Hepatopathien nachgewiesen. Rath et al. führten Untersuchungen an Patienten mit chronischer Lebererkrankung unterschiedlicher Ätiologie durch. Ihre Ergebnisse zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der YKL-40-Serumkonzentration und dem histologischen Staging der Leber. Demzufolge stellt YKL-40 einen Parameter mit hoher diagnostischer Aussagekraft für eine fortgeschrittene Hepatopathie dar (83).

### ***Matrixmetalloproteinasen***

Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind eine Gruppe verwandter Enzyme, welche die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen katalysieren. Sie kommen außerhalb der Zelle in der ECM vor.

Im aktivierten Zustand können sie die ECM abbauen und sind somit Teil des Gewebeumbaus. Diese Eigenschaft wurde lange Zeit als einzige Aufgabe der MMPs angesehen. Die Aufgaben der MMPs sind jedoch nicht auf den ECM-Umbau beschränkt. Vielmehr sind die MMPs verantwortlich für die Zellproliferation und -migration, die Aktivierung von Leukozyten sowie die körpereigene Abwehr (84-87).

### ***Tissue inhibitors of metalloproteinases***

Bisher sind vier verschiedene Gewebsinhibitoren, die so genannten TIMPs, bekannt (TIMP-1 bis -4). TIMP-1 sowie TIMP-2 sind in der Lage die Aktivität der MMPs zu hemmen. Auf diese Weise sind sie von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen ECM-Ablagerung und –abbau. Ein beschleunigter Abbau der ECM findet bei vielen pathogenen Prozessen statt; so z. B. Entzündungsprozessen, chronisch degenerativen Erkrankungen sowie der Tumordinvasion (88).

TIMPs verfügen zudem über biologische Aktivitäten, welche unabhängig von den MMPs ablaufen. Dazu zählen u. a. Zellwachstum und –differenzierung, Zellwanderung, Anti-Angiogenese sowie apoptische Prozesse (89).

### ***Fibrospect-II-Test***

Der Fibrospect-II-Test basiert auf einem Panel dreier extrazellulärer Matrixkomponenten (Hyaluronsäure, TIMP-1 und  $\alpha 2$  Makroglobulin) und wurde in mehreren großen Kohorten von HCV-Patienten validiert (90;91). Es zeigte sich, dass der Fibrospect-II-Test zuverlässig zwischen einer moderaten bzw. schweren Fibrose und keiner bzw. milder Fibrose unterscheidet. Eine genaue Abgrenzung zwischen den einzelnen Stadien war jedoch nicht möglich (90).

### 2.2.3.3 Physikalische Methoden

Bildgebende Verfahren wie Sonographie, Magnetresonanztomographie (MRT) und Computertomographie (CT) haben schrittweise an Bedeutung für die Diagnose hepatobiliärer Veränderungen bei CF-Patienten gewonnen.

#### ***Sonographie***

Die sonographische Untersuchung der Leber dient in erster Linie der Diagnose. Sie ist zugleich aber auch ein Hilfsmittel zur gezielten Gewebeprobenentnahme (Biopsie). Eine „gesunde“ Leber stellt sich im Ultraschall schlank mit gestreckter dorsaler und ventraler Kontur dar. Bei einer klinisch manifesten Zirrhose findet eine Verplumpung der Leberkontur statt. Der kaudale Leberrand, der normalerweise in einem Winkel von  $< 45^\circ$  spitz zuläuft, wirkt bei einer Leberzirrhose eher stumpf. Der Lobus caudatus kann vergrößert sein. Kleinere oder größere Unregelmäßigkeiten weisen ebenfalls auf eine Zirrhose hin. Eine vermehrte Echogenität lässt sich sowohl bei einer Leberzirrhose als auch bei einer Fettleber finden (92).

Aubé und Kollegen führten Untersuchungen an Patienten mit chronischer Lebererkrankung viraler und ethyltoxischer Genese durch. Ihren Ergebnissen zufolge lässt sich mithilfe der Sonographie in 82 bis 88% der Fälle richtig einschätzen, ob eine Leberzirrhose vorliegt (93). Die Aussagekraft der Sonographie wird jedoch vor allem durch die Erfahrung des Untersuchers und die Qualität des Ultraschallgerätes beeinflusst.

Obwohl sich die Zeichen einer Fettleber, einer Zirrhose oder einer portalen Hypertension sonographisch sehr präzise darstellen lassen, schließt ein unauffälliger Ultraschallbefund eine signifikante Leberfibrose nicht aus (94).

Sehr gut können mit der Sonographie ein Aszites und eine Splenomegalie erkannt werden. Diese zählen jedoch zu den Komplikationen einer CFLD, die erst relativ spät in Erscheinung treten. Daher ist die Sonographie zur frühen Diagnostik der Leberbeteiligung bei CF-Patienten eher ungeeignet.

### ***MR-Cholangiographie***

Unter Zuhilfenahme der MR-Cholangiographie lassen sich auf nicht invasive Art und Weise Veränderungen in den extra- und intrahepatischen Gallenwegen feststellen. Durieu et al. führten eine Studie mit CF-Patienten durch und konnten Veränderungen der Gallengänge (Verengungen, lokalisierte Strikturen und Dilatationen) bei allen von ihnen untersuchten Patienten mit Leberbeteiligung und bei der Hälfte der Patienten mit klinisch inapparenter Hepatopathie feststellen (95). Einige Studien sind der Auffassung, dass die MR-Cholangiographie eine gute Alternative zur frühen Beurteilung einer Gallengangsschädigung darstellt, wenn andere nicht invasive Methoden unmöglich sind (2).

### ***Szintigraphie***

Tc-99m-markierte Iminodiacetat-Derivate, die man intravenös verabreicht, werden aktiv von Hepatozyten aufgenommen, in die Gallenkanälchen und größeren Gallengänge sezerniert und in der Gallenblase gespeichert. Sie gelangen schließlich über die extrahepatischen Gallenwege ins Duodenum. Auf diese Weise können Informationen über eine intra- oder extrahepatische Gallengangsveränderung (Obstruktion oder Dilatation), eine verzögerte biliäre Sekretion, eine abnorme Gallenblasenfunktion, eine Stenose des Ductus choledochus und ein Vorkommen der Radiopharmaka im Darm gewonnen werden (96;97).

Die Szintigraphie erlaubt zusätzlich Aussagen über die Leberfunktion und das Voranschreiten der Lebererkrankung (98). Ferner ermöglicht sie die Überwachung der Ansprechrate auf eine Therapie mit Ursodesoxycholsäure (99).

### ***ÖGD und ERCP***

Die Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) ist ein Verfahren zum Nachweis von Ösophagusvarizen und einer portalen hypertensiven Gastropathie. Sie wird daher vermehrt zum Nachweis von Komplikationen einer CFLD eingesetzt.

Die ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) ist eine endoskopische und damit invasive Methode zur Darstellung der Gallenwege, der Gallenblase und des Ductus pancreaticus mit Röntgenkontrastmittel.



Sie wird bisher nicht zu Diagnose- oder Screeningzwecken bei zystischer Fibrose angewendet. Die ERCP ist jedoch Untersuchungsmethode der Wahl, um eine distale Stenose des Ductus choledochus, eine sklerosierende Cholangitis oder eine Choledocholithiasis nachzuweisen (29).

### ***Transiente Elastographie***

Während die konventionellen bildgebenden Verfahren vorwiegend eine fortgeschrittene Zirrhose mit Zeichen der portalen Hypertension erfassen können, gelingt die Differenzierung zwischen den einzelnen Fibrorestadien bisher nur unzureichend.

Die transiente Elastographie ist ein relativ neues Verfahren, mit dem der Anteil an Bindegewebe in der Leber festgestellt und somit die Lebersteifigkeit als Maß für eine Leberfibrose gemessen werden kann. Die ersten klinischen Studienergebnisse wurden 2002 veröffentlicht. Ein am Bauch oberhalb der Leber angesetzter Niederfrequenzschallkopf erzeugt einen Impuls, der sich in der Leber ausbreitet. Ein Ultraschalltastkopf misst die Ausbreitungsgeschwindigkeit dieses Impulses im hepatischen Gewebe.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit ist direkt abhängig von der Dichte des Lebergewebes. Da Bindegewebe dichter als hepatisches Gewebe ist, nimmt die Geschwindigkeit mit zunehmender Vernarbung zu (100). So lässt sich aus der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Bindegewebsanteil und damit die Lebersteifheit bestimmen.

Ein Vorteil des Verfahrens ist, dass es sich um eine nicht-invasive Untersuchungsmethode handelt. Der Patient benötigt keine Vor- oder Nachbereitung und spürt während der wenige Minuten dauernden Untersuchung nur das leichte Klopfen des Impulsgebers. Außerdem wird durch die transiente Elastographie ein Großteil der Leber erfasst, während bei einer Punktion nur ein sehr kleiner Teil untersucht wird (9).

Studien haben eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der transienten Elastographie aufgezeigt. Die Durchführung der Untersuchung kann leicht erlernt werden und besitzt eine hohe Intra-Beobachter- (96-98%) und Inter-Beobachter- (89-98%) Übereinstimmung (101).



**Abbildung 3: Fibroscan® 502**

## 3 Patienten und Methoden

### 3.1 Patienten

Im Zeitraum von *Juni 2009 bis Dezember 2010* wurden im Zentrum für Innere Medizin in der Abteilung für Gastroenterologie der Justus-Liebig-Universität Gießen 70 Patienten (37 männliche und 33 weibliche Patienten) mit dem Krankheitsbild zystische Fibrose prospektiv und konsekutiv in die dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie eingeschlossen.

Alle Patienten erhielten vor der Blutentnahme und der anschließenden Elastographieuntersuchung ausreichende Informationen zur Durchführung der Untersuchung sowie zur Bedeutung und Zielsetzung der Studie (siehe Patienteninformation, Einwilligungserklärung). Sie gaben nach ausreichender Bedenkzeit ihr freiwilliges und schriftliches Einverständnis zur Nutzung der Untersuchungsergebnisse für wissenschaftliche Analysen. Die Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (75/09; Sitzung vom 04.06.2009) genehmigt.

Die Diagnose Mukoviszidose war durch den Pilocarpin-Iontophorese-Test (Schweißtest) sowie durch anschließend durchgeführte genetische Untersuchungen bestätigt worden. Der Schweißtest ist ein schmerzfreier und rasch durchführbarer Test, der selbst von Säuglingen gut toleriert wird. Im Schweiß von CF-Patienten wird ein im Vergleich zu Gesunden erhöhter Chlorid-Ionengehalt gefunden.

Die exakte Durchführung des Tests erfordert eine Sammlung des Schweißes über 60 Minuten. Als pathologisch gelten Werte von  $> 60 \text{ mmol Cl}^-/\text{l}$  (102).

Alle Patienten wurden gemäß den europäischen und US-amerikanischen Leitlinien behandelt (103;104). Nach Ausschluss anderer Ursachen für chronische Lebererkrankungen wurde die Diagnose CFLD anhand der neuesten Leitlinien gestellt (45).

Die folgende Tabelle zeigt die diagnostischen Kriterien einer CFLD. Eine CFLD liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Voraussetzungen an zwei aufeinander folgenden Untersuchungen innerhalb eines Jahres erfüllt sind.

- 
- **Körperliche Untersuchung**
    - **Hepatomegalie (Lebergrenze > 2 cm unterhalb des Rippenbogens in der Medioclavicularlinie) nachgewiesen durch sonographische Untersuchung. Ein vergrößert palpabler linker Leberlappen wird häufig im Rahmen einer multilobulären Zirrhose beobachtet.**
    - **Ggf. begleitende Splenomegalie. Ebenfalls verifiziert durch Sonographie.**

- **Abnorm erhöhte Serumspiegel der Leberenzyme (ALT, AST,  $\gamma$ GT) in mindestens 3 aufeinanderfolgenden Messungen in einem Zeitraum von 12 Monaten nachdem andere Gründe einer Hepatopathie ausgeschlossen wurden.**

- **Sonographische Hinweise auf**
  - **eine Leberbeteiligung (erhöhte und/oder heterogene Echogenität, unregelmäßige Leberkontur, noduläres Erscheinungsbild) oder**
  - **eine portale Hypertension (Splenomegalie, ausgeprägte Kollateralkreisläufe, Aszites) oder**
  - **biliäre Veränderungen (Gallengangserweiterung)**

- **Eine Leberbiopsie kann indiziert sein, falls diagnostische Zweifel bestehen.**

---

**Tabelle 4: Diagnosekriterien für eine CFLD (45)**

Das sonographische Erscheinungsbild der Leber wurde in Klassen von 1 bis 5 eingeteilt:

- normal (US1)
- homogen echoreich (US2)
- heterogen (US3)
- nodulär (US4)
- Vorhandensein einer portalen Hypertension (US5)

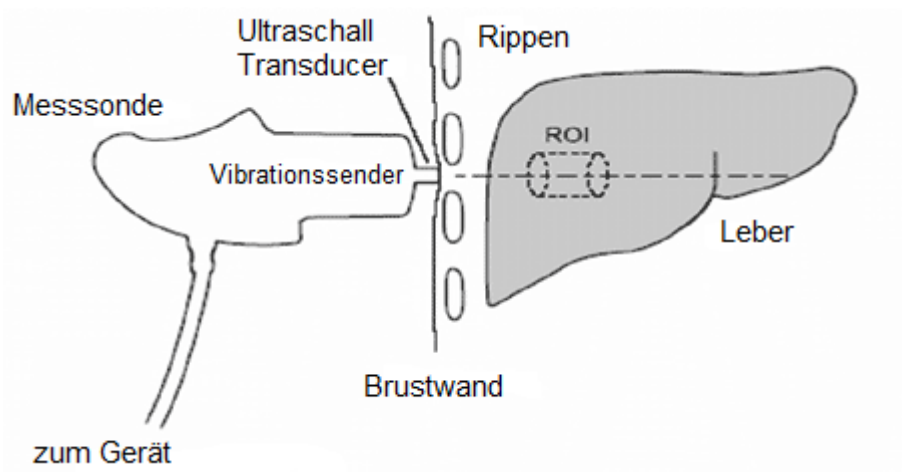
Die Diagnose portale Hypertension (PHT) wurde anhand von klinischen Parametern sowie erhöhten Laborwerten, in Verbindung mit sonographischen und endoskopischen Zeichen der PHT (Splenomegalie, erhöhter Pfortadervenendruck in der Dopplersonographie, Thrombozytenzahl  $<150000/\text{mm}^3$ , Ösophagusvarizen oder andere Zeichen der PHT in der Ösophagoduodenoskopie) gestellt.

## 3.2 Transiente Elastographie

### 3.2.1 Aufbau des Fibroscan® 502

Die transiente hepatische Elastographie (Fibroscan®) ist ein relativ neues Verfahren zur Diagnose einer Leberzirrhose. Das Messgerät besteht im Wesentlichen aus folgenden Elementen:

- einer EDV-gestützten Kontrolleinheit
- einer Messsonde bestehend aus einem niederfrequenten Vibrationssender und einer Ultraschallsonde



**Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Fibroscan®-Messsonde und ihre Positionierung am Patienten während einer Messung**

Abkürzungen: ROI, region-of-interest [modifiziert nach (105)]

Zur Untersuchung der Leber stehen drei ergonomisch geformte Sonden (S-, M- und XL-Sonde) zur Verfügung. Für diese Studie wurde ausschließlich die M-Sonde verwendet. Sie wird für erwachsene Patienten mit einem Thoraxumfang von über 75 cm eingesetzt. Die M-Sonde ermöglicht Messungen in Schichten zwischen 25 und 65 mm unter der Haut.

Die Sonde verfügt über einen auf einem Ultraschallkopf montierten Vibrationsgenerator. Der Vibrationssender löst auf der Körperoberfläche des Patienten einen mechanischen Impuls aus. Durch diesen Impuls wird eine niederfrequente elastische Welle von 3,5 MHz erzeugt, die sich über die Haut und das subkutane Fettgewebe innerhalb des Leberparenchyms mit einer Geschwindigkeit von circa 1 m/s ausbreitet. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der elastischen Welle wird mittels Ultraschallsignal gemessen. Aus der Ausbreitungsgeschwindigkeit ( $V$ ) und der Leberdichte ( $\rho$ ) lassen sich Aussagen über die Steifigkeit ( $E$ ) des Lebergewebes treffen.

Folgende Formel wird für die Berechnung herangezogen:

$$E = 3\rho V^2$$

#### **Abbildung 5: Formel zur Berechnung der Lebersteifigkeit**

$E$  = Steifigkeit

$\rho$  = Leberdichte

$V$  = Ausbreitungsgeschwindigkeit

Auf diese Art und Weise lässt sich die Steifigkeit des Lebergewebes ermitteln, welche in kPa angegeben wird. Dabei sind Ergebnisse bis zu 75 kPa möglich. Die Lebersteifigkeit korreliert wiederum mit dem Fibrorestadium, wobei die Lebersteifigkeit mit zunehmendem Fibrorestadium ansteigt. Je fester bzw. steifer das Lebergewebe, desto schneller breitet sich die elastische Welle innerhalb der Leber aus und desto höher sind die gemessenen Werte in kPa (9).

### **3.2.2 Durchführung der Messungen**

Die Untersuchung der Leber mittels transientser Elastographie (Fibroscan®) erfolgte durch einen rechten Interkostalraum. Während der gesamten Untersuchung lag der Patient auf dem Rücken, den rechten Arm in maximaler Abduktionsstellung, um so einen maximal geweiteten Interkostalraum zu gewähren. Die Messsonde wurde unter Verwendung von etwas Ultraschallgel auf Höhe des Xiphoids im Bereich der rechten mittleren Axillarlinie senkrecht zur Körperoberfläche aufgesetzt.

Mithilfe der M-Mode- (Time-Motion-Mode-) -Technik kann Lebergewebe von anderen Geweben, wie Darm oder Lunge sowie von größeren Gefäßen, welche bei der Untersuchung gemieden werden sollten, unterschieden werden. Eine valide Messung ist nur im Lebergewebe möglich. Messungen in anderen Organen führen zu einer Fehlmessung.

Der Fibroscan® zeigt nach jeder Messung die Steifigkeit E an und berechnet gleichzeitig den Median aller bisher durchgeführten Einzelmessungen. Es werden standardmäßig zehn erfolgreiche Messungen pro Patient gefordert. Die Untersuchung ist nur dann verwertbar, wenn eine Erfolgsrate (*success rate*) von mindestens 60% erzielt wird. Eine Gesamt-Erfolgsrate von 60% kann in 90-96% der Untersuchungen erzielt werden. Die Untersuchung eines Patienten nimmt in der Regel 5-10 Minuten in Anspruch (9;106).

Während ein Leberstanzbiopsiezylinder nur ein Areal von 1:25000-1:50000 der gesamten Leber repräsentiert, umfasst der im Rahmen der transienten Elastographie beurteilte Gewebezylinder ein Areal von 1:500 des Leberparenchyms (9).

