

Serum Proteome Profiling identifiziert neuartige und leistungsfähige  
Marker für die Leberbeteiligung bei Mukoviszidose

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

Vorgelegt von Hage, Lisa  
aus Nordhorn

Gießen 2015

Aus der Medizinischen Klinik II Schwerpunkt Gastroenterologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
unter der Leitung von  
Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb MA

Gutachter: Prof. Dr. E. Roeb

Gutachter: PD Dr. H. Jomaa

Tag der Disputation: 23.06.2016

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Mukoviszidose .....	1
1.1.1	Epidemiologie und Geschichte.....	1
1.1.2	Genetik und Pathomechanismen .....	1
1.1.3	Diagnostik .....	2
1.1.4	Hepatobiliäre Manifestation .....	4
1.1.4.1	Diagnostik der Leberbeteiligung .....	5
1.1.4.2	Komplikationen .....	6
1.1.4.3	Therapieansätze .....	7
1.1.5	Weitere Manifestationen .....	8
1.2	Transiente hepatische Elastographie .....	9
1.3	Bestimmung geeigneter Serumparameter .....	10
1.4	Ziele und Fragestellung der Arbeit.....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Patientenkollektiv .....	12
2.2	Transiente hepatische Elastographie .....	12
2.2.1	Gerätebeschreibung und Funktionsweise .....	12
2.2.2	Durchführung der Untersuchung.....	15
2.2.3	Erfasste Parameter .....	15
2.2.4	Kriterien für eine gültige Messung.....	16
2.2.5	Ausschlusskriterien .....	18
2.3	Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben .....	18
2.4	Durchführung der Leberbiopsie .....	18
2.5	Verwendete Materialien und Geräte .....	19
2.6	Proteome Profiler Assay.....	20
2.6.1	Durchführung und Auswertung.....	20
2.6.2	Human Angiogenesis Array Kit .....	20
2.6.3	Human Chemokine Array Kit .....	21
2.6.4	Human Cytokine Array Panel A .....	21
2.6.5	Human Soluble Receptor Array Kit, Non-Hematopoietic Panel .....	21

2.7	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	22
2.7.1	Probenmaterial .....	22
2.7.2	Charakteristika der eingesetzten ELISA .....	22
2.7.3	Durchführung und Auswertung.....	22
2.7.3.1	Prinzip des Sandwich-ELISA.....	22
2.7.3.2	Prinzip des kompetitiven ELISA.....	23
2.8	Statistische Auswertung .....	24
3	Ergebnisse .....	25
3.1	Patientencharakteristika .....	25
3.2	Ergebnisse der Proteome Profiler Analysen.....	27
3.2.1	Human Chemokine Array Kit .....	27
3.2.2	Human Angiogenesis Array Kit.....	29
3.2.3	Human Soluble Receptor Array Kit, Non-Hematopoietic Panel .....	31
3.2.3.1	Part N.....	31
3.2.3.2	Part C.....	33
3.2.4	Human Cytokine Array Panel A .....	35
3.3	Ergebnisse der ELISA – Analysen.....	37
3.3.1	Expression der Serummarker bei Mukoviszidose .....	37
3.3.2	Potentielle Einflussfaktoren auf die Expressionsrate der Serummarker .....	38
3.3.3	Zusammenhang zwischen Expression der Serummarker und Fibrosestadien bei HCV-Patienten .....	39
3.4	Ergebnisse der transienten hepatischen Elastographie (Fibroscan®) .....	40
3.4.1	Einsatz der transienten Elastographie bei Mukoviszidosepatienten .....	40
3.4.2	Zusammenhang zwischen Höhe der gemessenen Lebersteifigkeit und den Resultaten eines Sonographiescores zur Beurteilung des Ausmaßes der Leberschädigung bei Mukoviszidosepatienten .....	41
3.4.3	Zusammenhang zwischen transientser hepatischer Elastographie (Fibroscan ®) und Expression der Serummarker.....	42
3.5	Diagnostische Performance klinischer Parameter und neuer Marker für die Diagnose einer CFLD.....	43

4	Diskussion .....	45
4.1	Relevanz der Fragestellung .....	45
4.2	Beurteilung der identifizierten Serumfibrosemarker.....	45
4.2.1	Endoglin .....	45
4.2.2	TIMP-4 .....	47
4.2.3	Pentraxin 3.....	49
4.2.4	Hepatocyte Growth Factor .....	51
4.3	Bewertung der transienten Elastographie zur nicht invasiven Diagnostik der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose .....	52
4.4	Vergleich der transienten hepatischen Elastographie (Fibroscan ®) mit weiteren diagnostischen Methoden zur Bestimmung der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose .....	54
4.4.1	Leberpunktion .....	54
4.4.2	Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) .....	56
4.4.3	Abdomensonographie.....	58
4.5	Vergleich der Serumfibrosemarker bei HCV-Patienten mit den Ergebnissen bei Mukoviszidosepatienten .....	60
4.6	Limitationen der Studie .....	63
4.7	Schlussfolgerungen .....	63
4.8	Ausblick .....	64
5	Zusammenfassung .....	65
6	Summary .....	66
7	Abkürzungsverzeichnis .....	67
8	Abbildungsverzeichnis .....	71
9	Tabellenverzeichnis.....	73
10	Literaturverzeichnis.....	75
11	Anhang .....	89
12	Publikationsverzeichnis.....	92
13	Erklärung zur Dissertation .....	94
14	Danksagung.....	95

# **1 Einleitung**

## **1.1 Mukoviszidose**

### **1.1.1 Epidemiologie und Geschichte**

Die ersten Berichte über Kinder, die mutmaßlich an Mukoviszidose gestorben sind, gehen auf die Mitte des 16. Jahrhunderts zurück. Konkret benannt wurde die Krankheit erstmals 1938 durch Dorothy Andersen, die ihr aufgrund der typischen Veränderungen des Pankreas den Namen Zystische Fibrose gab (Andersen 1938). Dieser Name wird auch heute noch neben Mukoviszidose (von lateinisch mucus: Schleim und viscidus: zäh) benutzt.

Bei der Erkrankung Mukoviszidose handelt es sich um eine genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung mit einem autosomal-rezessiven Erbgang. Die weltweite Inzidenz liegt bei ca. 1:3000 Geburten. Die Heterozygotenfrequenz beträgt ca. 1:25 (Ciuca et al. 2014), somit ist jeder 25. Deutsche gesunder Genträger der Erkrankung Mukoviszidose. Unabhängige Risikofaktoren für einen Tod an den Folgen der Mukoviszidoseerkrankung sind neben weiblichem Geschlecht und Lungenbeteiligung, Erkrankungen des hepatobiliären Systems mit Entwicklung einer portalen Hypertension (Rowland et al. 2011). Durch intensive Forschung und neue Therapiemöglichkeiten erreichen viele Patienten heute das Erwachsenenalter. Die Lebenserwartung für 2010 geborene Kinder beträgt bei weiter abnehmender Mortalitätsrate inzwischen über 50 Jahre (MacKenzie et al. 2014).

### **1.1.2 Genetik und Pathomechanismen**

Ursächlich für die Erkrankung Mukoviszidose ist eine Genmutation auf Chromosom 7. Das betroffene Gen kodiert das „Cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator“- (CFTR) Protein. In der Cystic fibrosis Mutation Database (<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>) sind bislang 2001 verschiedene Mutationen eingetragen (Stand 2015). Je nach Auswirkung der Mutation auf die Synthese und Funktion des CFTR-Proteins an der apikalen Zellmembran können die Mutationen in 6 Klassen eingeteilt werden (Wilschanski 2008). Die häufigste Mutation in Deutschland ist mit ca. 70 % DeltaF508, eine Klasse 2 Mutation, bei der das CFTR-Protein vorzeitig im endoplasmatischen Retikulum abgebaut wird (Ploier 2012).

Das CFTR-Protein gehört zur Gruppe der ATP-binding cassette (ABC) Transporter und wird im Epithel vieler verschiedener Gewebe, wie zum Beispiel Pankreas, Niere, Gastrointestinaltrakt und Schweißdrüsen exprimiert. Die Funktion dieses membrangebundenen Chloridkanals liegt neben der Sekretion von Chloridionen auch in der Regulation verschiedener Transportproteine, wie zum Beispiel Natrium-Bikarbonat-Transportern oder Aquaporinen (Guggino und Stanton 2006). Ist die Funktion des CFTR-Proteins gestört, kommt es zu einer intraluminalen Ansammlung zähflüssigen Sekretes und folglich zu Entzündungsreaktionen und Funktionseinschränkungen des betroffenen Gewebes (Kreda et al. 2012). Das Verständnis von Konsequenzen einzelner Mutationen auf Proteinebene ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung mutationsspezifischer therapeutischer Ansätze (Griesenbach und Alton 2015).

### **1.1.3 Diagnostik**

Schon früh wusste man, „dass das Kind bald wieder stirbt, dessen Stirn beim Küssen salzig schmeckt“ (Rochholz 1857) und noch heute ist der Schweißtest wichtiger Bestandteil der Diagnostik einer Mukoviszidose. Nach der aktuellen Leitlinie Diagnose der Mukoviszidose (AWMF-Register-Nr. 026/023) muss für die Diagnose einer Mukoviszidose sowohl ein diagnostischer Hinweis als auch eine CFTR-Funktionsstörung vorliegen. Zu den diagnostischen Hinweisen zählen ein positives Neugeborenen Screening oder Geschwister mit der Diagnose einer Mukoviszidose oder mindestens ein klinischer Hinweis auf Mukoviszidose, wie zum Beispiel chronische sinopulmonale Erkrankungen, gastrointestinale Veränderungen wie eine exokrine Pankreasinsuffizienz oder ein Salzverlustsyndrom (Farrell et al. 2008).

Eine CFTR-Funktionsstörung kann mittels Schweißtest, Gentest oder mittels Potential-Differenzmessung nachgewiesen werden.

#### *Schweißtest*

Mithilfe einer Pilocarpin-Iontophorese kann der Chlorid-Gehalt des Schweißes bestimmt werden. Nach einer 5-minütigen Stimulation der Haut mit Pilocarpin wird der Schweiß 30 Minuten lang gesammelt und anschließend mittels Titration quantifiziert (Legrys et al. 2007). Es gelten folgende Grenzwerte für die Chloridkonzentration:

- $\leq 29$  mmol/l : unauffällig, Mukoviszidose unwahrscheinlich
- 30 – 59 mmol/l : Kontrollbereich, weitere Diagnostik erforderlich
- $\geq 60$  mmol/l : vereinbar mit der Diagnose Mukoviszidose

Für die Diagnose einer Mukoviszidose müssen zwei unabhängige Messungen eine Chlorid-Konzentration von  $\geq 60$  mmol/l ergeben.

#### *Gentest*

Weltweit sind über 1900 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens beschrieben worden, die nicht alle krankheitsrelevant sind. In Deutschland ist mit ca. 70 % die Mutation DeltaF508 am häufigsten vertreten (Stuhrmann-Spangenberg et al. 2009).

Mithilfe einer molekulargenetischen Untersuchung kann man Personen auf die häufigsten Mutationen in einer Bevölkerung hin testen. Leitliniengerechtes Handeln sieht vor, den Umfang der Testung an die Fragestellung anzupassen. Neben der Möglichkeit einzelne Mutationen nachzuweisen, können auch Testkits für mehrere Mutationen sowie Komplettuntersuchungen des gesamten CFTR-Gens eingesetzt werden (Naehrlich et al. 2013). Da es sich um eine autosomal-rezessive Erkrankung handelt, müssen für die Diagnose zwei Mukoviszidose verursachende Mutationen nachgewiesen werden.

#### *Potential-Differenzmessung*

Wenn die Diagnose nach einem Schweißtest und einer Gentestung noch unklar ist, sollte eine elektrophysiologische Untersuchung angeschlossen werden. Zur Wahl stehen eine Nasale Potentialdifferenz-Messung und eine Intestinale Kurzschlussstrom-Messung zur Beurteilung der CFTR-Chloridkanalfunktion (Naehrlich et al. 2013).

#### *Pränatale Diagnostik*

Indikationen für eine Pränataldiagnostik können sein: eine sonographische Auffälligkeit des Fetus wie ein echogener Darm, Homozygotie der Schwangeren oder des Kindsvaters oder eine Heterozygotie beider Partner (Stuhrmann-Spangenberg et al. 2009). Zur Gewinnung fetaler Zellen kann eine Amniozentese oder eine Chorionzottenbiopsie durchgeführt werden.