### 3.3 Laborgeräte und Materialien

#### 3.3.1 Geräte

Analysewaage Mod. FA 1500-2	Fa. Faust, Schaffhausen/Schweiz
Centrifuge GS-6 KR	Fa. Beckman
Centrifuge Mikro 200 R	Fa. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Eismaschine AF-10	Fa. Scotsman, Vernon Hills/USA
Gefrierschrank (- 80°C)	Fa. Sanyo-Biomedical, Bad Nenndorf
pH-Meter G32	Fa. Metrohn-Herisau, Schweiz
Pipetten Typ Research	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipetten Typ Pipetman	Fa. Gilson, Middleton/USA
Multipette	Fa. Slamed Ing. GmbH Laboratory Instruments
Multipette® Plus	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipetboy Comfort	Fa. Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer	Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau
IKA-Combimag-RCO	Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau
Nikon Coolpix 5400	Fa. Nikon
Perfusor® Spritze	Fa. Braun, Melsungen
Filtriergerät	Fa. NUNC
ELISA Reader Fusion™	Fa. Packard BioScience, Meriden/ USA



### 3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikrozentrifugengefäße	Fa. VWR™, Darmstadt
Reaktionsgefäße Falcon (15ml, 50 ml)	Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA
Millipore Express Plus Membrane 0,22 µm	Fa. Millipore Corporation, Massachusetts/USA
Maxisorb®	Fa. NUNC

### 3.3.3 Chemikalien und Reagenzien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Fa. Serva, Heidelberg
Streptavidin-HRP	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Substrate Reagent Pack	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim

### 3.3.4 Antikörper

Monoclonal Pro-MMP-1 AK	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
<i>(Cat. No. DMP100/ SMP 100/ PDMP100; Lot No. 890755)</i>	
Polyclonal MMP-2 AK	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
<i>(Cat. No. DMP2F0; Lot No. 893693)</i>	
Anti-Human MMP-8 Capture Antibody	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
<i>(Cat. No. DY908; Lot No. 841031)</i>	
Anti-Human MMP-8 Detection Antibody	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
<i>(Cat. No. DY908; Lot No. 841932)</i>	

Anti-Human MMP-9 Capture Antibody <i>(Cat. No. DY911; Lot No. 841028)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human MMP-9 Detection Antibody <i>(Cat. No. DY911; Lot No. 841029)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Monoclonal Pro-MMP-13 AK <i>(Cat. No. DM1300/ SMP1300/ PDM1300; Lot No. 890885)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human MMP-9 Capture Antibody <i>(Cat. No. DY1449; Lot No. 841169)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human TIMP-1 Detection Antibody <i>(Cat. No. DY1449; Lot No. 841170)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human TIMP-1 Capture Antibody <i>(Cat. No. DY970; Lot No. 840294)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human TIMP-1 Detection Antibody <i>(Cat. No. DY970; Lot No. 840295)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human TIMP-2 Capture Antibody <i>(Cat. No. DY971; Lot No. 840528)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-Human TIMP-2 Detection Antibody <i>(Cat. No. DY971; Lot No. 840529)</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Monoclonal Anti-YKL-40 AK <i>(Cat. No. 8020; Lot No. 4629)</i>	Fa. Quidel® Corporation, San Diego/ USA
Monoclonal M30 AK <i>(Cat. No. REF10010)</i>	Fa. Peviva, Bromma/Schweden
Monoclonal "M5" AK <i>(Cat. REF10020)</i>	Fa. Peviva, Bromma/Schweden

### 3.3.5 Kommerzielle Kits

Human pro-MMP-1 Immunoassay	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human MMP-2 Immunoassay	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human total-MMP-8 Immunoassay	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human total-MMP-9 Immunoassay	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human pro-MMP-13 Immunoassay	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human MMP-9/TIMP-1 Complex Immun.	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human TIMP-1 ELISA Kit	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
Human TIMP-2 ELISA Kit	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
MicroVue™ YKL-40 EIA Kit	Fa. Quidel® Corporation, San Diego/ USA
Human Procollagen III ELISA Kit	Fa. Usen Life Science, Wuhan/China
Hyaluronic Acid ELISA Kit	Fa. TECOmedical AG, Sissach/ Schweiz
M30-Apoptosense® ELISA	Fa. Peviva, Bromma/Schweden
M65® ELISA	Fa. Peviva, Bromma/Schweden

## 3.4 Serumproben

### 3.4.1 Gewinnung und Lagerung der Serumproben

Die untersuchten Serumproben stammen von CF-Patienten, die sich in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen in Behandlung befanden. Die Serumproben wurden im Zeitraum von Juni 2009 bis Dezember 2010 gewonnen.

Alle Patienten erhielten ausreichende Informationen zu Durchführung, Bedeutung und Zielsetzung der Studie und gaben ihr freiwilliges und schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Serums für die wissenschaftlichen Untersuchungen.

Die Blutproben wurden durch standardmäßige Venenpunktion gewonnen. Um das Serum zu erhalten, wurden die Blutproben anschließend bei 4°C und ca. 2700 rpm (rounds per minute) zehn Minuten lang zentrifugiert (Centrifuge GS-6 KR; Fa. Beckman). Das gewonnene Serum wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei - 80°C gelagert.

### 3.4.2 Routinelaboruntersuchungen und Bestimmung der Fibrosemarker

Allen Patienten wurde am Tag der Durchführung der transienten Elastographie Blut zur hämatologischen und biochemischen Untersuchung abgenommen. Im Serum der Patienten wurden folgende Fibrosemarker bestimmt: MMP-1, -2, -8, -9, -13 sowie MMP-9/TIMP-1, TIMP-1 und -2, YKL-40, Prokollagen-III-Peptid, Hyaluronsäure sowie M30 (zur Erfassung von löslichem Caspase-gespaltenem Cytokeratin 18) und M65 (zur quantitativen Erfassung von Cytokeratin 18). Die Fibrosebiomarker wurden im Serum der Patienten unter Verwendung von im Handel erhältlichen Kits bestimmt. Dabei wurden die Verdünnungen anhand der Herstellerangaben gewählt.

Die Routineserumparameter (Hämoglobin [mg/dl], Thrombozyten[\*10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>], Bilirubin [mg/dl] etc.) wurden im Labor der Universitätsklinik Gießen (Prof. Dr. med. Harald Renz, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, Baldingerstraße, 35043 Marburg) bestimmt.

## 3.5 Proteinbiochemische Methoden

### 3.5.1 Prinzipien des ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, dessen Prinzip auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. In dieser Studie wurden sowohl das Sandwich-ELISA-Verfahren als auch das Verfahren des kompetitiven Immunoassays genutzt (107).

### 3.5.1.1 Sandwich-ELISA

Diese Technik verwendet zwei Antikörper (AK), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Der Erstantikörper (coating-Antikörper) wird über sein Fc-Fragment spezifisch an die Mikrotiterplatte gebunden.

Durch Zugabe der Standardreihe bzw. des Probenmaterials erfolgt eine Bindung der Antigene an das Fab-Fragment der coating-Antikörper.

Im nächsten Schritt wird ein Detektions-(detection)-Antikörper zugegeben, welcher das Antigen wiederum über sein Fab-Fragment bindet. An das Fc-Fragment dieses zweiten Antikörpers ist das Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP) gebunden. Nun wird das zum Enzym passende chromogene Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) zugegeben. Dieses zunächst farblose Substrat wird durch die HRP zu einem gefärbten Reaktionsprodukt umgesetzt.

Nach einer vom Hersteller vorgegebenen Inkubationszeit wird die ablaufende Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt.

Die optische Dichte der Proben und Standards wird bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450$  nm gemessen.

Aus den aufgetragenen Standardkonzentrationen (x-Achse) und der optischen Dichte (y-Achse) wird eine Standardkurve ermittelt, die eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentrationen ermöglicht.

### 3.5.1.2 Kompetitiver ELISA

In dieser Studie wurde ebenfalls das Verfahren des kompetitiven Immunoassay genutzt. Hierbei wird kein markierter Antikörper verwendet, sondern ein markiertes Kompetitor-Antigen. Dabei handelt es sich um eine synthetische Verbindung, die dem Analyten strukturell sehr ähnlich ist und die Eigenschaft besitzt, ebenfalls am Antikörper zu binden. Dadurch kommt es zu einer Konkurrenz, einem Konkurrieren, zwischen Analyt und Kompetitor um den Bindungsplatz am Antikörper. (Herstellerangaben TECO® Hyaluronsäure, Cat. No. TE1017)

### 3.5.2 Durchführung des ELISA am Beispiel von TIMP-2

Zunächst wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl des in PBS gelösten Capture-Antibodys beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschriffe gemäß den Herstellerangaben.

Durch Zugabe des so genannten Reagent Diluent, einer Lösung, die sich aus 1% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS-Lösung zusammensetzt, wurde die ELISA-Platte geblockt.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erfolgten erneut drei Waschschriffe. Jeweils 5 µl der Proben wurde mit 995 µl Reagent Diluent verdünnt und davon entsprechend 100 µl auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Der Standard wurde in den Konzentrationen 6000 pg/ml, 3000 pg/ml, 1500 pg/ml, 750 pg/ml, 375 pg/ml, 187,5 pg/ml und 93,75 pg/ml in Reagent Diluent hergestellt. Alle Proben und Standards wurden in einer Doppelbestimmung aufgetragen. Nach zwei Stunden Inkubationszeit und wiederholten Waschschriffen konnte die ELISA-Platte mit je 100 µl des Detektionsantikörpers beschichtet werden. Danach erfolgte die Beschichtung der Platte mit Streptavidin-HRP sowie nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten, mit der Substratlösung. Die Substratlösung wurde zu gleichen Teilen aus den im ELISA-Kit enthaltenen Reagent A- und Reagent B-Lösungen gewonnen. Nach Zugeben der Substratlösung färbte sich die Mikrotiterplatte zunächst blau. Nach einer vom Hersteller angegebenen Wartezeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Es zeigte sich ein Farbumschlag zu Gelb.

Die Messung der OD-Werte in den einzelnen Kavitäten der 96-Well-Mikrotiterplatte erfolgte mit dem ELISA Reader Fusion™ der Firma Packard BioScience. Es wurde ein Filter mit 450 nm verwendet. Zusätzlich wurde die optische Dichte (OD) bei einer Referenzwellenlänge von 570 nm bestimmt. Die Ermittlung der Standardkurve wurde mit der Software EasyWin (Fa. Tecan) sowie mit Excel durchgeführt.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die Berechnung der Ergebnisse sowie deren graphische Darstellung erfolgten mit der Software IBM SPSS Statistics Version 21.0.

Die statistische Auswertung von Normalverteilungen erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov Test. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics berechnet. Dabei wurde unter anderem untersucht, ob die Variable „Leberbeteiligung“ (no CFLD, CFLD) normalverteilt ist. In der Ausgabedatei wurden von SPSS die entsprechenden Signifikanzen wiedergegeben. Ein Wert unter 0,05 besagte dabei, dass mit 95% Sicherheit eine Normalverteilung zu verwerfen war. Ein Signifikanzwert unter 0,01 sogar mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 %. Am Beispiel „Leberbeteiligung“ betrug der Signifikanzwert  $< 0,001$ , sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Variable „Leberbeteiligung“ nicht normalverteilt ist. Der optische Nachweis einer Normalverteilung gelang durch Histogramme. Eine Normalverteilungskurve ist i.d.R. glockenförmig angeordnet. Wichen die Balken im Histogramm deutlich von der Normalverteilungskurve ab, konnte davon ausgegangen werden, dass die entsprechende Variable nicht normalverteilt ist.

Die Messwerte der transienten Elastographie sowie der Serumfibrosemarker, die ebenfalls nicht der Normalverteilung entsprachen, wurden mit dem Mann-Whitney U Test beurteilt. Die Ergebnisse wurden als Box-und-Wisker-Plots dargestellt. Mit den Box-und-Wisker-Plots erfolgt die Darstellung von Median, 25%-Perzentil, 75%-Perzentil, Maximum, Minimum sowie Ausreißern. Der schwarze Balken innerhalb des Boxplots kennzeichnet die Lage des Medians. Der Median wird auch als 50%-Perzentile bezeichnet und teilt die Gesamtheit aller erhobenen Werte in zwei Hälften. Die untere Grenze des Boxplots beschreibt die Lage der 25%-Perzentile, die obere Grenze die der 75%-Perzentile. Die Enden der vertikalen Linien zeigen das Maximum und das Minimum der Verteilung an. Die Kreise und Sternchen in den Boxplot-Diagrammen kennzeichnen Werte, die im Verhältnis zu den übrigen Werten der Variablen extrem groß oder klein sind.

Dabei wurden Ausreißer von SPSS mit einem Kreis (○) versehen. Extremwerte, die sehr stark von den übrigen Werten der Variablen abweichen, erhielten zur Kennzeichnung ein Sternchen (\*). Die Zahlen neben den Kreisen und Sternchen entsprechen den Fallnummern in der Datendatei (108).

Ausreißer (○) haben einen Abstand von 1,5 bis 3 Boxlängen von der oberen oder der unteren Begrenzung der Boxen. Signifikanz wurde festgelegt als  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Die diagnostische Güte der transienten Elastographie sowie der Fibrosebiomarker wurde anhand von Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven beurteilt. Die ROC-Kurve stellt eine Methode zur Bewertung sowie Optimierung von Analysestrategien dar. Sie wird eingesetzt, um den bestmöglichen Wert (cut-off-Wert) eines Parameters zu finden. Für jeden möglichen Parameterwert werden dabei die relativen Häufigkeitsverteilungen in Form von Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) sowie Falsch-Positiv-Rate ermittelt. In einem Diagramm werden Sensitivität als Ordinate und Falsch-Positiv-Rate (1-Spezifität) als Abszisse aufgetragen. Die Parameterwerte tauchen selbst nicht auf, können aber als Beschriftung der Punkte verwendet werden. Typischerweise erhält man eine gekrümmte, aufsteigende Kurve. Eine ideale ROC-Kurve steigt initial senkrecht an, da die Trefferquote nahe 100% und die Fehlerquote nahe 0% liegt. Erst im Verlauf steigt die Falsch-Positiv-Rate an und die Kurve flacht ab.<sup>3</sup> Je größer der Abstand der ROC-Kurve von der Diagonalen, desto besser ist die Trennschärfe eines Tests. Ein Maß für die Güte eines Tests ist die Fläche unter der ROC-Kurve (area under receiver operating characteristic curve; AUROC). Sie kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen. Je höher der Wert, desto besser die diagnostische Güte des Tests.<sup>4</sup>

Mit Hilfe der ROC-Analyse wurde in dieser Arbeit der optimale Cut-off-Wert für die transiente Elastographie sowie für ausgewählte Fibrosebiomarker gewählt. Der Cut-off-Wert ist derjenige Wert in einem diagnostischen Test, der zwischen zwei Testergebnissen (positiv, negativ) unterscheidet und damit einen Patienten einem der zwei zu untersuchenden Krankheitszustände (krank, gesund) zuordnet. Ein optimaler Cut-off-Wert zeichnet sich dadurch aus, dass möglichst wenige Patienten falsch eingeordnet werden.

---

<sup>3</sup> [http://de.wikipedia.org/wiki/Receiver\\_Operating\\_Characteristic](http://de.wikipedia.org/wiki/Receiver_Operating_Characteristic) [zuletzt aufgerufen am 11.11.2013]

<sup>4</sup> <http://www.medi-learn.de/humanmedizin/medizinstudium-vorklinik/artikel/ROC-Kurven-Analyse-Seite2.php> [zuletzt aufgerufen am 11.11.2013]



Für die Berechnung des Cut-off-Wertes ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Cut-off-Wert} = 0,5 * (\text{Sensitivität} + \text{Spezifität})$$

**Abbildung 6: Formel zur Berechnung des Cut-off-Wertes**

Der optimale Cut-off-Wert entspricht dem Wert, für den die o.g. Formel maximal ist.<sup>5</sup>

Nach Erhalt der Cut-off-Werte für transiente Elastographie und Fibrosebiomarker erfolgte die Berechnung von positivem bzw. negativem Vorhersagewert.

Der positive Vorhersagewert (positive predictive value, PPV) gibt an, wie viele Personen, bei denen eine bestimmte Erkrankung mittels Testverfahren diagnostiziert wurde, auch tatsächlich krank sind.

Die Formel zur Berechnung des PPV ergibt sich wie folgt:

$$PPV = \frac{(SEN * PRE)}{(SEN * PRE + (1 - SPE) * (1 - PRE))}$$

**Abbildung 7: Formel zur Berechnung des positiven Vorhersagewertes (PPV)**

SEN = Sensitivität

PRE = Prävalenz = Anzahl der betroffenen Patienten (z.B. CFLD-Patienten) ÷ alle Patienten

SPE = Spezifität

---

<sup>5</sup> <http://www.acomed-statistik.de/cut-off.html> [zuletzt aufgerufen am 11.11.2013]

Der negative Vorhersagewert (negative predictive value, NPV) erlaubt eine Aussage darüber, wie viele Personen, bei denen eine bestimmte Krankheit mittels Testverfahren nicht festgestellt wurde, auch tatsächlich gesund sind. Die Formel zur Berechnung lautet:

$$NPV = \frac{SPE * (1 - PRE)}{(SPE * (1 - PRE) + (1 - SEN) * PRE)}$$

**Abbildung 8: Formel zur Berechnung des negativen Vorhersagewertes (NPV) <sup>6</sup>**

SEN = Sensitivität

PRE = Prävalenz = Anzahl der betroffenen Patienten (z.B. CFLD-Patienten) ÷ alle Patienten

SPE = Spezifität

---

<sup>6</sup> [http://flexikon.doccheck.com/de/Positiver\\_pr%C3%A4diktiver\\_Wert](http://flexikon.doccheck.com/de/Positiver_pr%C3%A4diktiver_Wert) sowie die weiterführenden Links [zuletzt aufgerufen am 26.06.2014]

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Patientendaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 70 Patienten mit dem Krankheitsbild „Zystische Fibrose“ untersucht. Die Patienten wurden im Zeitraum von *Juni 2009 bis Dezember 2010* in der Abteilung für Gastroenterologie der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen in die dieser Arbeit zugrundeliegende Studie eingeschlossen. Es handelte sich dabei ausschließlich um erwachsene Patienten im Alter von 22 bis 52 Jahren. Bei 38 dieser Patienten (also 54%) war eine CFLD diagnostiziert worden. In die Diagnose CFLD flossen u. a. folgende Kriterien ein:

- eine sich klinisch manifestierende Hepatomegalie (verifiziert mittels Sonographie),
- erhöhte Leberenzym Spiegel im Blut sowie
- sonographische Veränderungen der Leber unabhängig von einer Hepatomegalie.

Zudem stellten Zeichen einer portalen Hypertension (Ösophagusvarizen, Splenomegalie etc.) sowie die Behandlung mit Ursodesoxycholsäure Einschlusskriterien dar.

Von den 38 Patienten mit CFLD wiesen 9 Patienten zusätzlich eine portale Hypertension auf.

Die unten aufgeführte Tabelle zeigt demographische und klinische Daten der dieser Studie zugeführten Mukoviszidosepatienten. Neben klinischen Manifestationen der zystischen Fibrose wie Pankreasinsuffizienz und portaler hypertensiver Gastropathie sind ebenso sonographische Stadien aufgeführt.

	keine CFLD (n = 32)	CFLD (n = 29)	CFLD+PHT (n = 9)
<b>Alter</b>	32.3 (31) +/- 9.3	30.6 (28) +/- 8.6	32.2 (30) +/- 5.8
<b>Mittelwert (Median)</b>			
<b>+/- SD</b>			
<b>Geschlecht</b>	17♂/15♀	14♂/15♀	6♂/3♀
<b>Krankheitsmanifestation</b>			
<b>Pankreas-</b>			
<b>insuffizienz (n)</b>			
<b>exokrin</b>	17	20	4
<b>exo- und</b>	9	9	5
<b>endokrin</b>			
<b>Lebersonographie</b>			
<b>US 1</b>	25	10	0
<b>US 2</b>	7	12	0
<b>US 3</b>	0	4	0
<b>US 4</b>	0	3	0
<b>US 5</b>	0	0	9
<b>ÖGD</b>			
<b>Varizen °I</b>			1
<b>Varizen °II</b>			2
<b>Varizen °III</b>			4
<b>PHG</b>			2

**Tabelle 5: Demographische und klinische Daten der CF-Patienten.**

Form und Größe der Ösophagusvarizen wurden in drei Stadien anhand der öffentlichen Leitlinien (109) eingeteilt.

CFLD, Cystic Fibrosis Liver Disease; PHT, Portale Hypertension; ÖGD, Ösophagogastroduodenoskopie; PHG, Portale Hypertensive Gastropathie.

#### 4.2 Mutation und CFLD

Bei den dieser Studie zugeführten Patienten wurde die Diagnose „Zystische Fibrose“ anhand von Schweißtest sowie von genetischen Untersuchungen, die in der Regel in frühester Kindheit erfolgten, gestellt. Informationen über die exakte Mutationsanalyse lagen leider nicht bei allen Studienteilnehmern vor.

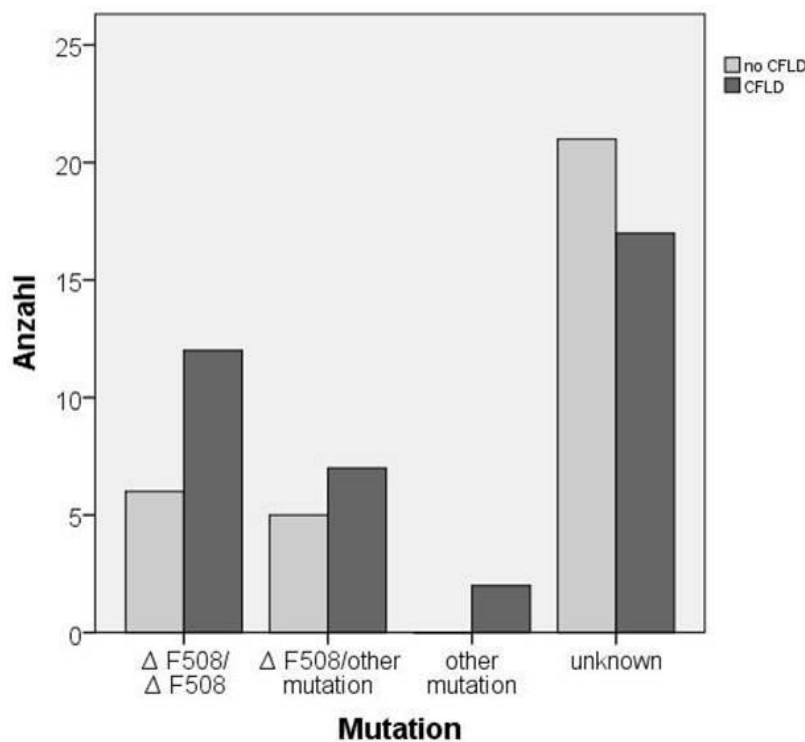
26% der untersuchten Patienten waren homozygot für die Mutation  $\Delta$  F508, 17% waren heterozygot, 3% zeigten eine andere Mutation und bei 54% ließ sich die genaue Mutation nicht mehr eruieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 70 CF-Patienten untersucht. Um den Zusammenhang zwischen einer spezifischen CF-Mutation und dem Vorliegen einer Leberbeteiligung zu prüfen, wurde zunächst die Mutation  $\Delta$  F508 (Homozygotie) sowie andere Mutationen mit der Diagnose CFLD korreliert. Dabei erfolgte die weitere Unterteilung in  $\Delta$  F508-heterozygote Patienten, Patienten mit einer anderen CF-Mutation und Patienten mit unbekanntem Mutationstyp.

Insgesamt zeigten 38 Patienten eine CF-assoziierte Lebererkrankung.

Unter den homozygoten Patienten waren doppelt so viele CFLD-Patienten (12 vs. 6 Patienten). Auch bei den heterozygoten Studienteilnehmern überwog die Zahl der CFLD-Patienten (7 vs. 5 Patienten). Diese Ergebnisse scheinen anzudeuten, dass Träger der  $\Delta$  F508-Mutation insgesamt häufiger eine CF-assoziierte Hepatopathie aufweisen.

Unter den Studienteilnehmern, bei denen die Mutation unbekannt war, gab es mehr Patienten ohne Leberveränderungen.



**Abbildung 9:**  
**Vorhandensein**  
**einer CFLD unter**  
**den einzelnen CF-**  
**Mutationen**

Unter den  $\Delta$  F508-homozygoten CF-Patienten waren doppelt so viele Patienten mit CFLD. Auch bei den  $\Delta$ F508-heterozygoten Patienten war die Anzahl der CFLD-

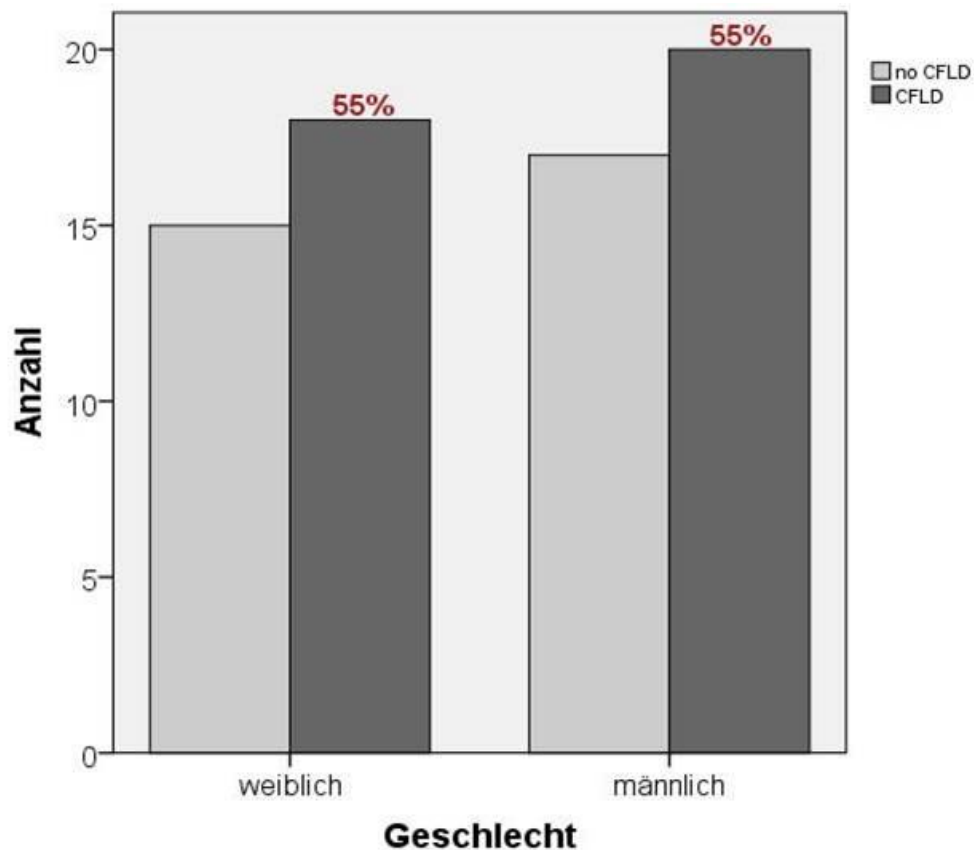
Patienten erhöht. Unter den Studienteilnehmern mit unbekanntem Mutationstyp überwogen zahlenmäßig die Patienten ohne CFLD.

### 4.3 Geschlecht und CFLD

Im Rahmen dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der CF-Patienten und dem Vorhandensein einer Hepatopathie untersucht. Das Studienkollektiv bestand aus 33 weiblichen sowie 37 männlichen Patienten und somit sehr ähnlichen Fallzahlen in beiden Gruppen. Unter den Frauen waren 18 CFLD-Patienten, unter den Männern 20.

Dies entspricht sowohl in der weiblichen als auch in der männlichen Kohorte einer Prozentzahl von 55% an CFLD-Patienten. 45% der Patienten zeigten hingegen keinerlei Anzeichen für eine Leberbeteiligung.

Die Daten legen also nahe, dass kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht eines CF-Patienten und dem Vorliegen einer CFLD besteht.



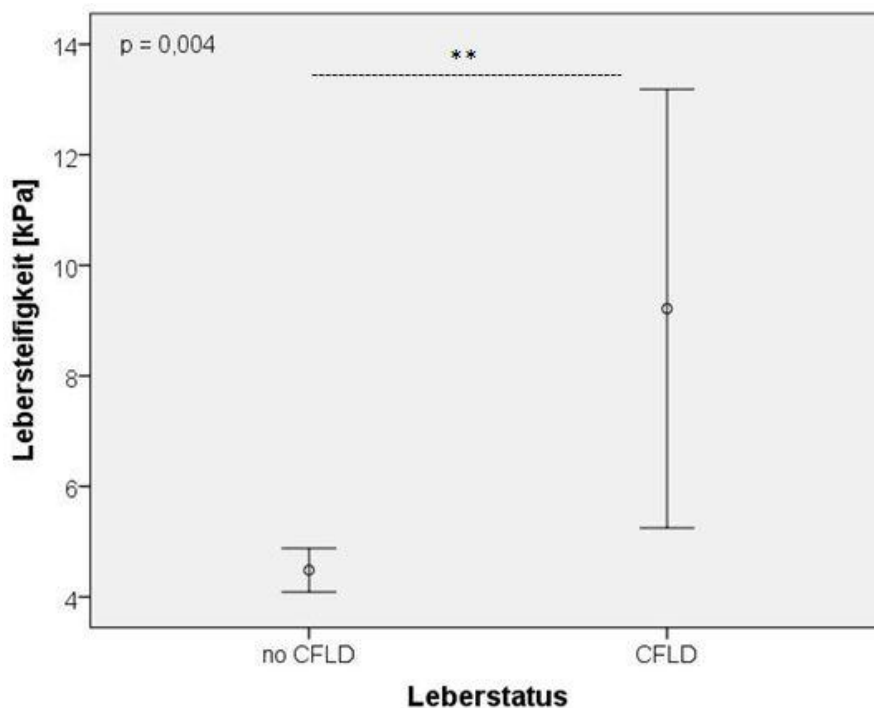
**Abbildung 10: Verteilungsmuster der Diagnose CFLD unter männlichen sowie weiblichen Studienteilnehmern.**

Es zeigt sich keine geschlechtsspezifische Häufigkeitsverteilung der Diagnose CFLD.

#### 4.4 Transiente Elastographie und CFLD

38 Patienten zeigten eine CFLD. Bei 32 Patienten bestand keine Hepatopathie. Die Messwerte für die Lebersteifigkeit reichten von 2,4 kPa bis 75 kPa. Patienten mit CFLD zeigten insgesamt eine signifikant höhere Lebersteifigkeit im Vergleich zu Patienten ohne Hepatopathie ( $n = 70$ ; CFLD: 9,2 kPa vs. keine CFLD: 4,5 kPa,  $p = 0,004$ ).

Die Ergebnisse wurden in einem Fehlerbalkendiagramm dargestellt. Das Diagramm kennzeichnet dabei die Lage des Mittelwertes der Stichproben mit einem Kreis ( $\circ$ ). Zudem können mithilfe des Fehlerbalkendiagramms Angaben über die geschätzte Lage des Mittelwertes in der Grundgesamtheit gewonnen werden. Dazu wurde das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes der TE-Messwerte bestimmt. Das Konfidenzintervall ist der Bereich, welcher bei unendlicher Wiederholung des Experiments mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (Konfidenzniveau) die wahre Lage des Mittelwertes einschließt.



**Abbildung 11: Fehlerbalkendiagramm mit dem 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes für die TE-Messwerte der Probanden.**

Patienten mit CFLD zeigen eine signifikant höhere Lebersteifigkeit (CFLD: 9,2 kPa) als Patienten ohne CFLD (keine CFLD: 4,5 kPa).  $p = 0,004$

#### 4.5 Expression von Fibrosebiomarkern bei CF-Patienten mit CFLD

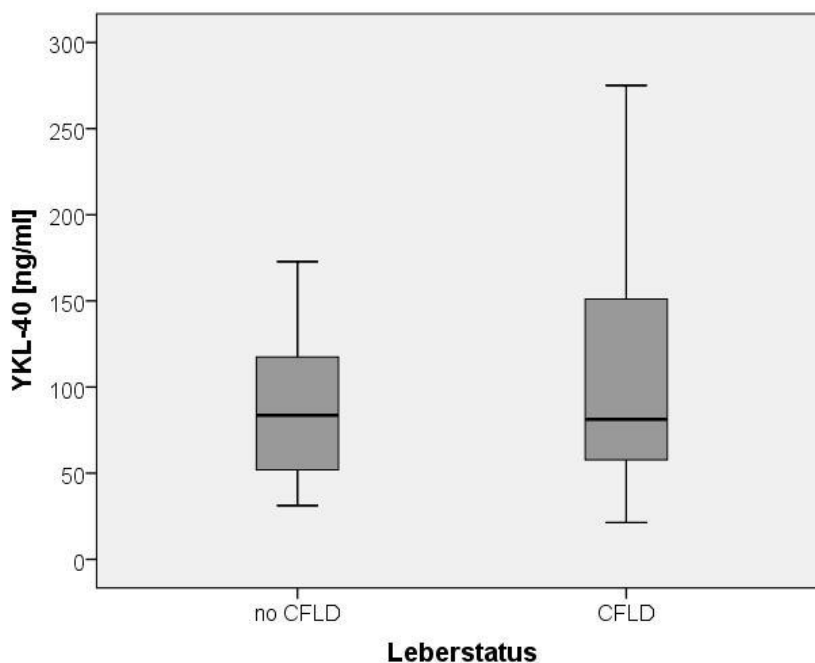
Material zur Durchführung der Serumanalysen stand von 55 Patienten zur Verfügung (31 männliche und 24 weibliche Patienten). Im Serum der Patienten wurden folgende Fibrosemarker bestimmt: MMP-1, -2, -8, -9, -13 sowie MMP-9/TIMP-1, TIMP-1 und -2, YKL-40, Prokollagen-III-Peptid, Hyaluronsäure sowie M30 (zur Erfassung von löslichem Caspase-gespaltenem Cytokeratin 18) und M65 (zur quantitativen Erfassung von Cytokeratin 18).

YKL-40 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit oder ohne CFLD (CFLD: 86,1 ng/ml vs. keine CFLD: 83,5 ng/ml,  $p = 0,283$ ).

Bei den CFLD-Patienten konnten zwar erhöhte TIMP-1-Werte gemessen werden, allerdings besaß diese Erhöhung keine statistische Signifikanz (CFLD: 63,2  $\mu\text{g/ml}$  vs. keine CFLD: 53,5  $\mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,151$ ).

Hyaluronsäure zeigte keine wesentliche Veränderung bei Patienten mit CFLD im Vergleich zu Patienten ohne erhöhte Lebersteifigkeit (CFLD: 29 ng/ml vs. keine CFLD: 22 ng/ml;  $p = 0,142$ ).

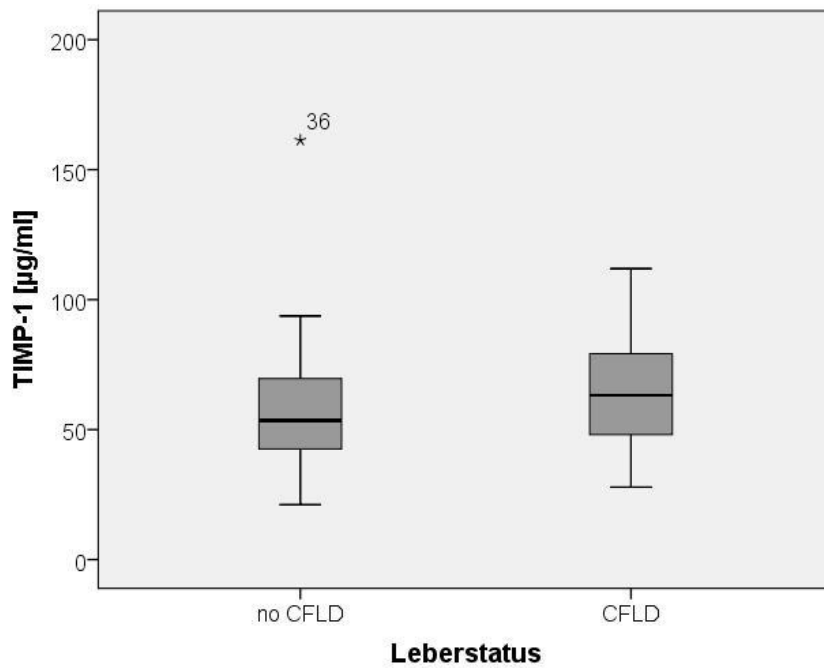
Prokollagen-III-Peptid und die untersuchten Matrixmetalloproteinasen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit bzw. ohne CFLD.



**Abbildung 12:**  
**Expression von**  
**YKL-40 bei CF-**  
**Patienten.**

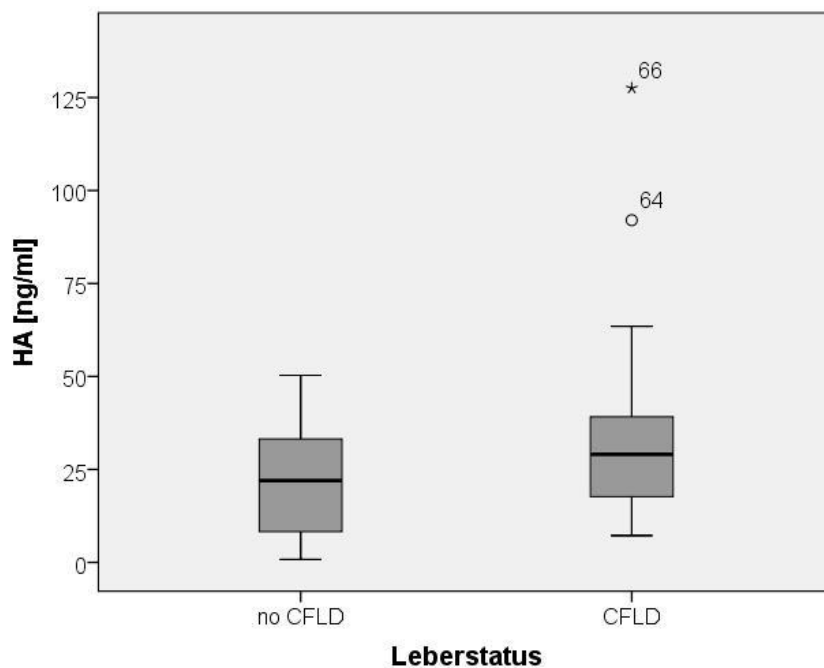
YKL-40 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit sowie ohne CFLD (CFLD: 86,1 ng/ml vs. keine CFLD: 83,5 ng/ml,  $p = 0,283$ ).





**Abbildung 13:**  
**Expression von**  
**TIMP-1 bei CF-**  
**Patienten.**

Es zeigten sich keine  
Veränderungen in  
der TIMP-1  
Konzentration  
zwischen CFLD-  
Patienten und  
Patienten ohne  
CFLD.  
(CFLD: 63,2 µg/ml  
vs. keine CFLD: 53,5  
µg/ml;  $p = 0,151$ ).