In Deutschland war Mukoviszidose, anders als zum Beispiel in der Schweiz und in Österreich, bis 2013 kein Bestandteil des Neugeborenencreening (Nährlich und Zimmer 2013). Dies wird sich nach einem Beschluss des gemeinsamen Bundesausschusses von August 2015 ändern und Mukoviszidose wird künftig in das Neugeborenencreening integriert.

#### **1.1.4 Hepatobiliäre Manifestation**

Erkrankungen des hepatobiliären Systems stehen mit 2-4 % auf Platz 3 der Mukoviszidose assoziierten Todesursachen, direkt hinter Lungenerkrankungen und Transplantationskomplikationen (Kobelska-Dubiel et al. 2014) und spielen so eine entscheidende Rolle bezüglich der Lebenserwartung von Mukoviszidosepatienten.

Durch die steigende Lebenserwartung ist die Mukoviszidose assoziierte Hepatopathie (Cystic fibrosis associated liver disease, CFLD) als Komplikation der Mukoviszidose mehr in den Vordergrund getreten (Leeuwen et al. 2014). Bei ca. 60 % der Patienten finden sich Leberveränderungen in Form einer Steatosis hepatis und ca. 30 % der Patienten entwickeln eine schwere Form der Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie, die sich klinisch unter anderem durch eine (fokale) biliäre Zirrhose und portale Hypertension manifestiert (Staufer et al. 2014).

Auch bei der hepatobiliären Manifestation ist der Grund für die Fibrosierung im defekten CFTR-Gen zu finden. In gesunden Cholangiozyten und im Gallenblasenepithel herrscht intrazellulär durch den an der apikalen Membran gelegenen CFTR-Kanal und andere Chlorid-Kanäle ein relativer Chloridionenmangel. Der Chloridionenmangel hält einen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher an der apikalen Seite der Cholangiozyten aufrecht und ermöglicht zudem durch den negativen intraluminalen Druck eine passive Sekretion von Wasser und Bikarbonat. Der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher ist wichtig für die richtige Zusammensetzung und Konsistenz des produzierten Gallensekrets. Ist der intrazelluläre Chlorid-Ionen-Gehalt aufgrund des defekten CFTR-Gens erhöht, kommt es zu einer Störung der Homöostase. Folglich kommt es zu einer veränderten Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit, da weniger Bikarbonat im Austausch für Chlorid Ionen sezerniert werden kann. Die sezernierte Gallenflüssigkeit ist zähflüssiger und führt zu einer intraluminalen Abflussbehinderung. Die Ansammlung toxischer Gallensäuren ist schließlich für eine Verletzung des Lebergewebes in Form von Entzündung und Fibrosierung verantwortlich (Bhardwaj et al. 2009)(Colombo et al. 2006). Einer anderen Theorie nach könnten intestinale Mukosaläsionen sowie verlängerte Dünndarmtransitzeiten und eine veränderte Darmflora ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung einer Zirrhose bei Mukoviszidosepatienten ausüben (Flass et al. 2015).

Charakteristisch für die CFLD ist die Entwicklung einer zunächst fokalen biliären Zirrhose. Im Verlauf kann sich durch fortschreitende Fibrosierung eine multilobuläre Zirrhose sowie portale Hypertension ausbilden. Weitere hepatobiliäre Manifestationen,

die in Zusammenhang mit dem defekten CFTR-Gen stehen sind Neonatale Cholestase, Sklerosierende Cholangitis, Mikrogallenblase und Cholelithiasis (Debray et al. 2011).

Die Steatosis hepatis ist keine direkte Folge der CFTR-Mutation sondern vielmehr auf Fehlernährung, Mangel an essenziellen Fettsäuren, sowie Mangel an Carnithin und Cholin und auf eine Insulinresistenz im Rahmen der Mukoviszidoseerkrankung zurückzuführen (Herrmann et al. 2010).

In zahlreichen Studien wurde der Einfluss potentieller Risikofaktoren wie Zustand nach Mekoniumileus, Pankreasinsuffizienz, männliches Geschlecht und „schwere“ Mutation, das heißt eine Mutation, in der der CFTR-Kanal keine Restaktivität aufweist, untersucht, ohne zu einem übereinstimmenden Ergebnis zu kommen. Man geht inzwischen vielmehr davon aus, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, dass unter anderem durch Umweltfaktoren, Mangel an Antioxidantien, hepatotoxische Medikamente und genetische Modifikationen beeinflusst wird (Ciuca et al. 2014).

Die Entwicklung einer CFLD beginnt meist in der Kindheit, im Erwachsenenalter sinkt das Risiko für die Entwicklung einer CFLD jährlich (Bhardwaj et al. 2009). Bei bis zu 10 % der Kinder mit Mukoviszidose entwickelt sich die Leberzirrhose innerhalb der ersten Lebensdekade (Leung et al. 2015).

Folglich ist es gerade im Kindesalter wichtig, die Patienten regelmäßig auf eine beginnende Hepatopathie hin zu untersuchen.

#### **1.1.4.1 Diagnostik der Leberbeteiligung**

Die Diagnose einer Leberbeteiligung bei Mukoviszidose wird nach aktuellen Guidelines gestellt, wenn mindestens zwei der im Folgenden genannten Kriterien über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr zutreffen:

- Auffällige klinische Untersuchung
  - Hepatomegalie: Im Verhältnis zum Alter zu große Leberspannweite, Leberrand mehr als 2 cm unterhalb des Rippenbogens auf Höhe der Medioklavikularlinie palpabel, gesichert durch Sonographie
  - Und/oder Splenomegalie, gesichert durch Sonographie
- Auffällige Leberfunktionstest
  - Erhöhung der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT ) sowie  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ GT) oberhalb des Normbereichs in mindestens 3 aufeinanderfolgenden

Untersuchungen in einem Zeitraum von einem Jahr, nach Ausschluss von anderen Ursachen für eine Leberwerterhöhung

- Auffällige Abdomensonographie
  - o Leberveränderungen, ausgenommen Hepatomegalie, wie:  
erhöhte/heterogene Echogenität, unregelmäßige Organkontur, Knoten, veränderte Randwinkel, Nachweis einer portalen Hypertension, Veränderung der Gallengänge
- Leberbiopsie, bei diagnostischen Zweifeln (Debray et al. 2011)

Neben der Biopsie kann bei unklaren Befunden zur weiteren Diagnostik noch eine Magnetresonanztomographie (MRT), eine Szintigraphie oder eine Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter hepatischer Elastographie (Fibroscan®) herangezogen werden (Ciuca et al. 2014).

Gegenstand aktueller Forschungen ist neben der transienten Elastographie auch eine Messung der Lebersteifigkeit mittels Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)-Imaging. Dabei handelt es sich um eine Technik, ähnlich der der transienten Elastographie, die ebenfalls anhand von Ausbreitungsgeschwindigkeiten in hepatischem Gewebe die Lebersteifigkeit berechnet und sich in den normalen Ablauf einer Ultraschalluntersuchung integrieren lässt (Behrens et al. 2013).

Zur Identifizierung von Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine Leberzirrhose scheint einer Erhöhung der  $\gamma$ -Glutamyltransferase  $> 35$  U/L in wiederholten Messungen geeignet zu sein (Bodewes, Frank A J A et al. 2015).

Bei Verdacht auf Komplikationen ( siehe 1.1.4.2 ) muss die Diagnostik entsprechend erweitert werden, zum Beispiel durch eine obere Gastroduodenoskopie zum Nachweis bzw. Ausschluss von Ösophagusvarizen.

#### **1.1.4.2 Komplikationen**

Zu den Komplikationen einer CFLD gehören die Entwicklung einer multilobulären biliären Zirrhose mit daraus resultierender portaler Hypertension und im Endstadium Lebersversagen (Akata und Akhan 2007). Zu den Folgen der portalen Hypertension zählen:

- Ausbildung von Kollateralkreisläufen (Ösophagus- und Korpusvarizen, Caput medusae externum und internum, Rektumvarizen), Varizenblutung
- Splenomegalie, Hypersplenismus

- Aszites, therapierefraktäre Aszites, spontan bakterielle Peritonitis
- Hepatorenales Syndrom
- Hepatopulmonales Syndrom
- Portopulmonale Hypertonie (Herold und Mitarbeiter 2011; Müller und Mitarbeiter 2012/13)

Die Komplikation eines chronischen Leberversagens ist als „akut auf chronisches“ Leberversagen beschrieben und gekennzeichnet durch:

- Ikterus,
- Gerinnungsstörung
- Aszites und/oder hepatische Enzephalopathie
- hohe Letalität (Zamora Nava, Luis Eduardo et al. 2014).

Zu den weiteren Komplikationen einer Zirrhose zählt die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms, welche auch für Mukoviszidosepatienten relevant zu sein scheint (O'Donnell et al. 2009).

#### **1.1.4.3 Therapieansätze**

Ein Grundpfeiler der Therapie einer CFLD stellt die Gabe von Ursodeoxycholsäure (UDCA) in einer Dosierung von 20 mg/kg KG dar. Durch die Gabe der nicht toxischen, hydrophilen Ursodeoxycholsäure kommt es zu einer Verdrängung der körpereigenen, hydrophoben toxischen Gallensäuren (Colombo et al. 2006). Zusätzlich fördert UDCA den Gallefluss, stimuliert die Bikarbonatsekretion und spielt eine Rolle bei der Zytoprotektion (Desmond et al. 2007). Durch die Therapie kommt es zu einer Reduktion der serologisch nachweisbaren Leberenzyme, zu einer Verzögerung des Umbauprozesses in der Leber, sowie in der Ausbildung von Varizen. Des Weiteren verlängert sich das Überleben ohne Lebertransplantation (Ali et al. 2014). Überlegungen, allen Kindern, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer CFLD haben, prophylaktisch eine UDCA-Therapie anzubieten, werden kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass die Gabe von UDCA das Auftreten einer Hepatopathie bei Kindern, die ein Risiko für die Entwicklung einer CFLD aufweisen, verhindern kann (Siano et al. 2010), auf der anderen Seite ist wenig über den tatsächlichen Nutzen der Therapie und über etwaige Nebenwirkungen bekannt (Ooi et al. 2012). Die Gabe von UDCA sollte folglich in jedem Fall individuell geprüft und entschieden werden.

Bei manifesten Ösophagusvarizen kommen zur Prophylaxe von lebensbedrohlichen Blutungen die Gabe von nicht selektiven Betablockern oder auch eine endoskopische Ligatur der Gefäße in Betracht.

Bei Versagen der konservativen Therapiemaßnahmen muss eine Lebertransplantation in Erwägung gezogen werden (Sauerbruch et al. 2013). Bei gleichzeitig eingeschränkter Lungenfunktion kann auch eine kombinierte Transplantation, eine Lungen-Leber-Transplantation, durchgeführt werden, die ähnlich gute Ergebnisse zu erzielen scheint wie eine alleinige Lebertransplantation (Desai et al. 2013).

Auf der Grundlage zellbasierter Modelle wird intensiv an der Entwicklung einer zielgerichteten Therapie auf Proteinebene geforscht. Ziel ist die Korrektur bzw. Potenzierung der Funktion des CFTR-Kanals für die Mutationsklassen, in denen eine Restaktivität des Proteins noch vorhanden ist. Der Hauptfokus der therapeutischen Entwicklungen liegt momentan noch in der Umkehr der progressiven Lungenmanifestation, da dies die Hauptursache für Morbidität und Mortalität der Mukoviszidosepatienten darstellt (Solomon et al. 2015).