**Abbildung 14:**  
**Expression von**  
**Hyaluronsäure bei**  
**CF-Patienten**

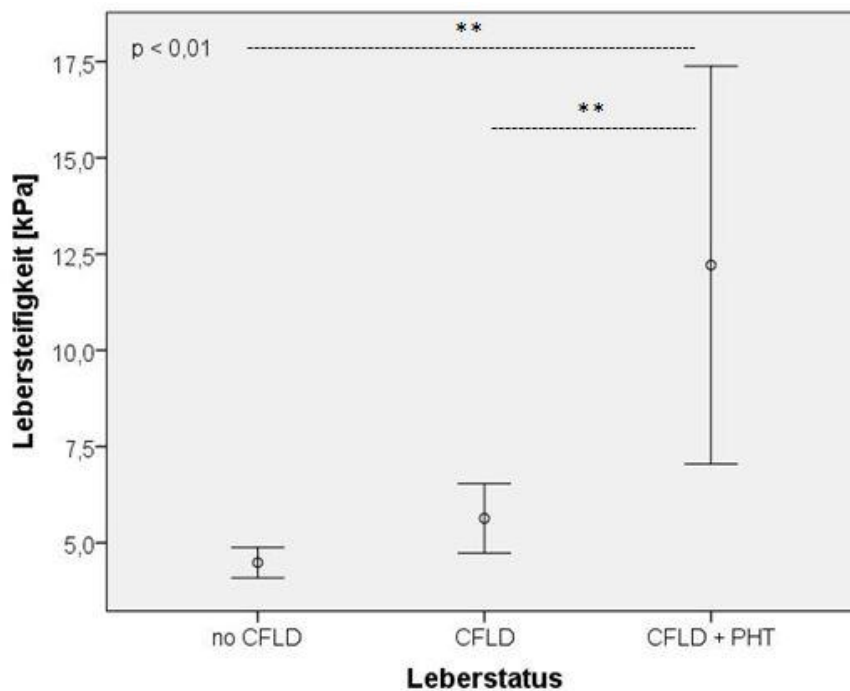
Patienten mit CFLD  
sowie ohne CFLD  
zeigten insgesamt  
sehr ähnliche  
Serum-  
hyaluronsäure-  
spiegel  
(CFLD: 29 ng/ml vs.  
keine CFLD: 22  
ng/ml;  $p = 0,142$ ).

## 4.6 CF-assoziierte portale Hypertension (PHT)

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Lebersteifigkeit und die Expression verschiedener Fibrosemarker ähnliche, eventuell sogar höhere Werte bei CF-Patienten zeigen, die neben einer CFLD zusätzlich eine PHT aufweisen.

### 4.6.1 Transiente Elastographie und PHT

Die Lebersteifigkeit nimmt von der Gruppe der CF-Patienten ohne CFLD (4,5 kPa) hin zur Gruppe mit CFLD (5,6 kPa) zu und erreicht die höchsten Werte bei Patienten mit CFLD und PHT (12,2 kPa). Dabei bestehen signifikante Unterschiede, vergleicht man Patienten mit CFLD sowie PHT mit Patienten, die lediglich eine Hepatopathie aufweisen und solche, die keine CFLD zeigen (keine CFLD vs. CFLD:  $p = 0,064$ ; keine CFLD vs. CFLD + PHT:  $p = 0,001$ ; CFLD vs. CFLD + PHT:  $p = 0,006$ ).



**Abbildung 15:**  
**Lebersteifigkeit bei CF-Patienten ohne CFLD, mit CFLD sowie bei Patienten mit CFLD und gleichzeitiger PHT.**

Die Lebersteifigkeit zeigt die niedrigsten Werte gemessen in kPa bei Patienten ohne CFLD (noCFLD: 4,5 kPa), mittlere

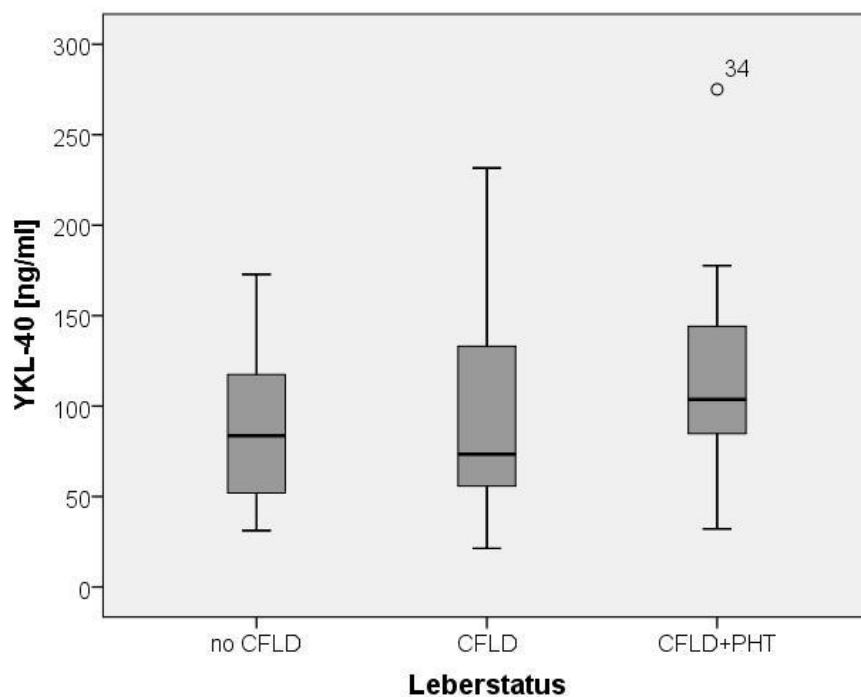
Werte bei Patienten mit CFLD (CFLD: 5,6 kPa) und die höchsten Werte bei Patienten mit CFLD und PHT (CFLD+PHT: 12,2). Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen.  $**p < 0,01$

#### 4.6.2 Fibrosebiomarker und PHT

Hinsichtlich der Expression der Serumfibrosemarker zeigte sich eine signifikant höhere Expression von TIMP-2 bei Patienten mit CFLD und PHT (165,9 ng/ml) im Vergleich zu Patienten mit CFLD (117,1 ng/ml) und jenen ohne CFLD (120,7 ng/ml) (keine CFLD vs. CFLD:  $p = 0,765$ ; keine CFLD vs. CFLD + PHT:  $p = 0,004$ ; CFLD vs. CFLD + PHT:  $p = 0,0028$ ).

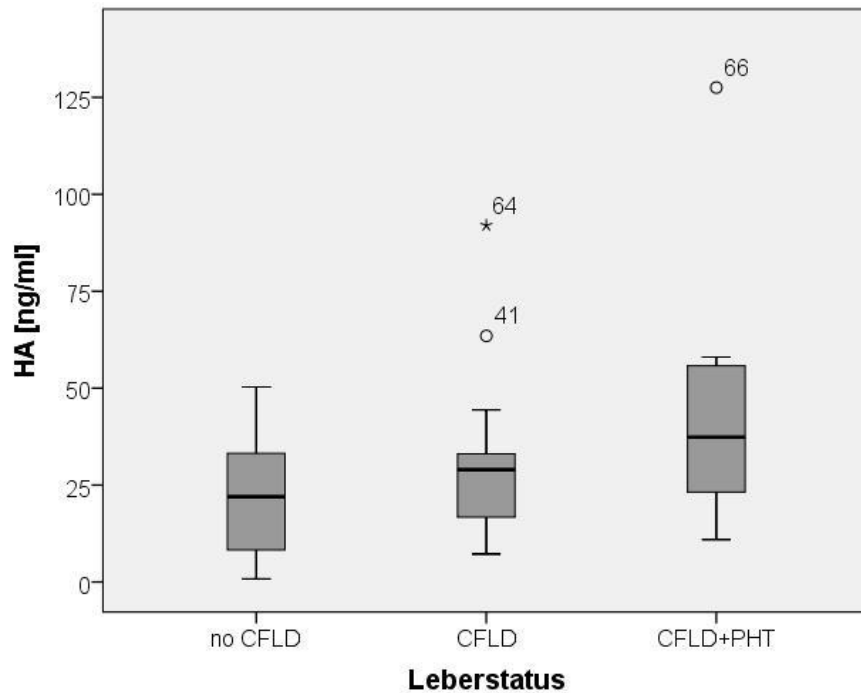
Obschon der Serummarker TIMP-1 einen zunehmenden Anstieg von Patienten ohne CFLD (53,5  $\mu\text{g/ml}$ ) über Patienten mit CFLD (63,2  $\mu\text{g/ml}$ ) bis hin zu Mukoviszidosepatienten mit CFLD und PHT (64,7  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigte, waren die Ergebnisse zwischen diesen Gruppen nicht statistisch signifikant (keine CFLD vs. CFLD:  $p = 0,137$ ; keine CFLD vs. CFLD + PHT:  $p = 0,114$ ; CFLD vs. CFLD + PHT:  $p = 0,578$ ).

YKL-40 und Hyaluronsäure zeigten keine Unterschiede zwischen Patienten mit bzw. ohne CFLD und Patienten mit CFLD und PHT.



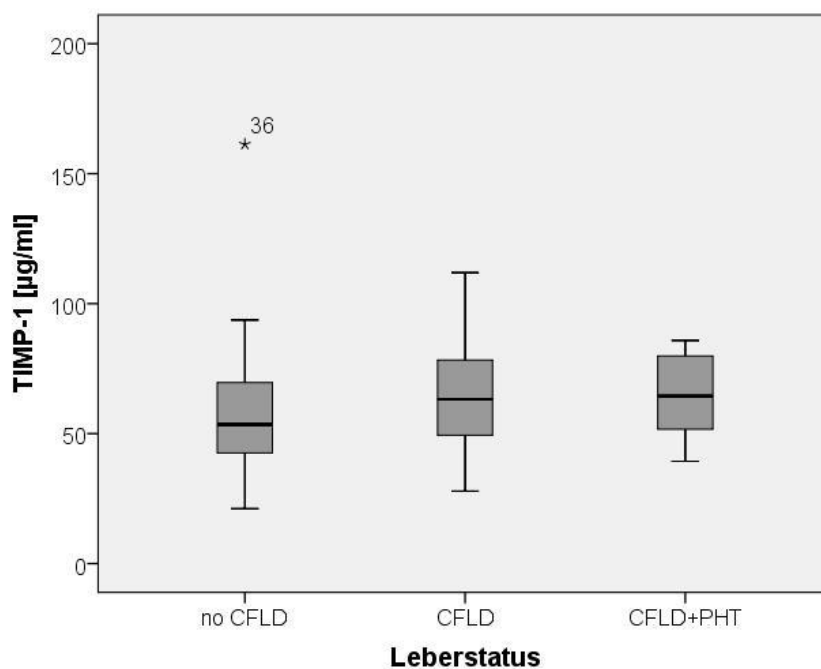
**Abbildung 16:**  
**Serum-**  
**expression von**  
**YKL-40 bei**  
**Patienten ohne**  
**CFLD, mit CFLD**  
**sowie mit CFLD**  
**und**  
**gleichzeitiger**  
**PHT.**  
Die YKL-40-  
Spiegel  
unterscheiden  
sich kaum  
zwischen diesen  
Patienten-

Subgruppen. Es besteht keine statistische Signifikanz.



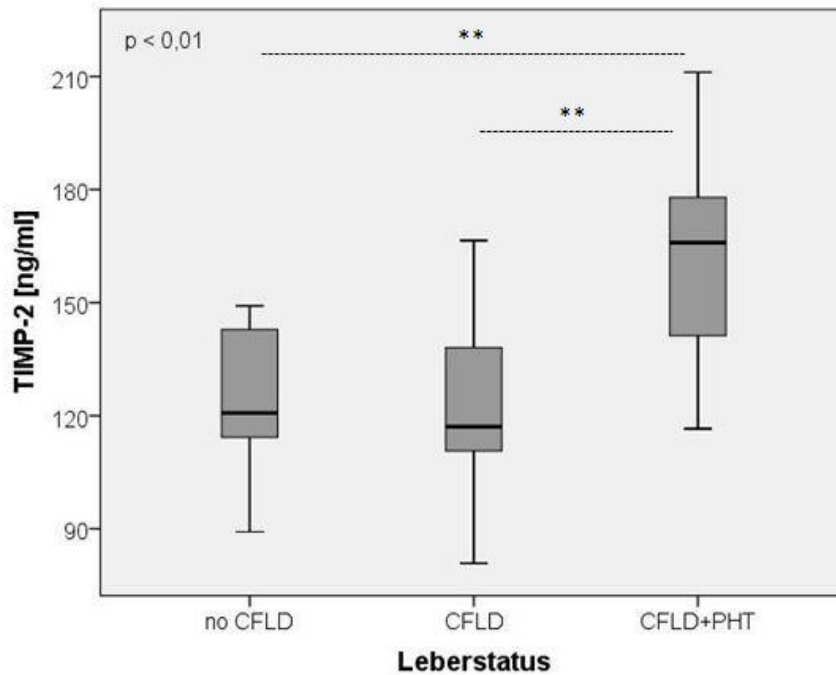
**Abbildung 17:**  
**Serum-**  
**expression von**  
**Hyaluronsäure**  
**bei Patienten**  
**ohne CFLD, mit**  
**CFLD sowie mit**  
**CFLD und**  
**gleichzeitig**  
**bestehender**  
**PHT.**  
 Auch die HA-  
 Serumspiegel  
 unterscheiden  
 sich kaum  
 zwischen diesen

Patienten-Subgruppen. Es besteht keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 18:**  
**Serumexpression**  
**von TIMP-1 bei**  
**Patienten ohne**  
**CFLD, mit CFLD**  
**sowie mit CFLD**  
**und gleichzeitiger**  
**PHT.**  
 Die Serum-  
 konzentration von  
 TIMP-1 nimmt zwar  
 von den Patienten  
 ohne CFLD (53,5  
 µg/ml) über die  
 Patienten mit CFLD  
 (63,2 µg/ml) bis hin

zu den Patienten mit CFLD und PHT (64,7 µg/ml) zu, zeigt jedoch keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 19:**  
**Serumexpression**  
**von TIMP-2 bei**  
**Patienten ohne**  
**CFLD, mit CFLD**  
**sowie mit CFLD**  
**und gleichzeitiger**  
**PHT.**

TIMP-2 zeigt eine  
signifikant höhere  
Expression bei  
Patienten mit CFLD  
und PHT (165,9  
ng/ml) im Vergleich  
zu Patienten mit

CFLD (117,1 ng/ml) sowie Patienten ohne CFLD (120,7 ng/ml). \*\*p < 0,01

#### 4.7 Diagnostische Relevanz von transienter Elastographie und Fibrose- markern für die Erkennung von CFLD und PHT

Um die diagnostische Wertigkeit der transienten Elastographie und der Serumfibrosemarker für die Beurteilung einer CFLD sowie einer CFLD-assoziierten PHT direkt zu vergleichen, wurde ihre diagnostische Aussagekraft anhand von ROC-Kurven beurteilt.

Im vorliegenden Studienkollektiv erreichten die transiente Elastographie (AUROC: 0,685) sowie der Fibrosemarker TIMP-1 (AUROC: 0,605) die höchste Treffsicherheit für die Diagnose CFLD. Ein Cut-off-Wert von 6,15 kPa in der transienten Elastographie stellte sich als optimal für die Diagnose einer CFLD heraus. Im Hinblick auf die Fibrosemarker besaß YKL-40 einen optimalen Cut-off-Wert von 131,9 ng/ml und TIMP-1 einen optimalen Wert bei 63,1 µg/ml.

Bei Patienten mit portaler Hypertension wies die transiente Elastographie die höchste Treffsicherheit bezüglich der Erkennung einer PHT auf (AUROC: 0,856): Dabei lag der ideale Cut-off-Wert bei 11,2 kPa. Bezogen auf die Serumfibrosemarker zeigte TIMP-2 die beste Treffsicherheit (AUROC: 0,845) mit einem Cut-off-Wert von 158,5 ng/ml.

Die unten stehende Tabelle zeigt die diagnostische Güte der transienten Elastographie sowie ausgewählter Fibrosebiomarker für die Diagnosestellung einer CFLD und einer CF-assoziierten portalen Hypertension.

<b>Diagnostische Güte</b>					
	Cut-off Wert	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
<b>CFLD</b>					
<b>TE</b>	6,15 kPa	41,7	90,6	83,3	58
<b>YKL-40</b>	131,9 ng/ml	31,3	90,9	83,4	47,6
<b>TIMP-1</b>	63,1 µg/ml	53,1	72,7	73,7	51,5
<b>CFLD + PHT</b>					
<b>TE</b>	11,2 kPa	71,4	98,4	83,7	96,8
<b>TIMP-2</b>	158,5 ng/ml	71,4	97,9	79,6	96,8

**Tabelle 6: Diagnostische Güte von transientser Elastographie und Serumfibrosemarkern für die Diagnose einer CFLD und einer PHT.**

CFLD, cystic fibrosis liver disease; PHT, portal hypertension; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

#### 4.8 Erhöhte Lebersteifigkeit und Routinelaborparameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Routineserumparameter (u. a. Thrombozytenzahl, Transaminasen, Hämoglobin und Bilirubin) bestimmt. Den Patienten wurde am Tag der Durchführung der transienten Elastographie Blut zur hämatologischen und biochemischen Untersuchung abgenommen. Die o. g. Routineserumparameter wurden im Labor der Universitätsklinik Gießen (Prof. Dr. med. Harald Renz, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, molekulare Diagnostik, Baldingerstraße, 35043 Marburg) bestimmt.

Anschließend wurden die Routineserumparameter mit den Messergebnissen der transienten Elastographie korreliert. Ziel war es zu untersuchen, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten bzw. erniedrigten Serumparametern und erhöhten Messwerten der transienten Elastographie besteht.

Die Messwerte der transienten Elastographie sowie die Routineserumparameter, die nicht der Normalverteilung entsprechen, wurden mit dem Mann-Whitney U Test beurteilt. Um einen möglichen Zusammenhang aufzudecken, wurden die entsprechenden Korrelationskoeffizienten berechnet. Da die Korrelation für ordinalskalierte Variablen berechnet wurde, wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans Rho) ermittelt.

Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Das Vorzeichen beschreibt dabei die Richtung des Zusammenhangs zwischen den Variablen. Je näher der Wert des Korrelationskoeffizienten am Wert 0 liegt, desto schwächer ist die Korrelation zwischen den Variablen (108).

Die Werte des Korrelationskoeffizienten der transienten Elastographie und der Routineserumparameter reichten von -0,224 bis 0,442. D. h. die Messwerte der transienten Elastographie korrelierten insgesamt nur mäßig mit den laborchemischen Parametern.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ergebnisdiskussion

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit folgendes gezeigt werden:

1. Homozygoter Genotyp sowie Geschlecht korrelieren nicht mit der Entwicklung einer CFLD.
2. Die Lebersteifigkeit ist bei Patienten mit CFLD signifikant erhöht und lässt sich mittels transientser Elastographie messen.
3. TIMP-2 zeigt eine signifikante Erhöhung bei Patienten mit CFLD und gleichzeitig vorliegender PHT.

### 5.2 Einführung

Eine Leberbeteiligung im Rahmen der Mukoviszidose kommt bei ca. einem Drittel der Patienten vor (3;4).

Bereits Kinder mit zystischer Fibrose können eine Hepatopathie ausbilden. Etwa 5-10% der Kinder mit CFLD entwickeln innerhalb der ersten Lebensdekade eine fortgeschrittene Leberfibrose oder Zirrhose. Die Fibrose führt dabei bei einem Großteil der Kinder zur Ausbildung einer portalen Hypertension, zu Komplikationen wie Ösophagusvarizen und Aszites oder gar zu einem Leberversagen. Die PHT und ihre Komplikationen können bereits in der zweiten Lebensdekade zum Ausbruch kommen (3;4).

#### ***Diagnostik der CFLD***

##### *Kritische Wertung der Leberbiopsie*

Die Einschätzung des Fibrosegrades, das so genannte Staging, ist von essentieller Bedeutung für Prognose, Therapieindikation und Verlaufskontrolle der CFLD.

Bisher galt die Leberbiopsie als Goldstandard zur Diagnose einer Hepatopathie und zur Bestimmung des Fibrorestadiums bei CF-Patienten. Die Biopsie liefert zweifelsohne wichtige Informationen über die dominierende Läsion innerhalb der Leber (Steatosis, fokale biliäre Zirrhose etc.), die Ausdehnung der portalen Fibrose, die Progressionsrate der Hepatopathie sowie über das Ansprechen auf eine Therapie.



Allerdings stellt die Leberstanzbiopsie ein invasives Verfahren dar, dessen diagnostische Aussagekraft durch Intra- und Inter-Beobachter-Variabilität sowie durch die Variabilität der Proben eingeschränkt ist (9;10;49-55). Ein zusätzliches Problem der Leberbiopsie ist die inhomogene Verteilung der Läsionen innerhalb der Leber (46). Darüber hinaus verursacht eine Leberstanzbiopsie in einigen Fällen einen postinterventionellen Schmerz und kann mit einer Mortalität von 0,1-0,01% verbunden sein (48).

#### *Nicht invasive Tests zur Beurteilung einer CFLD*

Hinsichtlich der besonderen Bedürfnisse und Ansprüche der CF-Patienten sollten die Untersuchungen ein schnelles aber auch sicheres Screening in der täglichen Praxis erlauben und eine kostengünstige Nachkontrolle ermöglichen.

Die bisherigen diagnostischen Möglichkeiten sind vielfältig und reichen von der körperlichen Untersuchung, über bildgebende Verfahren bis hin zu Laborbestimmungen und speziellen Fibrosetests (AST/ALT-Ratio (67), APRI (69), Fibrotest (48)).

#### *Laborchemische Veränderungen*

Laborchemische Veränderungen im Rahmen der zystischen Fibrose verlaufen häufig mild oder bestehen nur zeitweise. Sie besitzen nur eine geringe Sensitivität und zeigen mehrfach keine Korrelation zum histologischen Befund (46). Keiner der in der Routinediagnostik bestimmten Serumparameter (AST, ALT, AP,  $\gamma$ -GT etc.) spiegelt direkt den Fibrosegrad wider. Nicht selten haben CF-Patienten mit bereits fortgeschrittener multilobulärer Zirrhose völlig unauffällige Laborwerte. Dennoch sollte bei der Erhöhung eines Wertes um mehr als das 1,5-fache eine erneute Bestimmung der Serumwerte in einem kürzeren Zeitintervall (3-6 Monate) erfolgen (28).

Da die Laborwerte natürlichen Schwankungen unterliegen, sollten nur dauerhaft erhöhte Laborparameter genauer untersucht werden. Zeigen die Laborwerte eine beständige Erhöhung über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten, und kann ihr Anstieg durch keine andere Ursache erklärt werden, kann dies auf eine Leberbeteiligung hindeuten (29).

### *Bildgebende Diagnostik*

Bildgebende Verfahren spielen eine wichtige Rolle in der Diagnose von hepatobiliären Veränderungen.

Insbesondere die Sonographie der Leber, der Gallengänge und des hepatischen Gefäßsystems liefert wichtige Informationen und sollte bei allen Patienten, die im Verdacht einer CFLD stehen, durchgeführt werden (29).

Die Dopplersonographie kann zur Ermittlung von Blutflussgeschwindigkeiten und Flussmustern innerhalb der Leber und somit zur Diagnose einer PHT genutzt werden. Die Sonographie als diagnostisches Verfahren bei CFLD ist allerdings nur begrenzt aussagekräftig, da eine periportale Steatose einer fokalen Fibrose sonographisch stark ähneln kann (29).

Die MR-Cholangiographie ist ein nicht invasives Verfahren zur Beurteilung von Veränderungen des intra- und extrahepatischen Gallengangsystems. Sie kann bereits zur frühzeitigen Diagnose einer Leberbeteiligung bei CF-Patienten eingesetzt werden. Allerdings sind die Kosten einer MR-Cholangiographie sehr hoch, weshalb sie nicht routinemäßig zur Verlaufskontrolle der CFLD eingesetzt wird (110). Die MR-Cholangiographie bleibt eher speziellen Fragestellungen vorbehalten (z.B. Einsatz bei komplexen hepatischen Raumforderungen mit räumlicher Beziehung zum Leberhilus. Die dreidimensionale Darstellung mittels MR-Cholangiographie erweitert dabei das diagnostische Spektrum und erlaubt somit auch eine weitere Therapieplanung (111).

### *Neue Aspekte der CFLD-Diagnostik*

In den vergangenen Jahren ist ein enormer Forschungsaufwand betrieben worden, um hepatobiliäre Veränderungen bei CF-Patienten frühzeitig erkennen zu können. Dabei lag das Augenmerk insbesondere auf dem Verfahren der transienten Elastographie und auf der Entwicklung neuer Fibrosebiomarker.

Im Folgenden sind die von Schuppan et al. geforderten Kriterien eines idealen Fibrosebiomarkers aufgeführt:

1. Leberspezifischer Marker
2. Keine Beeinflussung der Serumspiegel durch Veränderungen der Leber-, Nieren- oder retikuloendothelialen Funktion

3. Genaue Ermittlung eines oder mehrerer der folgenden Prozesse
  - a. Fibrosestadium
  - b. Grad der Matrixablagerung (Fibrogenese)
  - c. Grad des Matrixabbaus (Fibrolyse)
4. Leichte und kostengünstige Durchführbarkeit
5. Fähigkeit, das Risiko einer Erkrankungsprogredienz sowie eine Regression vorauszusagen (112)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die diagnostische Aussagekraft der transienten Elastographie sowie einer Reihe von experimentellen Fibrosebiomarkern im Hinblick auf die Diagnose einer CF-assoziierten Hepatopathie überprüft. Dabei wurde eine sehr große Kohorte (n = 70) an Mukoviszidosepatienten untersucht. Im Vergleich zu der vorliegenden Studienteilnehmerzahl führten Breton und Kollegen ihre Studien an 20 Kindern mit CF durch (113). Menten et al. untersuchten 59 erwachsene Mukoviszidose-Patienten (12). Kitson sowie Witters untersuchten 50 bzw. 66 CF-Patienten, wobei nicht eindeutig klar ist, ob es sich dabei nur um Erwachsene oder CF-Patienten aller Altersklassen handelt (13;114). Somit wurde diese Studie am bisher größten erwachsenen Patientenkollektiv durchgeführt.

### 5.2.1 Risikofaktoren für die Entwicklung einer CFLD

Zahlreiche Studien haben sich bisher mit der Frage nach möglichen Risikofaktoren für die Ausbildung einer CFLD beschäftigt. Dabei wurden Zusammenhänge im Auftreten eines Mekoniumileus im Säuglingsalter sowie einer Pankreasinsuffizienz und dem gleichzeitigen Bestehen einer Hepatopathie beschrieben (31;115;116).

Als weiterer Risikofaktor wird eine schwerwiegende Mutation des CFTR-Gens vermutet (115). Bhardwaj et al. untersuchten in ihrer retrospektiven Studie CF-Patienten mit homozygotem und heterozygotem Genotyp sowie Patienten mit anderen CF-Mutationen. Sie kamen zu dem Schluss, dass es keinen spezifischen CF-Genotyp gibt, der das Auftreten von hepatobiliären Veränderungen beeinflusst. Insbesondere konnten sie zeigen, dass der Genotyp  $\Delta$  F508 nicht mit einer höheren Prävalenz für eine CFLD einhergeht (117).

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem bestimmten Genotyp und dem Auftreten einer CFLD besteht. Eine Einschränkung stellt allerdings das zum Teil fehlende Wissen über die entsprechende CF-Mutation der Studienteilnehmer dar.

Bei 54% der Probanden war die CFTR-Mutation unbekannt. Bei allen Patienten, die dieser Studie zugeführt wurden, waren im Kindesalter genetische Analysen zur Diagnosesicherung erfolgt. Heutzutage werden in den Laboratorien kommerzielle Kits zur Mutationsanalyse verwendet. Diese Kits erfassen die etwa 25 häufigsten Mutationen. Insgesamt existieren jedoch über 900 verschiedene CF-Mutationen (118). Daher besteht in der vorliegenden Kohorte die Möglichkeit, dass bestimmte Mutationen aufgrund ihrer Seltenheit gar nicht getestet und somit nicht ermittelt wurden.

Zudem muss angenommen werden, dass nicht jeder der Probanden seit seinem Kindesalter das Mukoviszidosezentrum des Universitätsklinikums in Gießen besucht. Einige der Patienten sind im Laufe ihres Lebens zugezogen. Dabei könnte es zum Verlust wichtiger Daten, so zum Beispiel der entsprechenden CFTR-Mutation, gekommen sein.

Ciucă et al. beschrieben in ihrer Arbeit zwar ein fünffach häufigeres Auftreten einer CFLD bei Patienten mit schwerwiegendem Mutationstyp ( $\Delta$  F508/ $\Delta$  F508), allerdings räumten sie ebenfalls ein, dass unter den Studienteilnehmern ein erheblicher Anteil an Patienten mit unbekanntem Genotyp eine CFLD aufwies (115).

Feranchak et al. bestätigten die fehlende Korrelation zwischen einem spezifischen Genotyp und einer sich klinisch manifestierenden Hepatopathie. Da jedoch alle Patienten mit zystischer Fibrose einen veränderten CFTR-Kanal in den intrahepatischen Gallenwegen aufweisen, ist bisher unklar, warum nicht alle Patienten eine Hepatopathie entwickeln. Patienten mit identischen CFTR-Mutationen zeigen Unterschiede im Krankheitsbeginn und der Schwere der CFLD. Daher wird postuliert, dass es andere genetische oder umweltbedingte Faktoren geben muss, die das Auftreten der CFLD beeinflussen (29).

Unterschiede im Vorhandensein sowie der Ausprägung einer Leberbeteiligung unter Geschwistern mit zystischer Fibrose, die wahrscheinlich den gleichen Umweltfaktoren ausgesetzt waren (33), haben dazu geführt, dass genetische Faktoren, die unabhängig vom CFTR-Gen vererbt werden, als Ursache für die klinische Expression sowie die Schwere der CFLD vermutet werden.

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf mögliche Risikofaktoren stellt das Geschlecht dar. Bhardwaj et al. beschrieben in ihrer Studie einen Trend in Richtung männliches Geschlecht (117). Diese Tendenz wurde in verschiedenen Studien bestätigt (3;35;38;119).

Lindblad und Kollegen sowie Ciucă et al. widerlegten den oben beschriebenen Zusammenhang (4;115).

Auch die Daten der vorliegenden Arbeit konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Vorliegen einer CFLD zeigen. Die Ursache könnte hierbei in einer zu kleinen Kohorte liegen. Zwar zählt das Studienkollektiv (n=70), welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, zu einer - in Deutschland betrachtet – der größten Kohorten, dennoch würde sich gegebenenfalls ein deutlicherer Trend bei größeren Studienpopulationen (n > 500) z.B. in Europa abzeichnen.

### 5.2.2 Erhöhte Lebersteifigkeit bei Patienten mit CFLD

Im Rahmen dieser Studie reichten die Messwerte für die Lebersteifigkeit von 2,4 kPa bis 75 kPa. Patienten mit CFLD zeigten dabei insgesamt eine signifikant höhere Lebersteifigkeit im Vergleich zu Patienten ohne CFLD.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Resultate anderer Studien (74;114).

In einer Studie mit 72 pädiatrischen Patienten, davon 20 Patienten mit dem Krankheitsbild zystische Fibrose, konnten Breton et al. zeigen, dass Patienten mit einer Hepatopathie signifikant erhöhte TE-Messwerte aufweisen (113).

Ferner zeigten Menten et al., dass CF-Patienten mit sonographischen Merkmalen, die auf eine CFLD hinweisen, eine signifikant höhere Lebersteifigkeit aufwiesen als Patienten ohne sonographische Auffälligkeiten. Sie postulierten daher, dass die TE eine gute Methode für die Nachkontrolle einer Hepatopathie bei CF-Patienten sei (12). Auch Witters et al. konnten zeigen, dass Patienten mit CFLD im Durchschnitt eine höhere Lebersteifigkeit aufweisen als Personen ohne CFLD (13).

Die Besonderheit der vorliegenden Arbeit ist – wie bereits in Kapitel 5.2. beschrieben – das überaus große Patientenkollektiv, welches herangezogen wurde. Im Unterschied zu anderen Studien wurden hier ausschließlich erwachsene Mukoviszidosepatienten untersucht.

### 5.2.3 Erhöhte Lebersteifigkeit und portale Hypertension

Die portale Hypertension ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen der CFLD. Ihre Prävalenz liegt bei etwa 8% (120). Da es bei der PHT erst im späteren Verlauf zu einer Reduktion der hepatozellulären Masse und somit zu einer klinisch nachweisbaren Leberinsuffizienz kommt, stellt sie wiederholt die klinische Erstmanifestation einer CFLD dar.

Die wohl häufigste klinische Ausprägung der PHT ist die obere gastrointestinale Blutung aus Ösophagusvarizen (121), die nicht selten mit einer hohen Mortalität verbunden ist. Die Mortalität liegt dabei zwischen 20% und 50%, abhängig vom Stadium sowie dem Schweregrad der Leberzirrhose (121). Aufgrund der hohen Mortalität ist es von großer Bedeutung eine PHT frühzeitig zu diagnostizieren.

Bisher gibt es keine fest etablierte, nicht invasive Methode mit ausreichender Sensitivität und Spezifität, welche die Entwicklung von Ösophagusvarizen sicher voraussagt. Endoskopische Verfahren sind derzeit noch der Goldstandard. Malbrunot-Wagner und Kollegen untersuchten in ihrer 2011 veröffentlichten Arbeit den Nutzen der transienten Elastographie zur Diagnose von Ösophagusvarizen bei Kindern mit CF (11). Im Rahmen ihrer Studie wurden 18 Kinder mit zystischer Fibrose einer ÖGD sowie der TE zugeführt. 12 der 18 Studienteilnehmer wiesen dabei Ösophagusvarizen auf. Malbrunot-Wagner et al. konnten zeigen, dass CF-Patienten mit Ösophagusvarizen eine deutlich höhere Lebersteifigkeit aufwiesen als Patienten ohne Varizen (22,4 kPa vs. 7,9 kPa;  $p = 0,01$ ). Sie schlussfolgerten daher, dass alle CF-Patienten eine TE erhalten sollten, um den Erkrankungsprogress zu überwachen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer PHT und einer erhöhten Lebersteifigkeit bei CF-Patienten nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen die Daten einen zunehmenden Anstieg der Lebersteifigkeit von Patienten ohne CFLD hin zu Patienten mit CFLD und Patienten mit CFLD-assoziiierter portaler Hypertension (keine CFLD: 4,5 kPa; CFLD: 5,6 kPa; CFLD + PHT: 12,2 kPa). Es liegt somit die Vermutung nahe, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem klinischen Stadium einer Hepatopathie und der Lebersteifigkeit bei CF-Patienten besteht.

Die fortschreitende Lebersteifigkeit bei Patienten mit PHT, die sich mittels TE erfassen lässt, könnte von besonderem klinischem Interesse sein, da sie somit frühzeitig zur Erkennung einer PHT und ihrer Folgeschäden eingesetzt werden könnte.

Um überflüssige und risikoreiche endoskopische Untersuchungen zu vermeiden, sollte es einen Cut off Wert geben, der zuverlässig Ösophagusvarizen sowie andere Begleiterscheinungen der PHT vorhersagt. Dies wäre insbesondere bei CF-Patienten wünschenswert, da sie einem höheren Risiko für respiratorische Komplikationen durch die Sedierung und Anästhesie im Rahmen von Endoskopien ausgesetzt sind.

In der vorliegenden Arbeit war ein Cut-off-Wert von 11,2 kPa ideal, um Patienten mit PHT zu erkennen (PPV: 83,7%, NPV: 96,8%).

Die Festlegung eines idealen Cut-off-Wertes zur Diagnose einer CFLD sowie einer CF-assoziierten PHT setzten sich auch Kitson und Kollegen zum Ziel. Sie führten Untersuchungen an 50 erwachsenen CF-Patienten, von denen die Hälfte (n = 25) eine CFLD zeigten, durch. Auch sie konnten nachweisen, dass die Lebersteifigkeit bei Patienten mit CFLD größer ist, als bei Patienten ohne Leberbeteiligung (8,1 kPa vs. 5,0 kPa;  $p < 0,001$ ). Sie kamen zu dem Schluss, dass ein Cut-off-Wert  $\geq 6,8$  kPa sicher eine CFLD voraussagt (Sensitivität: 76,0%, Spezifität: 92,0%). Ein Wert von  $< 8,9$  kPa schloss ihrer Meinung nach hingegen eine PHT zuverlässig aus (Sensitivität: 87,5%, Spezifität: 90,5%, PPV: 63,6%, NPV: 92,9%) (114). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten der vorliegenden Arbeit.

In einem Großteil der bisher veröffentlichten Studien wurden ausschließlich pädiatrische Patienten mit CFLD und/oder PHT untersucht (122-125).

Die Ursache hierfür könnte unter anderem darin bestehen, dass sich eine CFLD i.d.R. bereits in der ersten Lebensdekade manifestiert. Costa et al. legten als mittleres Alter bei Diagnose einer CFLD ein Lebensalter von acht Jahren fest (122). Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen aus früheren Studien (35).

Die vorliegende Arbeit stellt somit einen Mehrwert gegenüber den bisher publizierten Studien dar, da sie ein großes Kollektiv an erwachsenen CF-Patienten mit CFLD sowie PHT untersucht.

Neuere Studien untersuchen ebenfalls die Entwicklung innovativer, nicht-invasiver Verfahren zur Diagnose einer CFLD und einer PHT. Sie nutzen die Acoustic Radiation Force Impulse Elastographie (ARFI) als bildgebendes Verfahren um die Lebersteifigkeit zu messen (126;127).

Diese dient zur Darstellung der qualitativen und quantitativen Elastizitätseigenschaften von Geweben. Akustische Kurzimpulse führen bei diesem Verfahren zu lokalisierten Gewebeverschiebungen im untersuchten Organ. Das Ausmaß der Gewebeverschiebungen ist dabei abhängig von der Steifheit des untersuchten Gewebes. In „weichem“, „elastischem“ Gewebe sind größere Gewebeverschiebungen möglich als in sehr festem Gewebe. Die Gewebeverschiebung führt zudem zur Ausbreitung von Scherwellen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Scherwellen kann mittels Ultraschallwellen in einem Messfeld detektiert werden. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit wird in m/s angegeben.

Je fester ein Gewebe, desto schneller die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Scherwelle und desto höher der gemessene Wert in m/s (128;129).

#### 5.2.4 Die diagnostische Bedeutung von Fibrosebiomarkern

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Entwicklung von Fibrosebiomarkern gearbeitet. Diese lassen sich in zwei Klassen einteilen. Klasse I Fibrosebiomarker spiegeln die Aktivität des fibrogenen Prozesses und damit den Umbau der Extrazellulärmatrix wider. Klasse II Biomarker zeigen den Grad der Fibrosierung und somit das Ausmaß der ECM-Ablagerung an.

##### **YKL-40**

YKL-40 zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit oder ohne CFLD (CFLD: 86,1 ng/ml vs. keine CFLD: 83,5 ng/ml,  $p = 0,283$ ).

YKL-40, ein Klasse I Fibrosebiomarker, gehört zur Familie der Chitinasen und wird vor allem in der menschlichen Leber und im arthritischen Gelenkknorpel exprimiert (130;131). Obwohl die exakte physiologische Funktion von YKL-40 noch nicht genau bekannt ist, geht man davon aus, dass es am Gewebeumbau und am Abbau der Extrazellulärmatrix teilnimmt (132). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass YKL-40 als Wachstumsfaktor für Fibroblasten eine Rolle spielt (133;134). Ausgehend von diesen Beobachtungen kann YKL-40 als nicht invasiver Marker für eine Entzündung oder eine Fibrose angesehen werden.