### **1.1.5 Weitere Manifestationen**

Der CFTR-Komplex befindet sich an der apikalen Zellmembran aller exokrinen Drüsen (Schaaf und Zschocke 2008), sodass sich eine Mutation im Rahmen der Erkrankung Mukoviszidose auf viele Organe auswirkt. Erstmanifestation der Erkrankung ist bei 20 % der Neugeborenen ein Mekoniumileus, bedingt durch eine intraluminale Ansammlung zähflüssigen Mekoniums (Borowitz und Gelfond 2013). Weitere Manifestationen im Gastrointestinaltrakt sind neben Obstipation das distale intestinale Obstruktionssyndrom (DIOS), definiert durch einen akuten kompletten oder inkompletten fäkalen Verschluss des Ileocoecums, welches vermehrt im Erwachsenenalter auftritt (Houwen et al. 2010). Hauptmanifestation im Bereich des Gastrointestinaltrakts ist eine Zerstörung des Pankreas, bedingt durch eine Obstruktion mit nachfolgender Autolyse und Ersatz des Pankreas durch Fettgewebe. 85-90 % der Kinder mit Mukoviszidose entwickeln im Laufe des ersten Lebensjahres eine exokrine Pankreasinsuffizienz (O'Sullivan und Freedman Steven 2009). Die Prävalenz der endokrinen Pankreasinsuffizienz steigt hingegen mit dem Alter, mehr als 50 % der über 40-jährigen Patienten mit Mukoviszidose sind davon betroffen (Perano et al. 2014). Bei Mukoviszidosepatienten ist die Prävalenz der gastroösophagealen Refluxerkrankung im Vergleich zu gesunden Kindern 6-8-fach erhöht. Dies ist unter anderem durch eine verlangsamte Magenentleerung sowie durch

eine Husten bedingte Erhöhung des intraabdominalen Drucks erklärbar (Kelly und Buxbaum 2015). Die hepatobiliären Manifestationen sind bereits ausführlich in Kapitel 1.1.4 beschrieben worden.

Während die Lungenfunktion bei Geburt meist noch regelrecht ist, kommt es schnell zu einer Infektion und Inflammation mit Mukoviszidose-typischen Erregern wie zum Beispiel Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa (O'Sullivan und Freedman Steven 2009). Als Folge der bakteriellen Besiedelung entsteht eine chronische Lungenerkrankung, die sich durch Husten, Bronchiektasien, rezidivierenden Pneumonien, Hypoxie und Hyperkapnie äußert. Zu den Komplikationen der Lungenbeteiligung zählt die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie und einer rechtsventrikulären Dysfunktion (Hayes et al. 2014).

Bei episodischer Verschlechterung der pulmonalen Funktion, einhergehend mit vermehrter Sputumproduktion sowie Husten und oft verbunden mit Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit und Müdigkeit, spricht man von einer pulmonalen Exazerbation (Roderfeld et al. 2009).

Männliche Patienten sind in den meisten Fällen durch eine Azoospermie infolge einer beidseitigen Aplasie der Vas deferens infertil (O'Sullivan und Freedman Steven 2009). Bei Frauen kann eine Kontrazeption durch verändertes Sekret im Zervikalkanal erschwert sein, ist aber grundsätzlich möglich (Edenborough 2001).

Die Schwere der Erkrankung Mukoviszidose scheint abhängig zu sein von der Mutationsklasse. Bei Klasse 1-3 Mutationen handelt es sich um eine schwere Ausprägung der Erkrankung, bei Mutationen der Klasse 4-6 handelt es sich um eine leichtere Ausprägung, da eine Restaktivität des CFTR-Proteins vorhanden ist (Bonadia et al. 2014).

## **1.2 Transiente hepatische Elastographie**

Bei der Transienten hepatischen Elastographie (Fibroscan®) handelt es sich um ein nicht invasives Verfahren zur Bestimmung der Lebersteifigkeit. Anhand des ermittelten Wertes in Kilopascal (kPa) kann eine Einschätzung bezüglich einer Leberfibrose oder Zirrhose abgegeben werden. Eine ausführliche Beschreibung der Funktionsweise und des Untersuchungsablaufs der transienten Elastographie findet sich in Kapitel 2.2.

Vorteile der Fibroscanuntersuchung sind neben der Nichtinvasivität eine kurze Untersuchungsdauer, reproduzierbare Ergebnisse auch bei unterschiedlichen Untersuchern, Schmerzfreiheit und eine gute Akzeptanz bei den Patienten (Lucidarme et

al. 2009). Ein weiterer Vorteil gegenüber der Leberbiopsie liegt in der Größe des untersuchten Gewebavolumens. Mit einem Zylinder von ca. 1 cm Breite und 4 cm Länge bei der Fibroscanuntersuchung ist das untersuchte Lebervolumen ca. 100 mal größer als bei einer Biopsie (Castera et al. 2008). Eine weitere Einsatzmöglichkeit der transienten Elastographie liegt in der Detektion einer portalen Hypertension und damit assoziierten Komplikationen (Robic et al. 2011). Zudem scheint das Ausmaß der Lebersteifigkeit mit dem Auftreten und der Größe von Ösophagusvarizen zu korrelieren, so dass die Fibroscanuntersuchung auch bei Verdacht auf Ösophagusvarizen sinnvoll in der Überwachung von Patienten mit einer chronischen Hepatopathie eingesetzt werden kann (Pár et al. 2014).

Während es für einige Erkrankungen wie zum Beispiel Hepatitis B oder C bereits einen offiziellen Cut-Off-Wert der Firma Echosens gibt, fehlt dieser bei der CFLD. Zwar wurde bereits in einigen Studien ein Grenzwert zur Diagnose einer CFLD ermittelt (Kitson et al. 2013; Witters et al. 2009; Rath et al. 2012; Sadler et al. 2015) aber dieser ist nicht einheitlich, sodass weitere Untersuchungen gefordert sind um die errechneten Werte zu validieren bzw. anzupassen.

### **1.3 Bestimmung geeigneter Serumparameter**

Zu den regelmäßigen Kontrolluntersuchungen bei Mukoviszidosepatienten gehören neben einer Lungenfunktionsprüfung und Bestimmung von Basisparametern wie Körpergröße und Gewicht auch Blutuntersuchungen. Im Rahmen der Routineblutentnahme lassen sich bei Verdacht auf eine CFLD neben den Parametern der Leber wie Transaminasen ALT und AST und auch  $\gamma$ GT und Bilirubin weitere Marker wie zum Beispiel Laminin, Hyaluronsäure und die Anzahl der Thrombozyten bestimmen. Mithilfe der erhobenen Parameter können außerdem leberspezifische Scores und Indizes bestimmt werden, wie zum Beispiel der APRI: AST-to platelet Ratio Index. Hierbei wird das Verhältnis von AST bezogen auf den Referenzbereich zu der Anzahl der Thrombozyten bestimmt. Werte über 1,5 sprechen für eine fortgeschrittene Fibrose, Werte unter 0,5 schließen eine Fibrose recht sicher aus (Lörke et al. 2007). Ein weiteres Beispiel ist der Enhanced Liver Funktion (ELF-) Test, der anhand von Hyaluronsäure, Prokollagen 3 N-Terminal Propeptid und Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) einen Score angibt, der zur Diagnosestellung und Verlaufsvorhersage genutzt werden kann. Bislang ist der Test allerdings nur für bestimmte Hepatitiden, wie die virale

Hepatitis oder die nichtalkoholische Fettlebererkrankung, validiert (Healthcare Sector / Diagnostics Division 18.07.2011).

Neben der Bestimmung von Routineparametern und dem Einsatz von Testkits gibt es noch die Möglichkeit gezielt auf bestimmte Proteine zu untersuchen, die sich für die Frühdiagnose einer CFLD eignen. In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass TIMP-1 und TIMP-2 für die Diagnose einer Hepatopathie bei Mukoviszidose bestimmt werden können (Rath et al. 2012). Weitere Studien untersuchten unter anderem die Bedeutung von Kollagen Typ 4 und Propylhydroxylase für die frühe Detektion einer Hepatopathie (Pereira et al. 2004). Bislang gibt es noch keinen einheitlichen Parameter zur Frühdiagnose einer CFLD, so dass es sinnvoll erscheint, potentielle Parameter zu evaluieren und ggf. neue Parameter an einem Kollektiv von Mukoviszidosepatienten zu überprüfen.

#### **1.4 Ziele und Fragestellung der Arbeit**

Bedingt durch die verbesserte Lebenserwartung der Mukoviszidosepatienten gerät das Problem der Leberbeteiligung immer mehr in den Vordergrund (Kitson et al. 2013).

Um einen Progress und damit verbunden das Auftreten von Komplikationen zu verhindern oder zu verzögern, ist es wichtig, die Leberbeteiligung frühzeitig zu erkennen und medikamentös zu intervenieren. Zwar ist die Leberpunktion Goldstandard in der Diagnostik einer Hepatopathie, aber gerade bei der für die Mukoviszidose pathognomonischen fokal billiären Zirrhose, ist die Aussagekraft der Punktion limitiert. Zudem kann eine Leberpunktion mit Komplikationen wie Blutungen, Pneumothorax oder Tod sowie Schmerzen für den Patienten verbunden sein (Witters et al. 2009). Insofern besteht ein wichtiges Ziel für die Zukunft darin, den Patienten eine verlässliche nicht invasive Untersuchung anbieten zu können. Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Kann mithilfe der transienten Elastographie bei unserem Patientenkollektiv eine Mukoviszidose assoziierte Hepatopathie diagnostiziert werden?
- Welcher Cut-Off-Wert im Rahmen der transienten Elastographie kann eine Leberbeteiligung am besten vorhersagen?
- Gibt es geeignete, bis dato noch nicht beschriebene Serummarker für die Diagnose einer CFLD?
- Steigt die Zuverlässigkeit der Vorhersage durch eine Kombination aus transienter Elastographie und Bestimmung von Serumfibrosemarkern an?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Die Studie wurde nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Ethik-Kommission der Justus–Liebig Universität Gießen stimmte dem Forschungsprojekt zu (Aktenzeichen: 75/09). Die Teilnahme an der Studie erfolgte auf freiwilliger Basis. Alle Patienten wurden vor Einschluss umfassend über die Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Bei minderjährigen Patienten erfolgte das Einverständnis durch die Eltern bzw. gesetzlichen Betreuer. Die Fibroscanuntersuchung wurde, sofern keine Ausschlusskriterien vorlagen (siehe 2.2.5) allen Patienten der Mukoviszidose-Ambulanz für Kinder bzw. Erwachsene angeboten. Zur Überwachung der Leberbeteiligung fand eine erneute Bestimmung der Lebersteifigkeit nach 6 Monaten und dann in jährlichen Abständen statt. Aus insgesamt 167 Patienten wurde ein Kollektiv von 45 Patienten ausgewählt. Es handelte sich hierbei um 28 Mukoviszidosepatienten ohne Leberbeteiligung und um 17 Patienten mit einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie. Die Diagnose einer CFLD erfolgte nach aktuellen Richtlinien (siehe 1.1.4.1). Von allen Patienten wurden klinische und laborchemische Parameter erhoben.

Zudem wurde bei allen Patienten eine Lungenfunktionsuntersuchung durchgeführt und der Wert für Vitalkapazität (VC), forcierter Einsekundenkapazität (FEV1) und die Ratio FEV1/VC erfasst. Als Grenzwert zur Einteilung der Patienten wurde analog zu bereits durchgeführten Studien für die FEV1 70 % vom Soll, für die VC 80 % vom Soll und für die Ratio FEV1/VC 0,7 festgelegt.

Als Kontrolle diente ein Kollektiv von 18 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion. Von allen Patienten dieses Hepatitis C-Kollektivs lag eine Biopsie vor. Die Erhebung dieser Daten wurde durch die Ethik-Kommission des LMU Klinikums München bewilligt (Projektnummer: 369-10).

### **2.2 Transiente hepatische Elastographie**

#### **2.2.1 Gerätebeschreibung und Funktionsweise**

Die transiente hepatische Elastographie (Fibroscan®, Firma Echosens, Paris) ist eine nichtinvasive Methode zur Bestimmung der Lebersteifigkeit. Der hier eingesetzte Fibroscan®502 besteht aus einem Rahmengestell, einem Monitor, einer Tastatur und

einer, per Kabel mit dem Gerät verbundenen Sonde (siehe Abbildung 2). Je nach Thoraxdurchmesser des Patienten stehen Sonden in den Größen S, M und XL zur Verfügung, die sich hinsichtlich Frequenz und Messungstiefe voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 1). Die Sonden bestehen im Wesentlichen aus einem elektrodynamischen Wandler, der eine Vibration erzeugt und aus einem Ultraschallwandler, der mithilfe von Echos die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Scherwelle messen kann. Des Weiteren befinden sich an der Sonde eine blaue Leuchtdiode, die die Aktivität anzeigt und ein Schalter, mit dem die Messung der Lebersteifigkeit gestartet werden kann (siehe Abbildung 1).

Sonde	Untersuchung	Frequenz	Messungstiefe	Brustumfang (Höhe Xyphoid)	Hautkapselabstand (HKA)
<b>S</b>	Small 1	5 MHz	15mm - 40 mm	< 45 cm	
	Small 2	5 MHz	20mm - 50mm	> 45 cm - 75 cm	
<b>M</b>	M	3,5 MHz	25mm - 65mm	> 75 cm	< 2,5 cm
<b>XL</b>	XL	2,5 MHz	35mm- 75 mm	> 110 cm	2,5 cm < HKA < 3,5 cm

*Tabelle 1 Informationen über die verschiedenen Sonden (S, M, XL) des Fibroscans® zur Bestimmung der Lebersteifigkeit*



*Abbildung 1 Sonde der Größe M, Firma Echosens, Paris*

*Für weitere Erklärungen siehe Kapitel 2.2.1*

Zu Beginn der Messung erzeugt der elektrodynamische Wandler der Sonde eine transiente Vibration. Die Vibration dauert 20 ms an und zeichnet sich durch eine 2 mm Peak-zu-Peak Amplitude aus. Durch die Vibration entsteht eine elastische Scherwelle mit einer Frequenz von 50 Hz, die sich durch die Haut und das

Unterhautfettgewebe bis hin zur Leber ausbreitet. Während der Ausbreitung der Scherwelle erfasst der Ultraschallwandler, der mit dem elektrodynamischen Wandler verbunden ist, eine Reihe von Echos und kann so die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle messen. Die Steifigkeit der Leber (Elastizität) berechnet sich dann anhand folgender Formel:

$$E = 3pV^2, \text{ wobei}$$

E = Steifigkeit der Leber in kPa (Elastizität)

p = Dichte der Leber

V = Ausbreitungsgeschwindigkeit der Scherwelle

Es gilt der Grundsatz: je fester, das heißt je fibrotischer das Gewebe, desto höher ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit und somit auch der ermittelte Wert der Elastizität in kPa. Der maximale Messwert beträgt 75 kPa.



Abbildung 2 Aufbau des Fibroscans®, Firma Echosens, Paris

Für weitere Erklärungen siehe Kapitel 2.2.1

### 2.2.2 Durchführung der Untersuchung

Zur Durchführung der Elastographie liegt der Patient mit dem Rücken auf einer Untersuchungsliege und verschränkt den rechten Arm hinter dem Kopf. Der Untersucher positioniert sich so auf der rechten Patientenseite, dass er sowohl den Bildschirm betrachten als auch eine Messung im Bereich des rechten Oberbauchs durchführen kann. Man ertastet zunächst einen Interkostalraum auf Höhe des Xyphoids in der mittleren Axillarlinie rechts und setzt die, für den Thoraxdurchmesser des Patienten passende, Sonde (vgl. Tabelle 1) über dem rechten Leberlappen auf. Es empfiehlt sich zunächst eine Probemessung durchzuführen um dann an einer geeigneten Stelle (siehe 2.2.4) mindestens 10 valide Messungen durchzuführen. Eine Messung dauert 10 bis 15 Sekunden, für die gesamte Untersuchung muss mit 5 bis 10 Minuten gerechnet werden. Während der Messungen sollte der Patient ruhig liegen, gleichmäßig atmen und möglichst nicht reden. Im Anschluss an die Untersuchung wurde allen Patienten eine Kopie der Einverständniserklärung und des Befundes für sich selbst und für den behandelnden Arzt der Mukoviszidose-Ambulanz mitgegeben.

### 2.2.3 Erfasste Parameter

Vor Beginn der Untersuchung werden Patientendaten sowie Angaben zur Untersuchung eingegeben. Dazu zählen: Vor- und Nachname des Patienten sowie das Geburtsdatum, Name des Untersuchers und ausgewählte Sonde. Automatisch hinzugefügt wurden das Datum der Untersuchung und die benötigte Gesamtzeit für alle Messungen. Zusätzlich sind während der Messung folgende Werte ersichtlich:

- **Time-Motion- (TM-) Modus:** Darstellung des Ultraschallsignals in Abhängigkeit von der Tiefe und Zeit in Graustufen (siehe 2.2.4)
- **A-Modus:** Darstellung des aktuellen Ultraschallsignals in Abhängigkeit von der Zeit als Linie (siehe 2.2.4)
- **Druckdiagramm:** farbcodierte Darstellung des Druckes, mit dem die Sonde im Interkostalraum des Patienten aufgesetzt wird (siehe 2.2.4)
- **Elastogramm:** graphische Darstellung der Ausbreitung der Scherwelle in Abhängig von Zeit und Tiefe als weiße Linie. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit und somit die Lebersteifigkeit korrelieren mit der Steigung der Linie, je steiler der Verlauf, desto fibrotischer das Gewebe

- **Median:** automatische, aktuelle Berechnung aus den bisher durchgeführten gültigen Einzelmessungen. Die Angabe der Lebersteifigkeit (Stiffness) erfolgt in Kilopascal (kPa)
- **IQR (Interquartile Range):** ein Maß für die interne Variabilität der Lebersteifigkeit in kPa, es enthält 50 % der gültigen Messungen zwischen der 25. und 75. Perzentile
- **Erfolgsrate:** berechnet sich aus dem Quotienten der Anzahl gültiger Messungen durch die Anzahl aller durchgeführten Messungen
- **CS:** Wert der aktuellen Elastizitätsbestimmung, Angabe in kPa
- **Anzahl** der bisher durchgeführten Messungen
- **Anzahl** der gültigen Messungen

Am Ende der Messung wurden alle Daten gespeichert und standen für spätere Folgemessungen als Verlaufparameter zur Verfügung.

#### **2.2.4 Kriterien für eine gültige Messung**

Die Basis für eine gültige Messung stellt die korrekte Sondenposition dar. Es ist darauf zu achten, dass sich in einem Areal von 6 cm Tiefe weder große Gefäße noch leberfremdes Gewebe, wie zum Beispiel Lungengewebe, in dem Messbereich befinden. Dafür stehen dem Untersucher der TM und der A-Modus zur Verfügung. Der TM- Modus bildet das Ultraschallsignal in Abhängigkeit von der Tiefe und der Zeit in Graustufen ab. Bei korrekter Position erscheint ein Bild in homogenen Graustufen, wobei die Form einer Wabenstruktur ähnelt. Heterogene Graustufen in Form von helleren oder dunkleren Bereichen weisen auf größere Gefäße oder leberfremdes Gewebe hin, so dass ein anderer Messpunkt gewählt werden muss. Der A-Modus bildet das aktuelle Ultraschallsignal in Abhängig von der Zeit als Linie ab. Bei richtiger Position erscheint eine gerade Linie. Abweichungen von einer geraden Linie, wie zum Beispiel ein konkavförmiger Verlauf oder Unregelmäßigkeiten im Verlauf der Linie weisen wiederum auf Gefäße oder fremdes Gewebe hin, so dass auch hier ein anderer Messpunkt gewählt werden muss (siehe Abbildung 3).

Über einen Fühler im Bereich der Sonde wird der Druck registriert, mit dem die Sonde auf die Haut des Patienten aufgesetzt wird. Die Darstellung erfolgt über verschiedenfarbige Balken auf dem Monitor des Gerätes. Idealerweise befindet sich der Balken im grünen Bereich. Ist der Druck zu gering, befindet sich der Balken im orange

gefärbten Bereich und die Messung kann nicht gestartet werden. Bei zu hohem Druck ist der zugehörige Balken rot und die Messung kann ebenfalls nicht gestartet werden.

Es müssen pro Patient mindestens 10 valide Einzelmessungen durchgeführt werden und die Erfolgsrate aller Messungen muss 60 % oder mehr betragen. Die Erfolgsrate berechnet sich aus dem Quotienten der Zahl erfolgreicher Messungen durch die Anzahl aller durchgeführten Messungen. Des Weiteren sollte für eine valide Messung der IQR-Wert maximal 30 % des Medianwertes betragen (Rath et al. 2012).

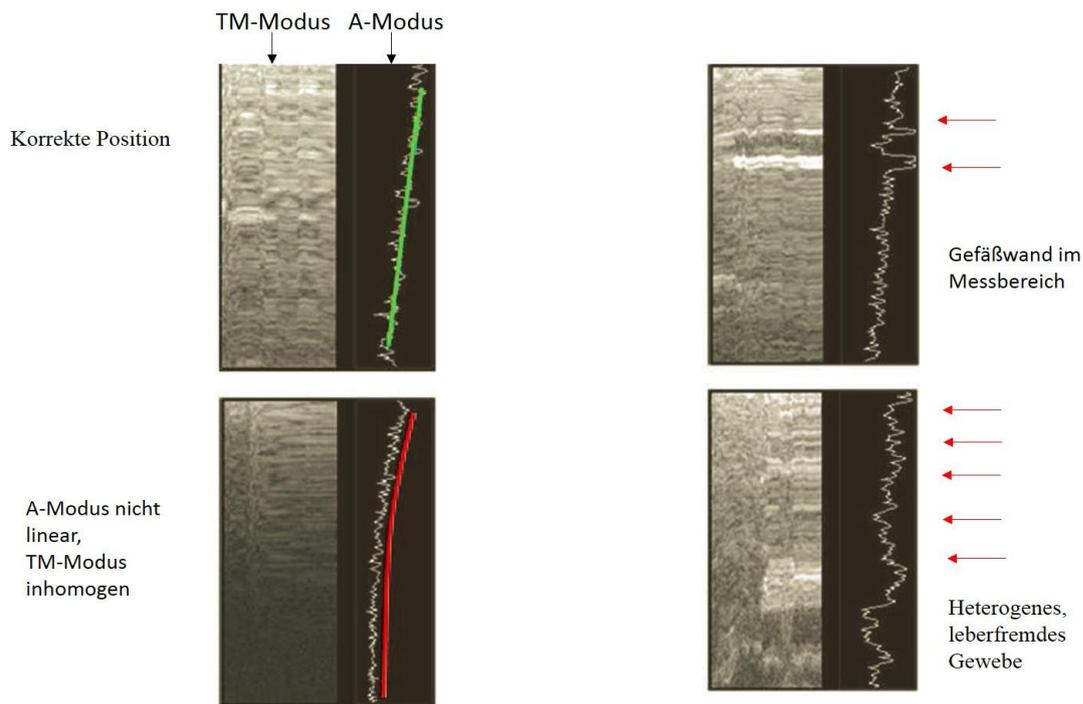


Abbildung 3 Überprüfung der korrekten Sondenposition anhand des TM; und des A-Modus  
 nNähere Einzelheiten siehe Text, modifiziert nach (Sandrin et al. 2011)

### **2.2.5 Ausschlusskriterien**

Die Teilnahme an der Untersuchung erfolgte auf freiwilliger Basis.

**Nicht** an der Untersuchung teilnehmen konnten:

- Patienten, die eine Wunde im Bereich des rechten Oberbauchs aufwiesen
- Patienten mit Aszites
- Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung schwanger waren oder wenn eine Schwangerschaft nicht sicher auszuschließen war
- Patienten, die im Besitz eines aktiven Implantats oder eines Herzschrittmachers, Defibrillators oder einer Pumpe waren.

Um das Risiko der Übertragung von resistenten Keimen zu minimieren, wurde keine Messung der Lebersteifigkeit bei Patienten mit einem multiresistenten Keim in der aktuellen Anamnese durchgeführt.

### **2.3 Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben**

Die Blutentnahme erfolgte durch geschultes Personal der Mukoviszidose-Ambulanz für Kinder bzw. Erwachsene im Rahmen einer routinemäßigen Blutuntersuchung. Es wurden Serum Röhrchen der Firma Sarstedt verwendet. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 4° Celsius und maximal 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in mehrere Reagenzgefäße à 0,5 ml bzw. 1,5ml aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung der Proben bei -80° Celsius gelagert.

### **2.4 Durchführung der Leberbiopsie**

Bei allen Patienten des Kontrollkollektivs, bestehend aus 18 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion, wurde eine Leberbiopsie durchgeführt und nach dem Desmet/Scheuer System beurteilt (Desmet et al. 1994; Scheuer 1991) . Die Probe wurde, nach Desinfektion und Lokalanästhesie der Haut, interkostal rechts mithilfe einer 18 Gauge messenden Menghini-Nadel entnommen. Die Beurteilung des Biopsats und Einteilung erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen, der bezüglich der klinischen Parameter der Patienten verblindet war (Schirmacher et al. 2004) .