Bezogen auf eine Hepatopathie konnten erhöhte YKL-40-Serumspiegel bei der Alkoholischen Lebererkrankung sowie bei der HCV-induzierten Leberfibrose gefunden werden (135-137).

Der YKL-40-Serumspiegel steigt dabei linear mit dem Progressionsgrad der Leberfibrose an. In einer longitudinalen Kohortenstudie an HCV-Patienten konnten Kamal et al. zeigen, dass YKL-40 als Single-Serummarker für eine Leberfibrose dienen kann, da er in der Lage ist, zwischen einer schnellen und einer langsamen Fibroseentwicklung zu unterscheiden und somit die Progressionsrate der Fibrosierung widerzuspiegeln (131).

In einer von Rath et al. veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass YKL-40 einen validen Serummarker mit hoher diagnostischer Aussagekraft für eine HCV-assoziierte Hepatopathie darstellt (83).

In der vorliegenden Arbeit waren die YKL-40-Serumspiegel unter den CFLD-Patienten minimal erhöht, erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.



In einer Arbeit von Rath, Menéndez Menéndez und Kügler, die sowohl pädiatrische als auch erwachsene CF-Patienten einschloss, zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Expression von YKL-40 bei CFLD-Patienten als bei Patienten ohne Leberbeteiligung. Ferner wies YKL-40, verglichen mit anderen Serumfibrosemarkern, die höchste diagnostische Treffsicherheit für die Diagnose einer CFLD in der Gesamtkohorte auf. In Kombination mit der transienten Elastographie nahm die Sensitivität von YKL-40 im Hinblick auf eine CFLD zu.

Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass erhöhte YKL-40-Serumspiegel bei CF-Patienten eine Ansammlung hepatischer ECM widerspiegeln und dass die Bestimmung der YKL-40-Serumkonzentration bei der Diagnose einer Leberfibrose helfen könnte. Die Ursache für die fehlende Signifikanz in der vorliegenden Arbeit könnte in einer zu kleinen Zahl an Studienteilnehmern liegen (Vgl. n = 70; Rath et al. n = 145). Zudem ist denkbar, dass YKL-40 eher von pädiatrischen CFLD-Patienten im Serum exprimiert wird.

### ***Hyaluronsäure***

In verschiedenen Studien wurde Hyaluronsäure als potentieller Fibrosebiomarker diskutiert (138-141). Dabei konnten Wyatt und Kollegen in ihrer Arbeit zeigen, dass die HA-Serumspiegel bei CF-Kindern mit sonographisch nachweisbarer Leberbeteiligung signifikant erhöht sind. Gleichzeitig scheint die Serumkonzentration bei Patienten mit bereits fortgeschrittenem Leberschaden noch zuzunehmen. Da trotz entzündlicher und fibrotischer Prozesse innerhalb der Lungen der betroffenen Kinder keine Korrelation zwischen der HA-Serumkonzentration und der Lungenfunktion bestand, postulierte Wyatt, dass die erhöhten Hyaluronsäurespiegel eher auf ein Versagen der hepatischen Clearancefunktion zurückzuführen sind als auf eine pulmonale Überproduktion (141).

Tangkijvanich et al. zeigten, dass Hyaluronsäure das Ausmaß einer Leberfibrose sowie die Schwere einer Zirrhose bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung widerspiegelt (142).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem HA-Serumspiegel und einer Leberbeteiligung gefunden werden.

Die divergierenden Ergebnisse könnten unter anderem durch die unterschiedlichen Studienkollektive zu erklären sein. So untersuchten Tangkijvanich et al., im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, Patienten mit chronischer Hepatitis, Leberzirrhose sowie hepatozellulärem Karzinom (142). Lebensztejn et al. führten ihre Studie an Kindern mit nicht alkoholischer Fettlebererkrankung durch (139).

Zudem erfolgte die Diagnose „Hepatopathie“ unter anderem auch durch histologische Sicherung (139;142). Auf eine Leberbiopsie wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund ihrer Invasivität und Mortalität verzichtet.

Tangkijvanich et al. zeigten, dass die HA-Serumspiegel bei Leberzirrhose signifikant erhöht sind. Das Kollektiv der Patienten mit Leberzirrhose umfasste dabei 43 Studienteilnehmer.

Eine Unterteilung in Patienten mit bzw. ohne Leberzirrhose fand in der vorliegenden Arbeit nicht statt. Hier erfolgte eine Einteilung in Patienten ohne CFLD, Patienten mit CFLD und solche mit CFLD und gleichzeitig bestehender PHT. Die letztgenannte Subgruppe umfasste 9 Patienten. Wenn man nun diese Subgruppe mit der bei Tangkijvanich et al. aufgeführten Gruppe der Patienten mit Leberzirrhose vergleicht, unterscheiden sich die beiden Gruppen maßgeblich in ihrer Größe.

Ein weiterer Aspekt, der die divergierenden Ergebnisse dieser Studie erklären könnte, sind die unterschiedlichen Diagnosendefinitionen für eine CFLD. So wurde in dieser Arbeit eine CFLD diagnostiziert, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien zutrafen:

- Hepatomegalie +/- Splenomegalie
- Laborchemische Veränderungen
- Sonographische Auffälligkeiten

Auch Wyatt et al. führten HA-Bestimmungen an CF-Patienten durch. Jedoch umfasste ihr Studienkollektiv ausschließlich pädiatrische Patienten.

Auch erfolgte bei Wyatt et al. die Unterteilung in Subgruppen nach anderen Gesichtspunkten als in der vorliegenden Arbeit. Die Ursache für die divergierenden Ergebnisse in ihrer sowie in der vorliegenden Studie könnte auch am Alter der Patienten liegen. Möglicherweise kommt es bei pädiatrischen Patienten mit CF noch zu einer gesteigerten Expression von HA im Serum, wohingegen die HA-Produktion bei erwachsenen CF-Patienten stetig abnehmen könnte.

### ***MMPs und TIMPs***

Matrixmetalloproteinasen, eine Gruppe von Enzymen (so genannte Peptidasen), die die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen katalysieren, und TIMPs, deren spezifische Inhibitoren, sind von zentraler Bedeutung für fibrotische und fibrolytische Prozesse in der Leber. Erhöhte Expressionen von TIMP-1 und TIMP-2 konnten bei Leberschädigungen sowohl im Mausmodell (143) als auch beim Menschen nachgewiesen werden (144).

TIMPs als Marker für eine fortschreitende Fibrosierung der Leber wurden auch in anderen Studien untersucht. So kamen Liang und Kollegen in ihrer Arbeit an Patienten mit chronischer Hepatitis B-Infektion zu sehr ähnlichen Ergebnissen.

Sie konnten zeigen, dass HBV-Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose (Stadium F2-F4) signifikant höhere TIMP-2-Konzentrationen aufwiesen als Patienten mit frühem Fibrosestadium (145).

Benyon et al. untersuchten in ihrer Arbeit die TIMP-1- sowie TIMP-2-Expression bei verschiedenen Lebererkrankungen (biliäre Atresie, primär sklerosierende Cholangitis, primär biliäre Zirrhose). Sie konnten zeigen, dass erhöhte TIMP-Expressionen die Ablagerung von Kollagen im interstiellen Raum bei fibrotischen Lebererkrankungen begünstigen. Die Ablagerung des fibrotischen Materials im perisinusoidalen Raum führte dabei zu einer abnormen Funktion der angrenzenden parenchymatösen und nicht parenchymatösen Zellen (144).

Walsh und Kollegen identifizierten TIMP-1 und TIMP-2 als valide Marker einer fortgeschrittenen Leberfibrose bei HCV-Patienten. Mit zunehmender Schwere der Lebererkrankung stiegen dabei auch die Serumkonzentrationen der TIMPs an (146).

Aufgrund der oben aufgeführten Studienergebnisse, die erhöhte TIMP-Serumspiegel bei unterschiedlichen Lebererkrankungen feststellen konnten, lag der Schluss nahe, den Zusammenhang zwischen TIMP-1/-2 und einer CFLD zu beleuchten.

In der vorliegenden Arbeit waren die TIMP-2-Serumspiegel bei Patienten mit CFLD und PHT im Vergleich zu Patienten, die ausschließlich eine CFLD aufwiesen, sowie zu Patienten ohne Leberbeteiligung, signifikant erhöht. Darüber hinaus besaß TIMP-2 eine hohe diagnostische Aussagekraft in Bezug auf die Erkennung einer PHT.

TIMP-1 zeigte die beste diagnostische Genauigkeit unter allen Fibrosebiomarkern zur Erkennung einer CFLD. Eine Kombination der TIMP-1- bzw. TIMP-2-Serumwerte mit den Messergebnissen der transienten Elastographie verbesserte die Sensitivität und den negativen Vorhersagewert in Bezug auf die Diagnose einer CFLD (TIMP-1 + TE) sowie die Diagnose einer CFLD-assoziierten PHT (TIMP-2 + TE).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Mitglieder der TIMP-Familie viel versprechende Biomarker zur Diagnose einer CFLD sowie einer PHT sind. Dies könnte von besonderer Bedeutung sein, da die transiente Elastographie zur Diagnose einer erhöhten Lebersteifigkeit noch nicht flächendeckend eingesetzt wird und bisher nur größeren klinischen Zentren zur Verfügung steht.

### 5.3 Limitationen der Studie

Eine mögliche Einschränkung dieser Studie könnte das Fehlen von Biopsaten bzw. einer histopathologischen Beurteilung der CFLD sein.

Die sonographisch gesteuerte, perkutane Leberpunktion nach Menghini wird weltweit genutzt. Vorteile dieser Methode sind ihre schnelle und einfache Durchführbarkeit sowie ihre niedrigen Kosten. Zudem ist sie insgesamt recht sicher. Allerdings liegen hierfür nur wenige kontrollierte prospektiv erhobene Daten vor (147).

Signifikante Komplikationen treten bei etwa 1% aller Punktionen auf. Die Letalität liegt bei etwa 0,1% (148). Zu den bedeutendsten Komplikationen zählen Nachblutungen sowie ein Galleleck. Seltener sind Verletzungen anderer Organe (Gallenblase, Lunge, Niere) oder eine Bakteriämie. Das Blutungsrisiko ist unter anderem von der Art der Lebererkrankung und vom Vorliegen einer portalen Hypertension abhängig. Insgesamt wird der Nutzen einer Leberbiopsie, aufgrund des fokalen Vorkommens der Leberläsionen bei CFLD, sehr kontrovers diskutiert. Leberbiopsieverfahren werden bisher nicht zur Routinediagnostik eingesetzt (28;45).

Lewindon et al. konnten in ihrer Studie an Kindern und Jugendlichen mit zystischer Fibrose zeigen, dass die Leberbiopsie die Entwicklung einer klinisch signifikanten Fibrose vorhersagt (8). Dabei nutzten sie das Verfahren der Dual-Pass-Biopsie, wodurch der Stichprobenfehler gesenkt werden soll. Beim Dual-Pass-Verfahren werden, unter sonographischer Kontrolle und in Vollnarkose, über eine einzelne Hautinzision in verschiedenen Punktionswinkeln Proben aus dem rechten Leberlappen entnommen und anschließend histologisch untersucht. Lewindon und seine Kollegen fordern, dass der Leberbiopsie eine tragende Rolle in der Behandlung von Patienten mit potentieller CFLD zukommen sollte und drängen auf den flächendeckenden Einsatz von Biopsieverfahren.

Eine retrospektive Studie von Mueller-Abt et al. beschäftigte sich mit der Frage, ob die sonographischen und die histopathologischen Befunde bei CFLD miteinander korrelieren.

Ihre Daten zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen abnormen Ultraschallbefunden (Knotenbildung, Splenomegalie) und dem Vorhandensein einer Leberfibrose bzw. -zirrhose, verifiziert durch Leberbiopsie, besteht. Sie konnten zeigen, dass eine Veränderung der Echogenität, die auf eine Zirrhose hindeutet, eine moderate bis schwere Hepatopathie voraussagt. Sie schlussfolgerten daraus, dass in diesen Fällen auf eine Leberbiopsie verzichtet werden könnte.

Eine Einschränkung stellt allerdings die Tatsache dar, dass frühe Veränderungen im Rahmen einer CFLD nicht allein durch Ultraschall erkannt werden können und das hierbei histologische Untersuchungen zur Diagnosefindung beitragen können (94).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Mueller-Abt et al., weisen die Daten einer großen prospektiven Studie unter Kindern mit zystischer Fibrose darauf hin, dass Ultraschallbefunde in der Regel anderen Manifestationen einer Leberbeteiligung vorausgehen und dass daher die Sonographie als Screeningverfahren eingesetzt werden kann und sollte (149). Ein geschulter Untersucher ist in der Lage mittels Sonographie zwischen normalem Leberparenchym, Fettleber, Fibrose sowie den Zeichen einer PHT zu unterscheiden (150). Mit Hilfe der Sonographie lässt sich eine Leberzirrhose bereits im frühen Stadium auch ohne histopathologisches Korrelat erkennen (151).

Mehr als 50 Studien belegen, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Leberfibrosegrad und einer erhöhten Lebersteifigkeit besteht (106). Diese Tatsache sowie die oben genannten Betrachtungen lassen die Annahme zu, dass im vorliegenden Patientenkollektiv das erhöhte Risiko einer Biopsieentnahme gegenüber der fraglich zusätzlichen, diagnostischen Information, die die Histologie liefern würde, überwiegt.

Zudem entspricht ein Leberbiopsat nur etwa einem 25000stel bis einem 50000stel der Leber (9).

Mittels TE kann die Lebersteifigkeit in einem Zylinder von 1cm Breite und 4 cm Länge bestimmt werden. Somit ergibt sich ein Untersuchungsvolumen, das etwa 100-fach größer ist als bei einer Leberbiopsie (152).

Dennoch sind Stichprobenfehler möglich und könnten zur Heterogenität der Ergebnisse dieser Arbeit beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein hoher Prozentsatz an Patienten mit CFLD (54%) untersucht. Allerdings schwankt der Anteil an CF-Patienten mit Leberbeteiligung in den einzelnen Studien (3;4;35;116;153).

Die hohe Zahl an Patienten mit CFLD in der vorliegenden Arbeit könnte auch dadurch erklärt werden, dass Patienten mit bekannter Hepatopathie eine höhere Bereitschaft zeigen, an wissenschaftlichen Studien zur Erforschung neuer Möglichkeiten zur Diagnose einer Leberbeteiligung, teilzunehmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit könnte es jedoch unwillkürlich zu einer Überschätzung der CFLD-Patienten, gemessen an der Gesamtheit aller Patienten mit zystischer Fibrose, gekommen sein. Die bisher veröffentlichten Studien nutzen zum Teil andere Diagnosekriterien für eine CFLD. So messen Malbrunot-Wagner und Kollegen laborchemischen Veränderungen wie erhöhten Transaminasen oder einer erhöhten  $\gamma$ GT – die in der vorliegenden Arbeit durchaus zur Diagnose einer CFLD herangezogen wurden – keine diagnostische Bedeutung bei (11). Bei Karlas et al. findet eine zusätzliche Unterteilung in Patienten mit CFLD und Leberzirrhose statt (74). Auch Debray et al. empfehlen in ihrer Arbeit eine weitere Unterteilung der CF-Patienten in einzelne Subgruppen. Sie schlagen eine Unterteilung in Patienten mit schwerer Form der CFLD wie Leberzirrhose und/oder PHT sowie in Patienten mit leichter Form der CFLD vor (45).

Obwohl die Diagnosestellung einer CFLD in dieser Arbeit anhand der neuesten Leitlinien gestellt wurde (45), könnten der Gruppe der CFLD-Patienten fälschlicherweise zu viele Probanden zugeteilt worden sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TIMP-2 im untersuchten Patientenkollektiv einen validen Marker zur Erkennung einer CFLD sowie einer CFLD-assoziierten PHT darstellt.

Allerdings muss hierbei angemerkt werden, dass TIMP-2 kein leberspezifischer Marker ist. TIMP-2 zeigt erhöhte Expressionen bei Patienten mit Aortenstenose und anderen Fibrose-assoziierten Erkrankungen (154). Auch sind die TIMP-2-Serumspiegel bei chronischer Linksherzbelastung erhöht (155).

## 5.4 Ausblick

Bereits seit geraumer Zeit wird an der Entwicklung neuer nicht invasiver Methoden zur Erkennung einer Leberbeteiligung bei CF-Patienten gearbeitet. Erste Studien untersuchten die diagnostische Aussagekraft verschiedener bildgebender Verfahren. Roca und Kollegen konnten 1998 zeigen, dass mittels hepatobiliärer Szintigraphie Aussagen über die hepatozelluläre Funktion sowie eine Darstellung der Galleproduktion und des Galleabflusses aus der Leber in Gallenblase und Dünndarm möglich sind (156). Pérez-Aguilar et al. sprachen der MR-Cholangiographie eine besondere Bedeutung in der Diagnostik hepatobiliärer Veränderungen bei CF-Patienten zu (157). Ab dem Jahr 2009 folgten erste Ergebnisse bezüglich der transienten Elastographie und ihrer diagnostischen Güte im Hinblick auf eine CFLD (13). Bei der transienten Elastographie handelte es sich um ein Untersucher-unabhängiges, nicht invasives, schnelles und schmerzloses Verfahren, welches sich bereits bei fibrotischen Leberveränderungen unterschiedlicher Genese (chronische Hepatitis C, chronische Hepatitis B, alkoholische sowie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung) bewährt hatte (100;105;158;159).

Die von Witters und Kollegen festgestellten Zusammenhänge zwischen erhöhten TE-Messwerten und einer CFLD konnten durch andere Studien – die vorliegende Arbeit eingeschlossen – bestätigt werden (12;107;114).

Aktuell wird an weiteren bildgebenden, nicht invasiven Verfahren geforscht. Dabei stellt die Technik der Acoustic Radiation Force Impulse-Elastographie ein neues Diagnostikum dar, das zur Darstellung qualitativer sowie quantitativer Elastizitätseigenschaften von Geweben dient (74;126;160).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine sehr große Auswahl an potentiellen Fibrosebiomarkern hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagekraft bei CFLD-Patienten untersucht. Vorangegangene Studien hatten versucht suffiziente Leberfibrosemarker zu finden (81;90). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die transiente Elastographie sowie ausgewählte Fibrosebiomarker exzellent zur Erkennung einer CFLD eignen. Es stellte sich zudem heraus, dass eine Kombination der Fibrosebiomarker (in diesem Fall TIMP-1 bzw. TIMP-2) mit den Messergebnissen der transienten Elastographie die Sensitivität und den negativen Vorhersagewert in Bezug auf die Diagnose einer CFLD (TIMP-1 + TE) sowie die Diagnose einer CFLD-assoziierten PHT (TIMP-2 + TE) verbesserte.

Auch in Zukunft sollte den Fibrosebiomarkern ein hohes wissenschaftliches Interesse zukommen, stellen sie doch eine schnelle und vor allem nicht invasive Methode dar, um eine Leberfibrose frühzeitig zu diagnostizieren. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Fibrosemarkern scheint es eine Fülle weiterer Marker zu geben, die eine CFLD widerspiegeln. Dies konnte unter anderem in der Arbeit von Rath et al. gezeigt werden, die TIMP-4 sowie Endoglin als suffiziente Marker auswies. Auch diese beiden Fibrosebiomarker erhöhten die Sensitivität in Bezug auf die Diagnose einer CFLD, wenn sie mit den Messwerten der TE kombiniert wurden (161). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in der Routinediagnostik künftig ebenfalls eine Kombination von Fibrosebiomarkern und TE-Messwerten erfolgen sollte.