## 2.5 Verwendete Materialien und Geräte

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über alle verwendeten Materialien und Geräte.

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Chemilumineszenz-Film	GE Healthcare
Falcon Röhrchen 15 ml	BD
Falcon Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt
Parafim M Laboratoryfilm	Pechiney Plastic Packaging Company
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Microtubes 0,5 ml, 1,5ml	Eppendorf
<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ELISA Reader Fusion	Fa. Packard BioScience Company
Magnetrührer Combimag RCO	IKA
Pipetten 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf
Pipetten 20 - 200µl , 100 – 1000 µl	Labmate Abimed
Röntgenkassette	
Schüttler Vibrax VXR basic	IKA
Tischentwicklungsmaschine Agfa Curix 60	Siemens Healthcare
Vortex Mixer 7-2020	neolap
Wippschüttler	VWR international GmbH
Wippschüttler Rocker 25	Labnet
Zentrifuge CS 6KR	Beckman
Zentrifuge Mikro 200 R	Hettich
<b>Gebrauchsfertige Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Proteome Profiler™ Array Human Cytokine Array Panel A	R & D Systems
Proteome Profiler™ Array Human Angiogenesis Array Kit	R & D Systems
Proteome Profiler™ Array Human Soluble Receptor Array Kit, Non-Hematopoietic Panel	R & D Systems
Proteome Profiler™ Array Human Chemokine Array Kit	R & D Systems
Quantikine® ELISA Human HGF Immunoassay	R & D Systems
Quantikine® ELISA Human Pentraxin 3/TSG-14 Immunoassay	Blue Gene
Quantikine® ELISA Human TIMP-4 Immunoassay	R & D Systems
Quantikine® ELISA Human Endoglin/CD105 Immunoassay	R & D Systems

Tabelle 2 Zusammenstellung aller verwendeten Materialien und Geräte

## **2.6 Proteome Profiler Assay**

### **2.6.1 Durchführung und Auswertung**

Die Proteome Profiler Arrays (R&D-Systems) ermöglichen je nach Kit die simultane Bestimmung von bis zu 119 verschiedenen Proteinen. Auf einer Nitrozellulosemembran befinden sich neben Positiv- und Negativ-Kontrollen fixierte Erstantikörper. Alle Kontrollen und Antikörper liegen doppelt vor. Die Membran wurde mit dem Probenmaterial, in diesem Fall Serum, versetzt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde erst der Detektionsantikörper und anschließend Streptavidin-HRP hinzugegeben. Der Komplex wurde dann mit einer ECL-Lösung inkubiert und die einzelnen Spots konnten mithilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. Die Intensität der einzelnen Signale ist abhängig von der Menge an gebundenem Protein. Die Auswertung erfolgte mithilfe von BioDoc Analyze (Biometra) einer Image Analysis Software. Zuvor wurden die Röntgenfilme mit 800 dpi Graustufen eingescannt, die Nachbereitung der Ergebnisse erfolgte mit Excel. Da alle Proteine zweifach gemessen wurden, erfolgte zunächst die Berechnung des Mittelwertes. Anschließend wurde die Ratio des Mittelwertes „leberkrank“ zu „lebergesund“ berechnet, also der Vergleich des Proteinnachweises aus dem Serum von Mukoviszidosepatienten mit Leberbeteiligung zu dem Serum von Patienten ohne Leberbeteiligung. Für diese Studie wurden vier verschiedene Proteome Profiler Array Kits zum Nachweis von Cytokinen, Chemokinen, Angiogenesefaktoren und löslichen Rezeptoren verwendet. Untersucht wurde ein Serumpool von je vier Patienten mit und ohne Leberbeteiligung. Pro Gruppe und Proteome Profiler wurden mehrere Versuche gemacht, die sich in Serumkonzentration und Expositionsdauer des Röntgenfilms nach Inkubation mit der ECL-Lösung unterscheiden.

### **2.6.2 Human Angiogenesis Array Kit**

Das Human Angiogenesis Array Kit erlaubte die simultane Bestimmung von 55 verschiedenen Proteinen. Im ersten Durchgang wurden jeweils eine Membran und je 200 µl Serum von Mukoviszidosepatienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung eingesetzt. Die Durchführung erfolgte analog zu den Herstellerangaben. Die Röntgenfilmexposition betrug eine Minute, danach wurde der Film entwickelt. Im nächsten Schritt wurden die beiden Membranen erneut mit ECL-Lösung inkubiert, die Expositionsdauer betrug

diesmal 30 Minuten. Im zweiten Durchgang wurden jeweils eine Membran und je 50 µl Serum der beiden Patientengruppen benutzt. Nach Inkubation mit der ECL-Lösung wurde ein Röntgenfilm nach 20 Sekunden Expositionsdauer und ein Röntgenfilm nach einer Minute Expositionsdauer entwickelt. Daraufhin wurden beiden Membranen erneut mit ECL-Lösung inkubiert, die Expositionsdauer bis zur Entwicklung betrug diesmal zuerst 5 Sekunden und dann 10 Minuten.

### **2.6.3 Human Chemokine Array Kit**

Mithilfe des Human Chemokine Array Kits konnten 31 verschiedene Proteine bestimmt werden. Im ersten Durchgang wurden jeweils eine Membran und je 200 µl Serum von Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung eingesetzt. Die Durchführung erfolgte analog zu den Herstellerangaben. Die Röntgenfilmexposition betrug eine Minute und nach erneuter Inkubation mit ECL-Lösung 30 Minuten. Im zweiten Durchgang wurden jeweils eine Membran und je 50 µl Serum der beiden Patientengruppen benutzt. Die Expositionsdauer bis zur Entwicklung des Röntgenfilms betrug zuerst 30 Sekunden und dann eine Minute. Daraufhin wurden beide Membranen erneut mit ECL-Lösung inkubiert, die anschließende Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte nach einer Expositionsdauer von 10 Sekunden.

### **2.6.4 Human Cytokine Array Panel A**

Das Human Cytokine Array Panel A ermöglichte die simultane Bestimmung von 36 verschiedenen Proteinen. Für den Versuch wurden jeweils eine Membran und je 100 µl Serum von Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung eingesetzt. Die Durchführung erfolgte analog zu den Herstellerangaben. Die Expositionsdauer bis zur Entwicklung des Röntgenfilms betrug eine Minute, eine weitere Entwicklung fand nach einer Expositionsdauer von 15 Minuten statt.

### **2.6.5 Human Soluble Receptor Array Kit, Non-Hematopoietic Panel**

Das Human Soluble Receptor Array Kit, Non-Hematopoietic Panel teilt sich in einen Part N (Human Non-Hematopoietic Array) und einen Part C (Human Common Analyte Array) auf. Verteilt auf zwei Membranen konnten insgesamt 119 verschiedene Proteine parallel bestimmt werden. Es wurden pro Patientengruppe zwei Membranen und je 50 µl Serum verwendet. Die Durchführung erfolgte analog zu den Herstellerangaben. Die Expositionsdauer des Röntgenfilms betrug eine Minute. Die Membranen wurden erneut

mit ECL-Lösung inkubiert, die anschließende Expositionsdauer bis zur Entwicklung des Röntgenfilms betrug 20 Sekunden.

## 2.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### 2.7.1 Probenmaterial

Es wurde das Serum von 28 Mukoviszidosepatienten ohne Leberbeteiligung und das Serum von 17 Mukoviszidosepatienten mit Leberbeteiligung benutzt. Zusätzlich wurde das Serum von 18 Hepatitis-C-Patienten (HCV-Patienten) untersucht, von denen eine Leberbiopsie vorlag und die sich hinsichtlich Grading und Staging unterschieden.

### 2.7.2 Charakteristika der eingesetzten ELISA

Es wurden insgesamt vier unterschiedliche ELISA zur Quantifizierung von TIMP-4, Pentraxin 3, Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Endoglin eingesetzt. Vor Beginn der Hauptversuche wurde mittels Verdünnungsreihe die benötigten Mengen an Serum bzw. die Verdünnung bestimmt. Für weitere Einzelheiten siehe Tabelle 3.

Bezeichnung des ELISA	Verwendete Verdünnung	Eingesetzte Serummenge	Name des Diluenten
Human TIMP-4 Immunoassay	unverdünnt	50 µl	/
Human Pentraxin 3/TSG-14 Immunoassay	unverdünnt	100 µl	/
Human HGF Immunoassay	1:2	25 µl	Calibrator diluent RD 6X
Human Endoglin/CD105 Immunoassay	1:10	5 µl	Calibrator diluent RD 5K

*Tabelle 3 Charakteristika der eingesetzten ELISA mit Angabe von verwendeter Verdünnung und eingesetzter Serummenge*

### 2.7.3 Durchführung und Auswertung

#### 2.7.3.1 Prinzip des Sandwich-ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein antikörperbasiertes Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen. Für den Nachweis von TIMP-4, HGF und Endoglin wurden ELISA Kits der Firma R&D-Systems verwendet, die auf dem Prinzip der Sandwich-Technik basieren. Die Mikroplatten waren mit einem spezifischen, gegen das nachzuweisende Protein (in diesem Fall TIMP-4, HGF, Endoglin) gerichteten Antikörper beschichtet. Die Herstellung des Standards und der benötigten Substrate sowie die Durchführung erfolgten analog zu den Herstellerangaben. Zunächst wurde in jedes Well eine vorgegebene Menge an Diluent hinzugegeben. Dann wurde die benötigte Menge an

Serum, Standard und Kontrolle als Doppelbestimmung nach Schema in die einzelnen Wells pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In einem nächsten Schritt wurden die Wells insgesamt vier Mal gewaschen und anschließend wurde der Detektionsantikörper hinzugegeben. Es handelte sich hierbei um einen mit Horseradish Peroxidase als Reporterenzym gekoppelten Antikörper gegen das gebundene, nachzuweisende Protein. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde jedes Well mit einer Substratlösung versetzt und unter Lichtschutz für 30 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Farbreaktion mit einer Stopplösung konnte die Adsorption mithilfe eines ELISA Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Es gilt: je höher der Proteinanteil in der Probe, desto stärker die Farbintensität. Das Programm EasyWin Fitting von Tecan erlaubte durch Erstellung von geeigneten Standardkurven die Konzentrationsberechnung des jeweiligen Proteins. Die Weiterverarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

### **2.7.3.2 Prinzip des kompetitiven ELISA**

Für die Bestimmung von Pentraxin 3 wurde ein ELISA Kit der Firma Blue Gene verwendet. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Immunassay. Der wesentliche Unterschied zu dem Prinzip des Sandwich-ELISA liegt darin, dass kein Detektionsantikörper, sondern ein mit Horseradish Peroxidase markiertes Antigen, in diesem Fall markiertes Pentraxin 3, eingesetzt wird, welches mit dem Protein aus dem Serum um die Bindungsstellen des Antikörpers konkurriert. Das konkurrierende Antigen ist Träger des Reporterenzym, sodass sich die Farbintensität an der Menge des gebundenen konkurrierenden Antigens bemisst. Die Menge an nachgewiesenem Protein ist somit umgekehrt proportional zur Farbintensität.

Die Herstellung der benötigten Substrate und die Durchführung erfolgten analog zu den Herstellerangaben. Zuerst wurde in jedes Well Serum oder Standard als Doppelbestimmung nach Schema pipettiert und dann das markierte Antigen hinzugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37° Celsius. Im Anschluss wurden die Wells insgesamt 5-mal gewaschen. Die Substratlösung wurde hinzugefügt und für 15 Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Die Farbreaktion wurde mithilfe einer Stopplösung beendet. Die Adsorptionsmessung erfolgte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge bei 450 nm. Für die Auswertung wurde das Programm EasyWin Fitting von Tecan benutzt. Die Weiterverarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 22.0.

Mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben genutzt um zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse der Fibroscanuntersuchung und die Expression der Serummarker bei den Mukoviszidosepatienten mit und ohne Leberbeteiligung unterscheiden. Potentielle Extremwerte wurden nach explorativer Datenanalyse mittels Stamm Blatt Diagramm identifiziert und ggf. von der weiteren Berechnung ausgeschlossen.

Geeignete Cut-off Werte zur Diagnose bzw. Ausschluss einer CFLD mithilfe der Ergebnisse der Fibroscanuntersuchung und der Bestimmung der Serummarker wurden mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)–Kurven und ROC-Area under Curve (AUROC) ermittelt. Das bestmögliche Ergebnis für die AUROC ist 1 und zeigt eine sehr hohe diagnostische Genauigkeit und somit ein gutes Testverfahren an.

Um die diagnostische Aussagekraft von ausgewählten Parametern sowohl als Einzelparameter als auch in Kombination zu untersuchen, wurden auf der Grundlage von Kreuztabellen mithilfe eines webbasierten Berechnungsprogramms ([www.vassarstats.net](http://www.vassarstats.net)) die Sensitivität und Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Wert ermittelt.

Die wichtigsten Parameter wurden in Tabellenform inklusive Mittelwert und Standardabweichung visualisiert.

Die Darstellung der Ergebnisse der Fibroscanuntersuchung und der Expression der Serummarker erfolgte mittels Boxplots. Zur besseren Übersicht der Ergebnisse erfolgte zusätzlich die Darstellung der Extremwerte und Ausreißer.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientencharakteristika

In die Auswertung wurden insgesamt 45 Patienten mit Mukoviszidose im Alter von 5 bis 50 Jahren eingeschlossen. Von allen Patienten lagen sowohl eine Blutprobe als auch ein Ergebnis der Fibroscanuntersuchung vor. Bei 17 Patienten (38 %) wurde auf der Grundlage aktueller klinischer Guidelines (siehe Kapitel 1.1.4.1) eine CFLD diagnostiziert. In der Auswertung der routinemäßig erhobenen Laborparameter zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Aspartat-Aminotransferase, der Alanin-Aminotransferase und der Gamma-Glutamyl-Transferase im Serum von CFLD Patienten im Vergleich zum Serum von CF Patienten ohne CFLD. Die Werte für die Anzahl der Thrombozyten und für Albumin waren im Serum von CFLD Patienten signifikant erniedrigt. Weitere klinische und auch demographische Daten der Patienten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

	CFLD	CF ohne CFLD		CFLD	CF ohne CFLD
<b>Demographische Daten</b>	n = 17	n = 28	<b>Laborparameter</b>	n = 17	n = 28
<b>männlich</b>	9	17	<b>Alanin-Aminotransferase (U/L)</b>		
<b>weiblich</b>	8	11	MW ± SD	35 ± 18	23 ± 7,4
<b>Alter (Jahre)</b>			Spannweite	12 - 79	12 - 50
MW ± SD	29 ± 10,8	21,4 ± 11,8	<b>Aspartat-Aminotransferase (U/L)</b>		
Spannweite	14 - 47	5 - 50	MW ± SD	33 ± 20,3	21 ± 6,3
<b>Klinische Parameter</b>	n = 17	n = 28	Spannweite	11 - 98	10 - 36
<b>Body Mass Index</b>			<b>γ-Glutamyl-Transferase (U/L)</b>		
MW ± SD	20,3 ± 2,1	19 ± 3,6	MW ± SD	86 ± 110	14 ± 6,5
<b>Pankreasinsuffizienz</b>			Spannweite	9 - 321	6 - 34
vorhanden	17	23	<b>Alkalische Phosphatase (U/L)</b>		
nicht vorhanden	0	5	MW ± SD	248 ± 185	179 ± 106
<b>Behandlung mit UDCA</b>			Spannweite	84 - 668	62 - 452
vorhanden	15	9	<b>Bilirubin (mg/dl)</b>		
nicht vorhanden	2	19	MW ± SD	0,94 ± 0,76	0,42 ± 0,22
			Spannweite	0,2 - 2,18	0,1 - 0,9
			<b>Albumin (g/dl)</b>		
			MW ± SD	4,2 ± 0,47	4,5 ± 0,23
			Spannweite	3,1 - 4,8	4 - 4,9
			<b>Thrombozyten (G/L)</b>		
			MW ± SD	226 ± 120	306 ± 66
			Spannweite	18 - 362	131 - 464

Tabelle 4 Übersicht über die erhobenen demographischen und klinischen Parameter der Mukoviszidosepatienten

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, UDCA: Ursodesoxycholsäure

Neben den bereits beschriebenen Parametern wurde bei den Patienten anhand von Ergebnissen der hepatischen Sonographie ein Score für das Ausmaß der Leberschädigung bestimmt (siehe Kapitel 4.4.3). Eine Übersicht über die ermittelten Scores in den beiden Gruppen CFLD und CF ohne CFLD gibt Tabelle 5.

Sore	1	2	3	4	5	n.e.
CF ohne CFLD	28	0	0	0	0	0
CFLD	0	0	2	9	5	1

*Tabelle 5 Darstellung der sonographisch ermittelten Scores zur Einteilung der Leberbeteiligung bei den Mukoviszidosepatienten (n = 45)  
n.e.: nicht erhoben*

Um den potentiellen Einfluss von Lungenfunktionsstörungen auf die Expression der Serummarker zu untersuchen, wurde eine Lungenfunktionsprüfung durchgeführt und die Patienten je nach Ausmaß der Lungenbeteiligung in zwei Gruppen eingeteilt. Als Grenzwert für die Vitalkapazität diente 80 % vom Soll, für die forcierte Einsekundenkapazität 70 % vom Soll und für die Ratio FEV1/VC 0,7.

Aus dem Kollektiv aller Mukoviszidosepatienten wurden je 4 CF Patienten mit und ohne Leberbeteiligung für das Proteome Profiling ausgewählt.

Als weiteres Kontrollkollektiv, zusätzlich zu Mukoviszidosepatienten ohne CFLD, dienten 18 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion. Bei diesen 18 Patienten wurde eine Leberbiopsie durchgeführt. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über das erhobene Grading und Staging in diesem Kollektiv.

n = 18	Grading						n.e.	Staging				
Anzahl	0	1	2	3			0	1	2	3	4	
	1	5	7	2	3		3	4	5	3	3	

*Tabelle 6 Häufigkeitsverteilung von Grading und Staging bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion*

*n.e.: nicht erhoben*

## 3.2 Ergebnisse der Proteome Profiler Analysen

### 3.2.1 Human Chemokine Array Kit

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, lassen sich mithilfe des Human Chemokine Array Kits insgesamt 31 Proteine nachweisen. Im Folgenden werden die Ergebnisse bei einer Inkubation der Membran mit jeweils 200 µl Serum und einer Expositionsdauer des Röntgenfilms von 30 Minuten beschrieben. Diese Bedingungen wurden herangezogen weil hierunter eine größtmögliche Anzahl an Proteinen identifiziert werden konnte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	PK																			PK
B			CCL21		CCL28		CXCL16		TIG-2		CXCL5		CCL 26		CX3CL1		CXCL1			
C			CCL14		CCL1		CXCL8		IL-16		CXCL10		CXCL11		XCL1		CCL2			
D			CCL7		CCL22		Midkine		CXCL9		MIP-1α/β		MIP-1δ		MIP-3α		MIP-3β			
E			CXCL7		CCL18		CXCL4		CCL5		CXCL12		CCL17		CXCL17					
F			Fibrinogen (IK)		Gp 130 (IK)		CD71 (IK)		NK											
G	PK																			

Tabelle 7 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human Chemokine Array Kits

Mithilfe der Tabelle lassen sich die einzelnen Spots aus Abbildung 4 den korrespondierenden Proteinen zuordnen. Für weitere Erläuterungen siehe Text. PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle, IK: Interne Kontrolle, CCL: Chemokine (C-C motif) ligand, CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand, TIG-2: Tazarotene-induced gene 2 protein, CX3CL: Chemokine (C-X3-C motif) ligand, IL: Interleukin, XCL1: Chemokine (C motif) ligand, MIP: Macrophage inflammatory protein, Gp 130: Glycoprotein 130, CD: Cluster of Differentiation

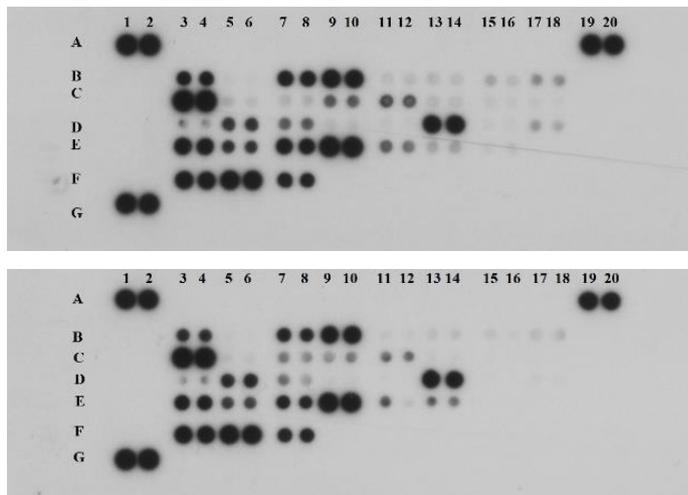


Abbildung 4 Nachweisbare Proteine des Human Chemokine Array Kits bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF-Patienten ohne CFLD (untere Abbildung).

Die Membranen wurden mit einem gepoolten Serum von je vier CF-Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung versetzt. Alle Proteine sowie alle Kontrollen liegen in doppelter Form vor. Die mittlere Pixeldichte ergibt sich jeweils aus dem Mittelwert der Pixeldichte von zwei korrespondierenden Spots.

Für alle identifizierten Proteine wurde die mittlere Pixeldichte (MP) bestimmt und anschließend die Ratio (MP CFLD)/(MP CF ohne CFLD) errechnet. Abbildung 5 zeigt die sechs Proteine, die im Serum von CFLD-Patienten mehr als 2-fach erhöht vorlagen sowie die zwei Proteine, die mehr als 2-fach erniedrigt waren.

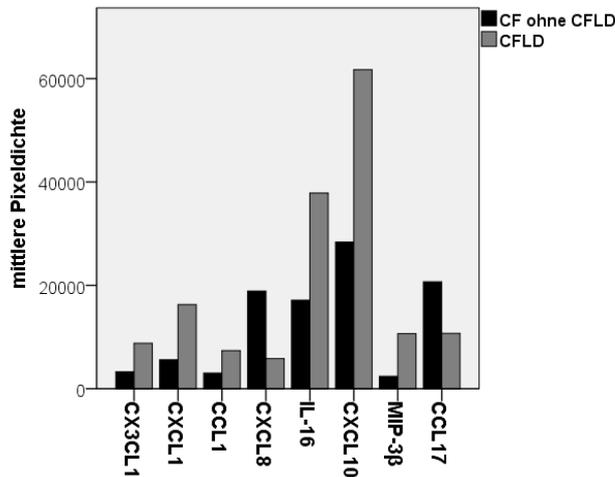


Abbildung 5 Darstellung der Proteine des Human Chemokine Array Kits, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt vorlagen.

Der Versuch wurde mit zwei unterschiedlichen Serummengen durchgeführt, zudem wurden verschiedene Zeitspannen bis zur Entwicklung des Röntgenfilms gewählt. Eine Übersicht über alle relevanten Ergebnisse dieses Proteome Profilers zeigt Tabelle 8.

	eingesetzte Serummenge	200 µl	200 µl	50µl	50µl	50µl
	Expositionsdauer	min 1	min 30	sek 30	min 1	sek 10
Koordinaten	Protein	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
B7, B8	CXCL16					
B9, B10	TIG-2					2,9
B11, B12	CXCL5					
B13, B14	CCL26					
B15, B16	CX3CL1	2,5	2,7			
B17, B18	CXCL1		2,9	0,4		
C5, C6	CCL1		2,4			
C7, C8	CXCL8	0,1	0,3	0,5	0,5	
C9, C10	IL-16		2,2			
C11, C12	CXCL10		2,2			12,9
C13, C14	CXCL11			2,6	2,1	
D7, D8	Midkine			2,1	2,2	
D11, D12	MIP-1α/β					
D13, D14	MIP-16					9,4
D17, D18	MIP-3β			4,5		
E5, E6	CCL18					
E7, E8	CXCL4					3,3
E9, E10	CCL5					0,4
E13, E14	CCL17	0,5	0,5	0,5	0,5	

Tabelle 8 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human Chemokine Array Kits

Es wurden nur Proteine in der Tabelle berücksichtigt, die sich in der Ratio CFLD/CF ohne CFLD um mindestens das 2-fache unterscheiden. Die Angabe der Koordinaten bezieht sich auf Tabelle 7.