Eine CFLD manifestiert sich meist in der ersten Lebensdekade (11).

Es wäre daher denkbar, dass die erwachsenen CF-Patienten, die dieser Studie zugeführt wurden, bereits den Zeitpunkt des Eintretens einer CFLD überschritten haben. Folglich sollte das Hauptaugenmerk zukünftig auf der Untersuchung von Fibrosebiomarkern liegen, die bereits bei Kindern mit CF nachzuweisen sind.

Es muss ebenfalls angemerkt werden, dass die Expression der Fibrosebiomarker durch extrinsische Faktoren beeinflusst werden könnte. Es wäre z. B. möglich, dass ihre Serumkonzentration durch eine Therapie mit Ursodesoxycholsäure, die von den aktuellen Leitlinien empfohlen wird (45), erniedrigt wird. Der Einfluss dieser eventuellen Störfaktoren sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

Im Hinblick auf potentielle Fibrosebiomarker sind daher weiterführende Studien wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zahl von 70 CF-Patienten über einen Zeitraum von anderthalb Jahren (Juni 2009 bis Dezember 2010) untersucht. Insgesamt wären jedoch auch Studien an größeren Patientenkollektiven über einen längeren Untersuchungszeitraum sinnvoll.



## 6 Zusammenfassung

Die zystische Fibrose ist die häufigste autosomal-rezessive Erkrankung unter Kaukasiern. Als Folge einer Mutation kommt es zur Ausbildung eines fehlerhaften CFTR-Kanals in verschiedenen exokrinen Drüsen des menschlichen Körpers. Im hepatobiliären System führt die Störung dieses Kanals zur Sekretion eines wasserarmen, hochviskösen Sekrets, welches kumuliert und somit zu einer Obstruktion der intrahepatischen Gallengänge führt. Aufgrund dieser Obstruktion entwickelt sich mit der Zeit eine periportale Fibrose, deren Endstadium eine Zirrhose darstellt. Eine hepatische Manifestation tritt in 27-35% der Fälle auf (3;4).

Bisher mangelt es an sensitiven nicht invasiven Verfahren zur Erkennung einer CFLD.

Die vorliegende Arbeit verfolgt schwerpunktmäßig die diagnostische Aussagekraft der TE sowie potentieller Fibrosebiomarker hinsichtlich einer CFLD. Dabei wurde die TE bei 70 erwachsenen CF-Patienten zur Ermittlung der Lebersteifigkeit (in kPa) durchgeführt. Zusätzlich wurden ausgewählte Fibrosebiomarker, u. a. HA, YKL-40, TIMP-1 und TIMP-2, die mittels ELISA quantifiziert wurden, untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Lebersteifigkeit bei Patienten mit CFLD. Die TE wies dabei eine hohe Validität bezüglich der Diagnose einer CFLD auf. Bei Patienten, bei denen eine fortgeschrittene Leberfibrose bereits zur Ausbildung einer portalen Hypertension geführt hatte, bestanden ebenfalls erhöhte TE-Werte. Diese Werte waren im Vergleich zu Patienten mit CFLD und Patienten ohne Hepatopathie signifikant erhöht.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die TIMP-2-Serumspiegel bei Patienten mit CFLD und PHT im Vergleich zu Patienten, die ausschließlich eine CFLD aufwiesen, sowie zu Patienten ohne Leberbeteiligung, ebenfalls eine signifikante Erhöhung. Darüber hinaus besaß TIMP-2 eine hohe diagnostische Aussagekraft in Bezug auf die Erkennung einer PHT.

Eine Kombination der TIMP-1- bzw. TIMP-2-Serumwerte mit den Messergebnissen der TE verbesserte die Sensitivität und den negativen Vorhersagewert in Bezug auf die Diagnose einer CFLD (TIMP-1 + TE) sowie die Diagnose einer CFLD-assoziierten PHT (TIMP-2 + TE).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Mitglieder der TIMP-Familie viel versprechende Biomarker zur Diagnose einer CFLD sowie einer PHT sind. Ihre Bestimmung bestätigt und verbessert die diagnostische Güte der transienten Elastographie.

## 7 Summary

Cystic fibrosis is the most common autosomal recessive disease of the caucasian population. It is caused by a mutation in the gene for the protein cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. It is characterized by abnormal transport of chloride and sodium across the epithelium, leading to thick, viscous secretions.

In the hepatobiliary system the viscous secretion leads to plugging of the intrahepatic bile ducts. The typical hepatic lesion is a progressive periportal fibrosis, which finally eventuates in liver cirrhosis. The incidence of cystic fibrosis associated liver disease (CFLD) is ranging between 27% and 35%.

Routine sensitive non-invasive diagnostic tools are lacking so far.

The aim of this study was to compare the value of transient elastography (TE) and experimental fibrosis markers for the detection of liver disease in CF-patients.

70 adult CF-patients were prospectively studied and received transient elastography to measure the liver stiffness. Furthermore different experimental fibrosis markers (e. g. hyaluronic acid, YKL-40, TIMP-1, TIMP-2) for the non-invasive assessment of CFLD were tested.

Patients with CFLD had a significant higher liver stiffness. TE exhibited a high diagnostic accuracy for CFLD. In Patients with portal hypertension TE was enhanced, too. Liver stiffness showed a progressive rise from patients without CFLD over those with CFLD to patients with CFLD and PHT.

The underlying study showed that TIMP-2 had a significant higher expression in patients with CFLD and PHT compared to those with CFLD only and those without CFLD. In addition TIMP-2 exhibited a high diagnostic accuracy for the assessment of PHT.

A combination of TIMP-1 and TIMP-2 with TE led to an increased diagnostic sensitivity and an increased negative predictive value for the diagnosis of CFLD (TIMP-1 + TE) and for CF-associated PHT (TIMP-2 + TE).

The underlying study is the first report identifying members of the TIMP-family as potentially powerful markers for the detection of CFLD and PHT. Their determination may confirm and improve the diagnostic accuracy of transient elastography.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktureller Aufbau eines CFTR-Kanals innerhalb der Zellmembran. ....	6
Abbildung 2:	Formel zur Berechnung des APRI .....	17
Abbildung 3:	Fibroscan® 502.....	24
Abbildung 4:	Schematische Darstellung einer Fibroscan®-Messsonde und ihre Positionierung am Patienten während einer Messung .....	27
Abbildung 5:	Formel zur Berechnung der Lebersteifigkeit .....	28
Abbildung 6:	Formel zur Berechnung des Cut-off-Wertes .....	39
Abbildung 7:	Formel zur Berechnung des positiven Vorhersagewertes (PPV) .....	39
Abbildung 8:	Formel zur Berechnung des negativen Vorhersagewertes (NPV) .....	40
Abbildung 9:	Vorhandensein einer CFLD unter den einzelnen CF-Mutationen .....	43
Abbildung 10:	Verteilungsmuster der Diagnose CFLD unter männlichen sowie weiblichen Studienteilnehmern.....	44
Abbildung 11:	Fehlerbalkendiagramm mit dem 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes für die TE-Messwerte der Probanden. ....	45
Abbildung 12:	Expression von YKL-40 bei CF-Patienten. ....	46
Abbildung 13:	Expression von TIMP-1 bei CF-Patienten. ....	47
Abbildung 14:	Expression von Hyaluronsäure bei CF-Patienten .....	47
Abbildung 15:	Lebersteifigkeit bei CF-Patienten ohne CFLD, mit CFLD sowie bei Patienten mit CFLD und gleichzeitiger PHT.....	48
Abbildung 16:	Serumexpression von YKL-40 bei Patienten ohne CFLD, mit CFLD sowie mit CFLD und gleichzeitiger PHT. ....	49
Abbildung 17:	Serumexpression von Hyaluronsäure bei Patienten ohne CFLD, mit CFLD sowie mit CFLD und gleichzeitiger PHT.....	50
Abbildung 18:	Serumexpression von TIMP-1 bei Patienten ohne CFLD, mit CFLD sowie mit CFLD und gleichzeitiger PHT. ....	50
Abbildung 19:	Serumexpression von TIMP-2 bei Patienten ohne CFLD, mit CFLD sowie mit CFLD und gleichzeitiger PHT. ....	51

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Technische Voraussetzungen einer Leberbiopsie; Kriterien zur Bearbeitung und Beurteilung von Leberbiopsaten .....	12
Tabelle 2:	Histologische Klassifikationssysteme zur Einschätzung des Fibrosestadiums; hier am Beispiel der chronischen Virushepatitis. ....	14
Tabelle 3:	Child-Pugh-Kriterien .....	16
Tabelle 4:	Diagnosekriterien für eine CFLD .....	26
Tabelle 5:	Demographische und klinische Daten der CF-Patienten.....	42
Tabelle 6:	Diagnostische Güte von transienter Elastographie und Serumfibrinogenmarkern für die Diagnose einer CFLD und einer PHT.....	52

## 10 Literaturverzeichnis

- (1) Cohn JA, Strong TV, Picciotto MR, Nairn AC, Collins FS, Fitz JG. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells. *Gastroenterology* 1993 Dec;105(6):1857-64.
- (2) Colombo C. Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2007 Nov;13(6):529-36.
- (3) Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, Morabito A, Costantini D, Padoan R, Giunta A. Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology* 2002 Dec;36(6):1374-82.
- (4) Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B. Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology* 1999 Nov;30(5):1151-8.
- (5) Tanner MS, Taylor CJ. Liver disease in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1995 Apr;72(4):281-4.
- (6) Herrmann U, Dockter G, Lammert F. Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010 Oct;24(5):585-92.
- (7) Moyer K, Balistreri W. Hepatobiliary disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009 May;25(3):272-8.
- (8) Lewindon PJ, Shepherd RW, Walsh MJ, Greer RM, Williamson R, Pereira TN, Frawley K, Bell SC, Smith JL, Ramm GA. Importance of hepatic fibrosis in cystic fibrosis and the predictive value of liver biopsy. *Hepatology* 2011 Jan;53(1):193-201.
- (9) Friedrich-Rust M, Zeuzem S. [Transient elastography (FibroScan) for the non-invasive assessment of liver fibrosis: current status and perspectives]. *Z Gastroenterol* 2007 May;45(5):387-94.
- (10) Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 Dec;38(6):1449-57.
- (11) Malbrunot-Wagner AC, Bridoux L, Noursbaum JB, Riou C, Dirou A, Ginies JL, Maurage C, Cagnard B, Pelatan C, Dabadie A. Transient elastography and portal hypertension in pediatric patients with cystic fibrosis Transient elastography and cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2011 Sep;10(5):338-42.
- (12) Menten R, Leonard A, Clapuyt P, Vincke P, Nicolae AC, Lebecque P. Transient elastography in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Radiol* 2010 Jul;40(7):1231-5.
- (13) Witters P, De BK, Dupont L, Proesmans M, Vermeulen F, Servaes R, Verslype C, Laleman W, Nevens F, Hoffman I, Cassiman D. Non-invasive liver elastography (Fibroscan) for detection of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros* 2009 Dec;8(6):392-9.
- (14) Gressner AM, Gao CF, Gressner OA. Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: a short survey. *World J Gastroenterol* 2009 May 28;15(20):2433-40.

- (15) Lindemann H, Tümmler B., Dockter G. Mukoviszidose - Zystische Fibrose. 4. Auflage ed. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag; 2004.
- (16) Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989 Sep 8;245(4922):1073-80.
- (17) Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, . Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985 Nov 29;230(4729):1054-7.
- (18) Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 1985 Nov 28;318(6044):384-5.
- (19) Kliegman R., Behrman R., Jenson H, Stanton B. Nelson Textbook of Pediatrics. 18. Auflage ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
- (20) Boyle MP. Adult cystic fibrosis. *JAMA* 2007 Oct 17;298(15):1787-93.
- (21) Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M, Jr., Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* 1998 Feb;132(2):255-9.
- (22) Knowles MR, Friedman K.J., Silverman L.M. Genetics, diagnosis and clinical phenotype (Cystic Fibrosis in Adults). Philadelphia: Lippincott - Raven; 1999.
- (23) Ko YH, Thomas PJ, Delannoy MR, Pedersen PL. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein. *J Biol Chem* 1993 Nov 15;268(32):24330-8.
- (24) Lindblad A, Hultcrantz R, Strandvik B. Bile-duct destruction and collagen deposition: a prominent ultrastructural feature of the liver in cystic fibrosis. *Hepatology* 1992 Aug;16(2):372-81.
- (25) Bhaskar KR, Turner BS, Grubman SA, Jefferson DM, LaMont JT. Dysregulation of proteoglycan production by intrahepatic biliary epithelial cells bearing defective (delta-f508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hepatology* 1998 Jan;27(1):7-14.
- (26) Mehta A. CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr Pulmonol* 2005 Apr;39(4):292-8.
- (27) Oppenheimer EH, Esterly JR. Hepatic changes in young infants with cystic fibrosis: possible relation to focal biliary cirrhosis. *J Pediatr* 1975 May;86(5):683-9.
- (28) Sokol RJ, Durie PR. Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28 Suppl 1:S1-13.

- (29) Feranchak AP, Sokol RJ. Cholangiocyte biology and cystic fibrosis liver disease. *Semin Liver Dis* 2001 Nov;21(4):471-88.
- (30) Colombo C, Apostolo MG, Ferrari M, Seia M, Genoni S, Giunta A, Sereni LP. Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1994 Mar;124(3):393-9.
- (31) Wilschanski M, Rivlin J, Cohen S, Augarten A, Blau H, Aviram M, Bentur L, Springer C, Vila Y, Branski D, Kerem B, Kerem E. Clinical and genetic risk factors for cystic fibrosis-related liver disease. *Pediatrics* 1999 Jan;103(1):52-7.
- (32) Corbett K, Kelleher S, Rowland M, Daly L, Drumm B, Canny G, Greally P, Hayes R, Bourke B. Cystic fibrosis-associated liver disease: a population-based study. *J Pediatr* 2004 Sep;145(3):327-32.
- (33) Castaldo G, Fuccio A, Salvatore D, Raia V, Santostasi T, Leonardi S, Lizzi N, La RM, Rigillo N, Salvatore F. Liver expression in cystic fibrosis could be modulated by genetic factors different from the cystic fibrosis transmembrane regulator genotype. *Am J Med Genet* 2001 Feb 1;98(4):294-7.
- (34) Wilschanski M, Durie PR. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut* 2007 Aug;56(8):1153-63.
- (35) Scott-Jupp R, Lama M, Tanner MS. Prevalence of liver disease in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1991 Jun;66(6):698-701.
- (36) Ling SC, Wilkinson JD, Hollman AS, McColl J, Evans TJ, Paton JY. The evolution of liver disease in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1999 Aug;81(2):129-32.
- (37) Debray D, Lykavieris P, Gauthier F, Dousset B, Sardet A, Munck A, Laselve H, Bernard O. Outcome of cystic fibrosis-associated liver cirrhosis: management of portal hypertension. *J Hepatol* 1999 Jul;31(1):77-83.
- (38) Feigelson J, Anagnostopoulos C, Poquet M, Pecau Y, Munck A, Navarro J. Liver cirrhosis in cystic fibrosis--therapeutic implications and long term follow up. *Arch Dis Child* 1993 May;68(5):653-7.
- (39) Gooding I, Dondos V, Gyi KM, Hodson M, Westaby D. Variceal hemorrhage and cystic fibrosis: outcomes and implications for liver transplantation. *Liver Transpl* 2005 Dec;11(12):1522-6.
- (40) Sherlock S., Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 10. Auflage ed. Oxford, Cambridge: Blackwell Science; 1997.
- (41) Pencharz PB, Durie PR. Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment. *Clin Nutr* 2000 Dec;19(6):387-94.
- (42) Minicucci L, Lorini R, Giannattasio A, Colombo C, Iapichino L, Reali MF, Padoan R, Calevo MG, Casciaro R, De AA, Haupt R. Liver disease as risk factor for cystic fibrosis-related diabetes development. *Acta Paediatr* 2007 May;96(5):736-9.



- (43) Alex G, Catto-Smith AG, Ditchfield M, Roseby R, Robinson PJ, Cameron FJ, Oliver MR. Is significant cystic fibrosis-related liver disease a risk factor in the development of bone mineralization abnormalities? *Pediatr Pulmonol* 2006 Apr;41(4):338-44.
- (44) Colombo C, Costantini D, Rocchi A, Romano G, Rossi G, Bianchi ML, Bertoli S, Battezzati A. Effects of liver transplantation on the nutritional status of patients with cystic fibrosis. *Transpl Int* 2005 Feb;18(2):246-55.
- (45) Debray D, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C. Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros* 2011 Jun;10 Suppl 2:S29-S36.
- (46) Potter CJ, Fishbein M, Hammond S, McCoy K, Qualman S. Can the histologic changes of cystic fibrosis-associated hepatobiliary disease be predicted by clinical criteria? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997 Jul;25(1):32-6.
- (47) Schirmacher P, Fleig WE, Tannapfel A, Langner C, Dries V, Terracciano L, Denk H, Dienes HP. [Bioptic diagnosis of chronic hepatitis. Results of an evidence-based consensus conference of the German Society of Pathology, of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases and of Compensated Hepatitis (HepNet)]. *Pathologe* 2004 Sep;25(5):337-48.
- (48) Stauber R. Nicht invasive Diagnose der Leberfibrose bei chronischen Hepatopathien. *Journal für gastroenterologische und hepatologische Erkrankungen - Fachzeitschrift für Erkrankungen des Verdauungstraktes* 2009;7(4):12-7.
- (49) Baunsgaard P, Sanchez GC, Lundborg CJ. The variation of pathological changes in the liver evaluated by double biopsies. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1979 Jan;87(1):51-7.
- (50) Bedossa P, Poynard T, Naveau S, Martin ED, Agostini H, Chaput JC. Observer variation in assessment of liver biopsies of alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1988 Feb;12(1):173-8.
- (51) Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, Pudifin DJ. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986 Mar 8;1(8480):523-5.
- (52) Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, Gallois Y, Cales P. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol* 1998 Mar;28(3):439-46.
- (53) Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *Am J Gastroenterol* 2002 Oct;97(10):2614-8.
- (54) Soloway RD, Baggenstoss AH, Schoenfield LJ, Summerskill WH. Observer error and sampling variability tested in evaluation of hepatitis and cirrhosis by liver biopsy. *Am J Dig Dis* 1971 Dec;16(12):1082-6.

- (55) Westin J, Lagging LM, Wejstal R, Norkrans G, Dhillon AP. Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver* 1999 Jun;19(3):183-7.
- (56) Afdhal NH. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood tests? *Hepatology* 2003 May;37(5):972-4.
- (57) Cholongitas E, Senzolo M, Standish R, Marelli L, Quaglia A, Patch D, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of the quality of liver biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2006 May;125(5):710-21.
- (58) Desmet VJ, Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis [Hepatology 1981;1:431-435]. *J Hepatol* 2003 Apr;38(4):382-6.
- (59) Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994 Jun;19(6):1513-20.
- (60) Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994 Jul;20(1 Pt 1):15-20.
- (61) Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, . Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995 Jun;22(6):696-9.
- (62) Lörke J., Erhardt A., Vogt C., Häussinger D. Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 2007;104(24):1752-7.
- (63) Dormann A., Luley C., Wege T. Laborwerte. 4. Auflage ed. München: Urban & Fischer Verlag; 2005.
- (64) Williams AL, Hoofnagle JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology* 1988 Sep;95(3):734-9.
- (65) Dörner K. Klinische Chemie und Hämatologie. 6. Auflage ed. Stuttgart - New York: Thieme Verlag; 2006.
- (66) Scharrer I. [Liver cirrhosis and coagulopathy]. *Hamostaseologie* 2005 May;25(2):205-8.
- (67) Herold G. Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 519. 2009. Köln, Dr. med. Gerd Herold, Arzt für Innere Medizin/ Arbeitsmedizin, Bernhard-Falk-Straße 27, 50737 Köln.  
Ref Type: Generic
- (68) Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005 Jun;41(6):1376-82.