### 3.2.2 Human Angiogenesis Array Kit

Der Proteome Profiler für Angiogenesefaktoren ist für den Nachweis von 55 Proteinen geeignet. Im Folgenden werden die Ergebnisse bei einer Inkubation der Membran mit jeweils 200 µl Serum bei einer Expositionsdauer des Röntgenfilms von 30 Minuten beschrieben, da diese Ergebnisse besonders gut visualisiert werden konnten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A		PK			Activin A		ADAMTS-1		Angiogenin		Ang-1		Ang-2		Angiostatin		Amphiregulin		Artemin					PK
B		Coa. Faktor III		CXCL16		DPPIV		EGF		EG-VEGF		Endoglin		Endostatin		Endothelin-1		FGF-1		FGF-2		FGF-4		FGF-7
C		GDNF		GM-CSF		HB-EGF		HGF		IGFBP-1		IGFBP-2		IGFBP-3		IL-1β		IL-8		LAP		Leptin		MCP-1
D		MIP-1α		MMP-8		MMP-9		NRG1-β1		Pentraxin 3		PD-ECGF		PDGF-AA		PDGF-AB/-BB		Persephin		PF4		PLGF		Prolactin
E		Serpin B5		Serpin E1		Serpin F1		TIMP-1		TIMP-4		TSP-1		TSP-2		uPA		Vasohibin		VEGF		VEGF-C		
F		PK																						NK

Tabelle 9 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human Angiogenesis Array Kits

Mithilfe der Tabelle lassen sich die einzelnen Spots aus Abbildung 6 den korrespondierenden Proteinen zuordnen. PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle, ADAMTS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs, Ang: Angiopoietin, CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand, DPPIV: Dipeptidyl peptidase-4, EGF: Epidermal growth factor, EG-VEGF: Endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor, FGF: Fibroblast growth factors, IGFBP: Insulin-like growth factor-binding protein, IL: Interleukin, LAP: Leukocyte alkaline phosphatase, MCP: Monocyte chemotactic protein, MIP: Macrophage inflammatory protein, MMP: Matrix metalloproteinases, NRG1: Neuregulin 1, PD-ECGF: Platelet-derived endothelial cell growth factor, PDGF: Platelet-derived growth factor, PF4: Platelet factor 4, PLGF: Placental growth factor, TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase, TSP: Thrombospondin, uPA: Urokinase-type plasminogen activator, VEGF: Vascular endothelial growth factor

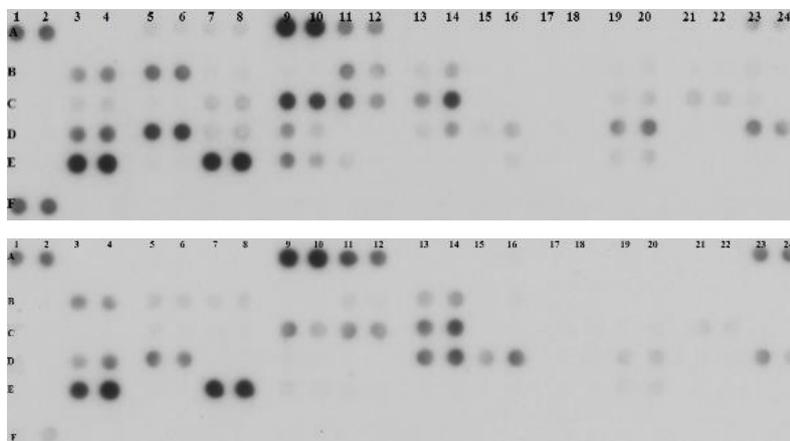


Abbildung 6 Nachweisbare Proteine des Human Angiogenesis Array Kits bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung).

Die Membranen wurden mit einem gepoolten Serum von je vier CF Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung versetzt. Alle Proteine sowie alle Kontrollen liegen in doppelter Form vor. Die mittlere Pixeldichte ergibt sich jeweils aus dem Mittelwert der Pixeldichte von zwei korrespondierenden Spots.

Für alle Proteine, die mittels Proteome Profiler nachweisbar waren, wurde die mittlere Pixeldichte (MP) bestimmt und anschließend die Ratio (MP CFLD)/(MP CF ohne CFLD) errechnet.

Abbildung 7 zeigt die 12 Proteine, die im Serum von CFLD-Patienten mehr als 2-fach erhöht vorlagen sowie die zwei Proteine, die mehr als 2-fach erniedrigt waren.

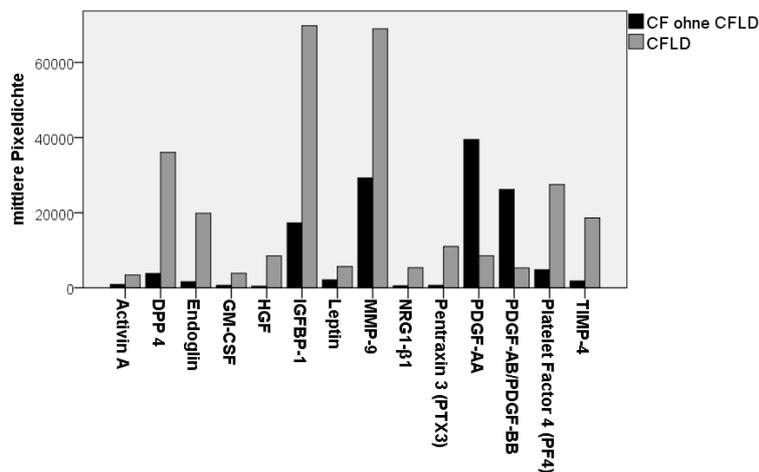


Abbildung 7 Darstellung der Proteine des Human Angiogenesis Array Kits, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren.

Der Versuch wurde mit jeweils 50 µl und 200 µl Serum durchgeführt und variierte zudem noch in der Expositionsdauer des Röntgenfilms zur ECL-Lösung. Eine Übersicht über alle relevanten Proteine dieses Proteome Profilers gibt Tabelle 10.

Koordinaten	Eingesetzte Serummenge	200 µl		50µl		50µl		50µl	
		Expositionsdauer	1 Min	30 Min	20 Sek	1 Min	5 Sek	10 Min	
Protein	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio		
A5, A6	Activin A	15,33	3,72	3,05	2,54		3,77		
A7, A8	ADAMTS-1	44,10		13,35	10,39		13,61		
A11, A12	Angiopoietin-1					0,35			
A15, A16	Angiostatin				0,43		0,29		
A19, A20	Artemin			2,02			2,03		
B5, B6	DPPIV		9,46						
B7, B8	EGF	0,36		0,29	0,32		0,37		
B9, B10	EG-VEGF			2,85			3,59		
B11, B12	Endoglin		12,13	5,63	2,68		2,76		
B15, B16	Endothelin-1			0,33	0,33		2,65		
B19, B20	FGF-2	5,14		3,38	5,59		3,24		
B21, B22	FGF-4	6,67							
B23, B24	FGF-7	24,41			5,68				
C3, C4	GM-CSF	71,30	5,71	26,04	24,65		17,75		
C5, C6	HB-EGF	0,11		0,13	0,25		0,14		
C7, C8	HGF	4,73	18,73	7,75	4,86		3,90		
C9, C10	IGFBP-1		4,04						
C15, C16	IL-1β					4,48			
C17, C18	IL-8	0,15							
C19, C20	LAP			3,25	2,71		6,87		
C21, C22	Leptin		2,64						
C23, C24	MCP-1	7,02							
D5, D6	MMP-9		2,35						
D7, D8	NRG1-β1	50,98	9,72	7,75	8,10		11,83		
D9, D10	Pentraxin 3		16,05	7,35	2,64				
D13, D14	PDGF-AA		0,22						
D15, D16	PDGF-AB/PDGF-BB	0,49	0,20	0,17	0,39	0,34			
D19, D20	Platelet Factor 4 (PF4)		5,69						
D23, D24	Prolactin						0,37		
E5, E6	Serpin F1					0,41			
E9, E10	TIMP-4		10,11						
E11, E12	Thrombospondin-1	4,21				2,29			
E15, E16	uPA	4,18			5,02		2,87		

Tabelle 10 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human Angiogenesis Array Kits  
Es wurden nur Proteine in der Tabelle berücksichtigt, die sich in der Ratio CFLD/CF ohne CFLD um mindestens das 2-fache unterscheiden. Die Angaben der Koordinaten beziehen sich auf Tabelle 9.

### 3.2.3 Human Soluble Receptor Array Kit, Non-Hematopoietic Panel

#### 3.2.3.1 Part N

Der Proteome Profiler für lösliche Rezeptoren wird aufgrund seiner Größe in einen Part N und einen Part C aufgeteilt. Der Versuch wurde mit einer Serummenge von je 50 µl und einer Expositionsdauer von 20 Sekunden durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	PK		PK		ADAM15		βIG-H3		BMPR-IB		Cadherin-4		Cadherin-11		Cadherin-13		E-Cadherin		N-Cadherin				PK	
B	PK				PCAD		CDH5		Cathepsin D		CD40		CD66e		CALL		Clusterin		Thrombin					
C	COMP		CRELD2		Desmoglein 2		ECM-1		EGF R		PODXL2		EpCAM		ErbB2		ErbB3		ErbB4		ESAM		Galectin-2	
D	HPRG		ITGA3		ITGA5		ITGA6		ITGA9		ITGAV		JAG1		JAM-B		JAM-C		LRP-6		MCAM		MEPE	
E	MUCDHL		Nectin-2		Nectin-4		IGLON2		Notch-1		NrCAM		Periostin		PODXL		CD62E		SEMA3A		SREC-I		SREC-II	
F	STC1		SDC1		SDC4		TSP2		TIMP-4		TROP-2		VAP-1		VCAM-1		VEGF R1		VEGF R2					
G	PK				IgM (IK)		A2M (IK)		CD71 (IK)		VIM (IK)		PBS (NK)										PK	

Tabelle 11 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part N

Mithilfe der Tabelle lassen sich die einzelnen Spots aus Abbildung 8 den korrespondierenden Proteinen zuordnen. Für weitere Erläuterungen siehe Text. PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle, IK: Interne Kontrolle, βIG-H3: Transforming growth factor β-induced, BMPR-IB: Anti-Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B, PCAD: P-Cadherin, CHH5: VE-Cadherin, CD: Cluster of Differentiation, CALL: Neural cell adhesion molecule L1-like protein, COMP: Cartilage oligomeric matrix protein, CRELD: Cysteine-rich with EGF-like domain protein, ECM: Extracellular matrix protein, EGF R: Epidermal growth factor receptor, PODXL: Podocalyxin-like protein 1, EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule, ErbB: Epidermal growth factor receptor, ESAM: Endothelial cell-selective adhesion molecule, HPRG: Histidine-rich glycoprotein, ITGA: Integrin alpha, JAG 1: Jagged 1 protein, JAM: Junctional adhesion molecule, LRP: Low-density lipoprotein receptor-related protein, MCAM: melanoma cell adhesion molecule, MEPE: Matrix extracellular phosphoglycoprotein, MUCDHL: Mucin and cadherin-like protein, IGLON: Neurotrimin, NrCAM: Neuronal cell adhesion molecule, PODXL: Podocalyxin-like protein 1, SEMA: Semaphorin, SREC: Scavenger receptor expressed by endothelial cell, STC: Stanniocalcin, SDC: Syndecan, TSP: Thrombospondin, TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase, TROP: Tumor-associated calcium signal transducer, VAP: Vascular adhesion protein, VCAM: Vascular cell adhesion molecule, VEGF: Vascular endothelial growth factor, IgM: Immunoglobulin M, A2M: Alpha-2-Macroglobulin, VIM: Vimentin, PBS: Phosphate buffered saline

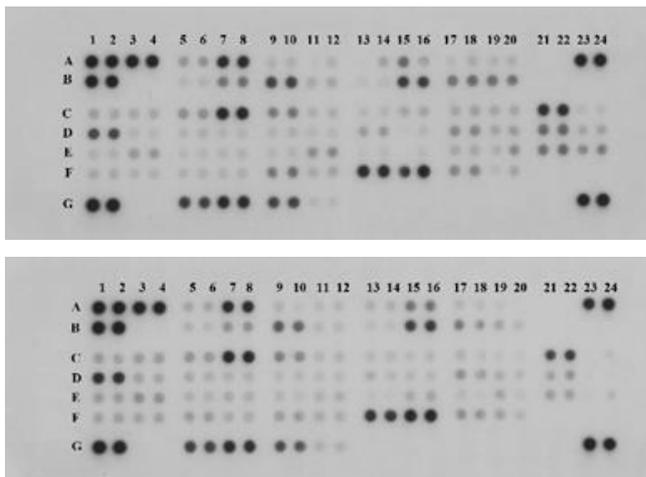


Abbildung 8 Nachweisbare Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part N bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung). Die Membranen wurden mit einem gepoolten Serum von je vier CF Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung versetzt. Alle Proteine sowie alle Kontrollen liegen in doppelter Form vor. Die mittlere Pixeldichte ergibt sich jeweils aus dem Mittelwert der Pixeldichte von zwei korrespondierenden Spots.