- (69) Celikbilek M, Dogan S, Gursoy S, Zararsiz G, Yurci A, Ozbakir O, Guven K, Yucesoy M. Noninvasive assessment of liver damage in chronic hepatitis B. *World J Hepatol* 2013 Aug 27;5(8):439-45.
- (70) Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003 Aug;38(2):518-26.
- (71) Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konate A, Gallois Y, Ternisien C, Chevaller A, Lunel F. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005 Dec;42(6):1373-81.
- (72) Halfon P, Bacq Y, De MA, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Brechot MC, Degott C, Paradis V. Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007 Mar;46(3):395-402.
- (73) England K, Thorne C, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML. Age- and sex-related reference ranges of alanine aminotransferase levels in children: European paediatric HCV network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009 Jul;49(1):71-7.
- (74) Karlas T, Neuschulz M, Oltmanns A, Guttler A, Petroff D, Wirtz H, Mainz JG, Mossner J, Berg T, Troltsch M, Keim V, Wiegand J. Non-invasive evaluation of cystic fibrosis related liver disease in adults with ARFI, transient elastography and different fibrosis scores. *PLoS One* 2012;7(7):e42139.
- (75) Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol* 2007 Nov;102(11):2589-600.
- (76) Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006 Jan;10(1):76-99.
- (77) Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996 Apr;42(4):558-63.
- (78) Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005 Aug;25(4):779-86.
- (79) Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, Simpson J, Bray G, Catterall AP, Murray-Lyon IM, Peters TJ, Williams R, Thompson RP. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet* 1993 Oct 9;342(8876):895-8.
- (80) Nojgaard C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003 Aug;39(2):179-86.

- (81) Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, Hubscher S, Roskams T, Pinzani M, Arthur MJ. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004 Dec;127(6):1704-13.
- (82) Tao H, Yang JJ, Shi KH, Huang C, Zhang L, Lv XW, Li J. The significance of YKL-40 protein in liver fibrosis. *Inflamm Res* 2014 Apr;63(4):249-54.
- (83) Rath T, Roderfeld M, Guler C, Wenzel C, Graf J, Beitinger F, Roeb E, Zachoval R. YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 2011 Nov;46(11):1369-80.
- (84) Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech* 2014 Feb;7(2):193-203.
- (85) Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1334-47.
- (86) Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 2008 Feb;19(1):34-41.
- (87) Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004 Aug;4(8):617-29.
- (88) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997 Oct;74(2):111-22.
- (89) Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010 Jan;1803(1):55-71.
- (90) Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2004 Dec;41(6):935-42.
- (91) Patel K, Nelson DR, Rockey DC, Afdhal NH, Smith KM, Oh E, Hettinger K, Vallee M, Dev A, Smith-Riggs M, McHutchison JG. Correlation of FIBROspect II with histologic and morphometric evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008 Feb;6(2):242-7.
- (92) Schmidt G., Görg C. *Kursbuch Ultraschall: Nach den Richtlinien der DEGUM und der KBV. 5. Auflage ed.* Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag; 2008.
- (93) Aube C, Oberti F, Koralı N, Namour MA, Loisel D, Tanguy JY, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Caron C, Cales P. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol* 1999 Mar;30(3):472-8.
- (94) Mueller-Abt PR, Frawley KJ, Greer RM, Lewindon PJ. Comparison of ultrasound and biopsy findings in children with cystic fibrosis related liver disease. *J Cyst Fibros* 2008 May;7(3):215-21.

- (95) Durieu I, Pellet O, Simonot L, Durupt S, Bellon G, Durand DV, Minh VA. Sclerosing cholangitis in adults with cystic fibrosis: a magnetic resonance cholangiographic prospective study. *J Hepatol* 1999 Jun;30(6):1052-6.
- (96) Dogan AS, Conway JJ, Lloyd-Still JD. Hepatobiliary scintigraphy in children with cystic fibrosis and liver disease. *J Nucl Med* 1994 Mar;35(3):432-5.
- (97) O'Connor PJ, Southern KW, Bowler IM, Irving HC, Robinson PJ, Littlewood JM. The role of hepatobiliary scintigraphy in cystic fibrosis. *Hepatology* 1996 Feb;23(2):281-7.
- (98) Foster JA, Ramsden WH, Conway SP, Taylor JM, Etherington C. The role of IDA scintigraphy in the follow-up of liver disease in patients with cystic fibrosis. *Nucl Med Commun* 2002 Jul;23(7):673-81.
- (99) Colombo C, Castellani MR, Balistreri WF, Seregini E, Assaisso ML, Giunta A. Scintigraphic documentation of an improvement in hepatobiliary excretory function after treatment with ursodeoxycholic acid in patients with cystic fibrosis and associated liver disease. *Hepatology* 1992 Apr;15(4):677-84.
- (100) Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003 Dec;29(12):1705-13.
- (101) Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007 Jul;56(7):968-73.
- (102) Reinhardt D., Götz M., Kraemer R., Schöni M. *Cystische Fibrose*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag; 2001.
- (103) Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Jr., Willey-Courand DB, Bujan J, Finder J, Lester M, Quittell L, Rosenblatt R, Vender RL, Hazle L, Sabadosa K, Marshall B. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Nov 15;176(10):957-69.
- (104) Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2005 Mar;4(1):7-26.
- (105) Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de L, V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005 Jan;41(1):48-54.
- (106) Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, Herrmann E. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008 Apr;134(4):960-74.
- (107) Rath T, Menendez KM, Kugler M, Hage L, Wenzel C, Schulz R, Graf J, Nahrlich L, Roeb E, Roderfeld M. TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. *Dig Liver Dis* 2012 Sep;44(9):780-7.

- (108) Brosius F. SPSS 20 für Dummies. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012.
- (109) Tajiri T, Yoshida H, Obara K, Onji M, Kage M, Kitano S, Kokudo N, Kokubu S, Sakaida I, Sata M, Tajiri H, Tsukada K, Nonami T, Hashizume M, Hirota S, Murashima N, Moriyasu F, Saigenji K, Makuuchi H, Oho K, Yoshida T, Suzuki H, Hasumi A, Okita K, Futagawa S, Idezuki Y. General rules for recording endoscopic findings of esophagogastric varices (2nd edition). *Dig Endosc* 2010 Jan;22(1):1-9.
- (110) Hubbard AM, Meyer JS, Mahboubi S. Diagnosis of liver disease in children: value of MR angiography. *AJR Am J Roentgenol* 1992 Sep;159(3):617-21.
- (111) Vogl T. MR-Angiographie und MR-Tomographie des Gefäßsystems. 1. Auflage ed. Berlin - Heidelberg: Springer Verlag; 1995.
- (112) Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008 Mar 8;371(9615):838-51.
- (113) Breton E, Bridoux-Henno L, Guyader D, Danielou H, Jouan H, Beuchee A, Nousbaum JB, Dabadie A. [Value of transient elastography in noninvasive assessment in children's hepatic fibrosis]. *Arch Pediatr* 2009 Jul;16(7):1005-10.
- (114) Kitson MT, Kemp WW, Iser DM, Paul E, Wilson JW, Roberts SK. Utility of transient elastography in the non-invasive evaluation of cystic fibrosis liver disease. *Liver Int* 2013 May;33(5):698-705.
- (115) Ciuca IM, Pop L, Tamas L, Taban S. Cystic fibrosis liver disease - from diagnosis to risk factors. *Rom J Morphol Embryol* 2014;55(1):91-5.
- (116) Lamireau T, Monnereau S, Martin S, Marcotte JE, Winnock M, Alvarez F. Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study. *J Hepatol* 2004 Dec;41(6):920-5.
- (117) Bhardwaj S, Canlas K, Kahi C, Temkit M, Molleston J, Ober M, Howenstine M, Kwo PY. Hepatobiliary abnormalities and disease in cystic fibrosis: epidemiology and outcomes through adulthood. *J Clin Gastroenterol* 2009 Oct;43(9):858-64.
- (118) Dockter G., Lindemann H. Mukoviszidose. 3. Auflage ed. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag; 2000.
- (119) Fustik S, Trajkovska M, Jakovska T, Spirevska L, Josifovska T, Koceva S. Screening for liver disease in cystic fibrosis: analysis of clinical and genetic risk factors for its development. *Turk J Pediatr* 2008 Nov;50(6):526-32.
- (120) Efrati O, Barak A, Modan-Moses D, Augarten A, Vilozni D, Katznelson D, Szeinberg A, Yahav J, Bujanover Y. Liver cirrhosis and portal hypertension in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003 Oct;15(10):1073-8.
- (121) Karadsheh Z, Allison H. Primary prevention of variceal bleeding: pharmacological therapy versus endoscopic banding. *N Am J Med Sci* 2013 Oct;5(10):573-9.

- (122) Costa PC, Barreto CC, Pereira L, Lobo ML, Costa MA, Lopes AI. Cystic fibrosis-related liver disease: a single-center experience. *Pediatr Rep* 2011 Jun 30;3(3):e21.
- (123) Leeuwen L, Magoffin AK, Fitzgerald DA, Cipolli M, Gaskin KJ. Cholestasis and meconium ileus in infants with cystic fibrosis and their clinical outcomes. *Arch Dis Child* 2014 May;99(5):443-7.
- (124) Ormeno JA, Garcia DC, Sumire UJ, Asato HC. [Chronic liver disease associated with cystic fibrosis in the Hospital Alberto Sabogal Sologuren, Lima, Peru: report of a case]. *Rev Gastroenterol Peru* 2013 Jul;33(3):246-50.
- (125) Vandeleur M, Massie J, Oliver M. Gastrostomy in children with cystic fibrosis and portal hypertension. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013 Aug;57(2):245-7.
- (126) Manco M, Zupone CL, Alghisi F, D'Andrea ML, Lucidi V, Monti L. Pilot study on the use of acoustic radiation force impulse imaging in the staging of cystic fibrosis associated liver disease. *J Cyst Fibros* 2012 Sep;11(5):427-32.
- (127) Monti L, Manco M, Lo ZC, Latini A, D'Andrea ML, Alghisi F, Lucidi V, Toma P, Bonomo L. Acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging with Virtual Touch Tissue Quantification in liver disease associated with cystic fibrosis in children. *Radiol Med* 2012 Dec;117(8):1408-18.
- (128) Klein B. Elastizitäts-Quantifizierung mittels Acoustic radiation Force Impulse Elastographie: Werte in nephrologischen Normkollektiven und erste Erfahrungen bei Nierenerkrankungen. 14: 2013.
- (129) Nightingale K, McAleavey S, Trahey G. Shear-wave generation using acoustic radiation force: in vivo and ex vivo results. *Ultrasound Med Biol* 2003 Dec;29(12):1715-23.
- (130) Hu B, Trinh K, Figueira WF, Price PA. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J Biol Chem* 1996 Aug 9;271(32):19415-20.
- (131) Kamal SM, Turner B, He Q, Rasenack J, Bianchi L, Al TA, Nooman A, Massoud M, Koziel MJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology* 2006 Apr;43(4):771-9.
- (132) Wang D, Lu JG, Wang Q, Du XL, Dong R, Wang P, Zhao L, Jiang X, Yuan LJ. Increased immunohistochemical expression of YKL-40 in the spleen of patients with portal hypertension. *Braz J Med Biol Res* 2012 Mar;45(3):264-72.
- (133) De CF, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureau P. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Jul 27;285(4):926-31.

- (134) Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 2002 Jul 1;365(Pt 1):119-26.
- (135) Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadham D, Sterling RK, Su GL, Ghosh M, Wright EC. Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008 Mar;47(3):789-98.
- (136) Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, Rawlins SR, Sanderson SO, Levine RA. Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, FIBROSpect II, and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2008 Apr;103(4):928-36.
- (137) Saitou Y, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Kawakita T, Yamamoto N, Sugimoto K, Murata K, Nakano T. Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease. *World J Gastroenterol* 2005 Jan 28;11(4):476-81.
- (138) Fontana RJ, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Sterling RK, Naishadham D, Goodman ZD, Lok AS, Wright EC, Su GL. Serum fibrosis markers are associated with liver disease progression in non-responder patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2010 Oct;59(10):1401-9.
- (139) Lebensztejn DM, Wierzbicka A, Socha P, Pronicki M, Skiba E, Werpachowska I, Kaczmarski M. Cytokeratin-18 and hyaluronic acid levels predict liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochim Pol* 2011;58(4):563-6.
- (140) Pereira TN, Lewindon PJ, Smith JL, Murphy TL, Lincoln DJ, Shepherd RW, Ramm GA. Serum markers of hepatic fibrogenesis in cystic fibrosis liver disease. *J Hepatol* 2004 Oct;41(4):576-83.
- (141) Wyatt HA, Dhawan A, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Price JF. Serum hyaluronic acid concentrations are increased in cystic fibrosis patients with liver disease. *Arch Dis Child* 2002 Mar;86(3):190-3.
- (142) Tangkijvanich P, Kongtawelert P, Pothacharoen P, Mahachai V, Suwangool P, Poovorawan Y. Serum hyaluronan: a marker of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003 Jun;21(2):115-20.
- (143) Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997 Sep;27(3):535-44.
- (144) Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996 Mar;110(3):821-31.



- (145) Liang B, Li Y, Zhao A, Xie F, Guo Z. Clinical utility of serum matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 concentrations in the assessment of liver fibrosis due to chronic hepatitis B. *J Int Med Res* 2012;40(2):631-9.
- (146) Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999 Mar;44(3):624-30.
- (147) Tannapfel A, Dienes HP, Lohse AW. The indications for liver biopsy. *Dtsch Arztebl Int* 2012 Jul;109(27-28):477-83.
- (148) Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology* 2009 Mar;49(3):1017-44.
- (149) Lenaerts C, Lapierre C, Patriquin H, Bureau N, Lepage G, Harel F, Marcotte J, Roy CC. Surveillance for cystic fibrosis-associated hepatobiliary disease: early ultrasound changes and predisposing factors. *J Pediatr* 2003 Sep;143(3):343-50.
- (150) Patriquin H, Lafortune M, Burns PN, Dauzat M. Duplex Doppler examination in portal hypertension: technique and anatomy. *AJR Am J Roentgenol* 1987 Jul;149(1):71-6.
- (151) Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, Piscaglia F, Siringo S, D'Errico A, Zironi G, Grigioni W, Bolondi L. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J Hepatol* 1997 Dec;27(6):979-85.
- (152) Gomez-Dominguez E, Mendoza J, Rubio S, Moreno-Monteagudo JA, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Aug 1;24(3):513-8.
- (153) Gaskin KJ, Waters DL, Howman-Giles R, de SM, Earl JW, Martin HC, Kan AE, Brown JM, Dorney SF. Liver disease and common-bile-duct stenosis in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1988 Feb 11;318(6):340-6.
- (154) Kitamura H, Oosawa Y, Kawano N, Kameda Y, Hayashi H, Nakatani Y, Udaka N, Ito T, Miyazaki K. Basement membrane patterns, gelatinase A and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expressions, and stromal fibrosis during the development of peripheral lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1999 Mar;30(3):331-8.
- (155) Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, Gillijns H, Herijgers P, Flameng W, Carmeliet P, Van de WF, Pinto YM, Janssens S. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation* 2005 Aug 23;112(8):1136-44.

- (156) Roca I, Ciofetta G. Hepatobiliary scintigraphy in current pediatric practice. *Q J Nucl Med* 1998 Jun;42(2):113-8.
- (157) Perez-Aguilar F, Martinez-Sanjuan V, Montoliu G, Lloret M, Ferrer-Calvete J, Ponce J, Berenguer J. [Usefulness of magnetic cholangioresonance in the study of hepatobiliary disease in patients adults with cystic fibrosis]. *Gastroenterol Hepatol* 2001 Mar;24(3):122-6.
- (158) Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le BB, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, de L, V. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005 Feb;128(2):343-50.
- (159) Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le BB, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de L, V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006 Mar;55(3):403-8.
- (160) Friedrich-Rust M, Schlueter N, Smaczny C, Eickmeier O, Rosewich M, Feifel K, Herrmann E, Poynard T, Gleiber W, Lais C, Zielen S, Wagner TO, Zeuzem S, Bojunga J. Non-invasive measurement of liver and pancreas fibrosis in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2013 Sep;12(5):431-9.
- (161) Rath T, Hage L, Kugler M, Menendez MK, Zachoval R, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E. Serum proteome profiling identifies novel and powerful markers of cystic fibrosis liver disease. *PLoS One* 2013;8(3):e58955.

## 11 Abkürzungsverzeichnis

°C	°Celcius
µl	Mikroliter
AAR	AST/ALT-Ratio, De-Ritis-Quotient
ABC	ATP binding cassette
APRI	AST To Platelet Ratio Index
ARFI	Acoustic Radiation Force Impulse Elastographie
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
AUROC	Area Under Receiver Operating Characteristic Curve
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose (engl. Cystic fibrosis)
CFLD	CF-assozierte Lebererkrankung (engl. Cystic fibrosis associated liver disease)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CT	Computertomographie
ECM	Extrazellularmatrix
ELISA	Enzyme Linkes Immunosorbent Assay
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
HA	Hyaluronsäure (engl. Hyaluronic acid)
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
kPA	Kilopascal

l	Liter
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
nm	Nanometer
NPV	Negativer Vorhersagewert (engl. negative predictive value)
OD	Optische Dichte
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
P III P	Prokollagen-(III)-Peptid
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphat Buffered Saline)
pg	Pikogramm
PPV	Positiver Vorhersagewert (engl. positive predictive value)
R-Domäne	Regulatorische Domäne
ROC	Receiver Operating Characteristic
RPM	Rounds per minute
Tc-99m	Technetium 99m
TE	Transiente Elastographie
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases
YKL-40	Chitinase-3-like-protein-1 (CHI3L1)

## 12 Danksagung

An erster Stelle sei Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb herzlichst für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für ihre Geduld gedankt.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Martin Roderfeld, der die Einarbeitung in die experimentelle Methodik ausgezeichnet begleitete und für jede komplexe Fragestellung zu jeder Zeit eine Anregung zur Lösung fand. Insbesondere danke ich ihm auch für seine unermüdliche Geduld und sein außerordentliches Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Ohne ihn wäre eine Fertigstellung meiner Arbeit nicht denkbar gewesen.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Timo Rath bedanken, dessen Ratschläge und Hilfestellungen mir stets den Mut und die Kraft gaben „am Ball zu bleiben“.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe (insbesondere Annette Tschuschner und Michaela Weiß) für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen wertvollen Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern der medizinischen Klinik II und Poliklinik des Universitätsklinikums Gießen für ihre Hilfe und Geduld während der langen Zeit der Probensammlung danken.

Ich danke dem Mukoviszidose Förderverein Gießen, insbesondere Prof. Dr. med. Hermann Lindemann, für die Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt meiner Studienkollegin und Mitdotorandin Marion Kügler; in Gesellschaft machte die Zeit der Probensammlung und Laborarbeit noch mehr Freude.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich all die Jahre aufopferungsvoll unterstützt haben. Ich danke ihnen insbesondere für ihren stetigen Rat und ihren Glauben in meine Fähigkeiten.

Vielen Dank, Dennis, für alles.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 14 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, im Dezember 2014

Katrin Menéndez Menéndez





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6372-6



9 783835 963726