Für alle Proteine des Human Soluble Receptor Array Kits Part N, die im Serum nachweisbar waren, wurde die mittlere Pixeldichte bestimmt und anschließend die Ratio (MP CFLD)/ (MP CF ohne CFLD) errechnet. Abbildung 9 zeigt die 10 Proteine, die im Serum von CFLD-Patienten mehr als 2-fach erhöht vorlagen sowie die vier Proteine, die mehr als 2-fach erniedrigt waren.

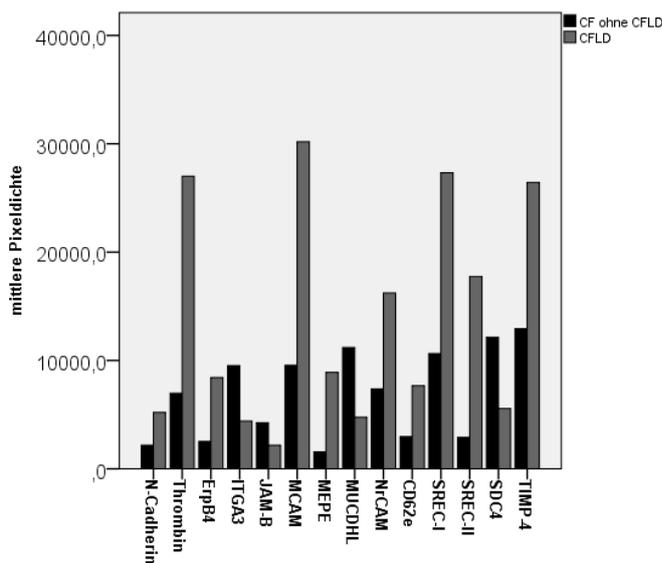


Abbildung 9 Darstellung der Proteine des Human Soluble Receptor Array Kits Part N, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren.

Der Versuch wurde, wie oben beschrieben, mit einer Serummengung von 50 µl und einer Expositionsdauer von 20 Sekunden durchgeführt. Tabelle 12 gibt die Ratio CFLD/CF ohne CFLD der identifizierten Proteine wieder.

	Eingesetzte Serummengung	50 µl
	Expositionsdauer	20 Sek
Koordinaten	Protein	Ratio
A19, A20	N-Cadherin	2,39
B19, B20	Coagulation Factor II / Thrombin	3,87
C19, C20	ErpB4	3,34
D15, D16	ITGA3	0,46
D15, D16	JAM-B	0,51
D21, D22	MCAM	3,16
D23, D24	MEPE	5,67
E1, E2	MUCDHL	0,42
E11, E12	NrCAM	2,20
E17, E18	CD62e	2,58
E21, E22	SREC-I	2,57
E23, E24	SREC-II	6,09
F5, F6	SDC4	0,46
F9, F10	TIMP-4	2,04

Tabelle 12 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human soluble Receptor Array Kits, Part N Die Angaben der Koordinaten beziehen sich auf Tabelle 11.

### 3.2.3.2 Part C

Wie bereits beschrieben, wird der Proteome Profiler für lösliche Rezeptoren in einen Part N und einen Part C aufgeteilt. Nachdem die Ergebnisse für Part N im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden, folgt nun die Darstellung der Ergebnisse für Part C, bei einer eingesetzten Serummenge von 50 µl und einer Expositionsdauer von 20 Sekunden. Bei dieser Versuchskonstellation konnten die meisten Proteine identifiziert werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	PK	PK	ACE	ADAM8	ADAM9	ADAM10	ALCAM	Amphiregulin	APP	BACE-1													PK	
B	PK	PK	BCAM	C1qR1	CD9	CD23	CD31	CD36	CD154	CD44H														
C	CD58	CD90	CD99	CD155	CEACAM-1	CX3CL1	CXCL8	CD147	Endoglin	Epregrulin	Galectin-1	Galectin-3												
D	MAC-2BP	HB-EGF	ICAM-2	IL-1 RII	IL-15 R $\alpha$	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5	ITGB6	CD321												
E	NGAL	LOX-1	MD-1	MMP-2	NCAM-1	NCAM-L1	Osteopontin	PAR1	Pref-1	RECK	Stabilin-1	TACE												
F	TSP	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TNF RII																			
G	PK	IgM (IK)	A2M (IK)	CD71 (IK)	VIM (IK)	PBS (NK)																	PK	

Tabelle 13 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part C

Mithilfe der Tabelle lassen sich die einzelnen Spots aus Abbildung 10 den korrespondierenden Proteinen zuordnen. Für weitere Erläuterungen siehe Text. PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle, IK: Interne Kontrolle, ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym, ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase, ALCAM: Activated leukocyte cell adhesion molecule, APP: Amyloid-Precursor-Protein, BACE: Beta-secretase, BCAM: Basal cell adhesion molecule, C1qR1: Complementcomponent1 receptor 1, CD: Cluster of Differentiation, CEACAM: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule, CX3CL1: Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (Fractalkine), CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand, MAC-2BP: Galectin-3-binding protein, HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor, ICAM: Intercellular adhesion molecule, IL: Interleukin, ITGB: Integrin beta, NGAL: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, LOX: Lysyl oxidase, MD-1: Lymphocyte Antigen 86, MMP: Matrix-Metalloproteasen, NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule, PAR1: Prader-Willi/Angelman region-1, Pref-1: Preadipocyte factor 1, RECK: Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs, TACE: Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme, TSP: Thrombospondin, TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase, TNF R: Tumor necrosis factor receptor, IgM: Immunoglobulin M, A2M: Alpha-2-Macroglobulin, VIM: Vimentin, PBS: phosphate buffered saline

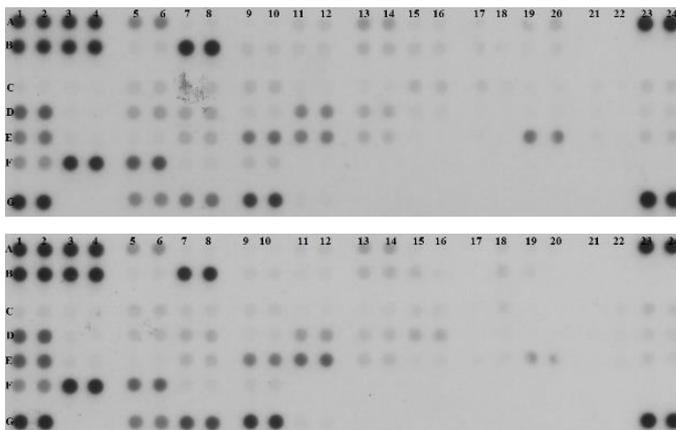


Abbildung 10 Nachweisbare Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part C bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung).

Die Membranen wurden mit einem gepoolten Serum von je vier CF Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung versetzt. Alle Proteine sowie alle Kontrollen liegen in doppelter Form vor. Die mittlere Pixeldichte ergibt sich jeweils aus dem Mittelwert der Pixeldichte von zwei korrespondierenden Spots.

Für jedes Protein des Human Soluble Receptor Array Kits Part C, das mithilfe des Proteome Profilers nachgewiesen werden konnte, wurde die mittlere Pixeldichte bestimmt und anschließend die Ratio (MP CFLD)/(MP CF ohne CFLD) errechnet. Abbildung 11 zeigt die sechs Proteine, die im Serum von CFLD-Patienten mehr als 2-fach erhöht vorlagen sowie die zwei Proteine, die mehr als 2-fach erniedrigt waren.

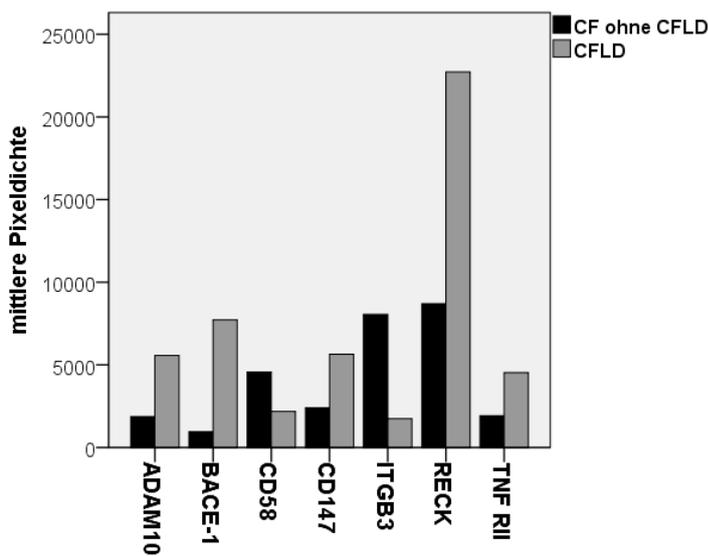


Abbildung 11 Darstellung der Proteine des Human Soluble Receptor Array Kits Part C, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren.

Dieser Versuch wurde mit einer Serummenge von 50 µl und einer Expositionsdauer von einer Minute bzw. 20 Sekunden durchgeführt. Eine Übersicht über alle relevanten Proteine dieses Arrays gibt Tabelle 14.

	Eingesetzte Serummenge		
	50 µl	50 µl	
	Expositionsdauer		
	1 Min	20 Sek	
Koordinaten	Name	Ratio	Ratio
A11, A12	ADAM10		2,99
A19, A20	BACE-1		8,08
B11, B12	CD23	2,28	3,08
C13, C14	CXCL8	0,39	
C15, C16	CD147		2,35
D15, D16	ITGB3	0,43	0,22
E19, E20	RECK		2,61
F9, F10	TNF RII		2,36

Tabelle 14 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part C

Es wurden nur Proteine in der Tabelle berücksichtigt, die sich in der Ratio CFLD/CF ohne CFLD um mindestens das 2-fache unterscheiden. Die Angaben der Koordinaten beziehen sich auf Tabelle 13.

### 3.2.4 Human Cytokine Array Panel A

Mithilfe des Proteome Profilers für Cytokine konnte das Serum auf 36 verschiedene Proteine untersucht werden. Es werden die Ergebnisse für eine eingesetzte Serummenge von 100 µl bei einer Expositionsdauer von einer Minute vorgestellt, da bei diesem Versuch die meisten Proteine identifiziert werden konnten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	PK		C5/C5a		CD40 Ligand		G-CSF		GM-CSF		GRO $\alpha$		I-309		sICAM-1		IFN- $\gamma$		PK	
B			IL-1 $\alpha$		IL-1 $\beta$		IL-1ra		IL-2		IL-4		IL-5		IL-6		IL-8			
C			IL-10		IL-12 p70		IL-13		IL-16		IL-17		IL-17E		IL-23		IL-27			
D			IL-32 $\alpha$		IP-10		I-TAC		MCP-1		MIF		MIP-1 $\alpha$		MIP-1 $\beta$		Serpin E1			
E	PK		RANTES		SDF-1		TNF- $\alpha$		sTREM-1										NK	

Tabelle 15 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A

Mithilfe der Tabelle lassen sich die einzelnen Spots aus Abbildung 12 den korrespondierenden Proteinen zuordnen. Für weitere Erläuterungen siehe Text. PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle, C: Komplementkomponente, CD: Cluster of Differentiation, G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor, GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, I-309: Chemokine (C-C motif) ligand, sICAM: Soluble intercellular adhesion molecule, IFN: Interferon, IL: Interleukin, IP: Interferon gamma-induced protein, I-TAC: Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant, MCP: monocyte chemotactic protein, MIF: Macrophage migration inhibitory factor, MIP: Macrophage Inflammatory Protein, SDF: stromal cell-derived factor, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha, sTREM-1: soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1

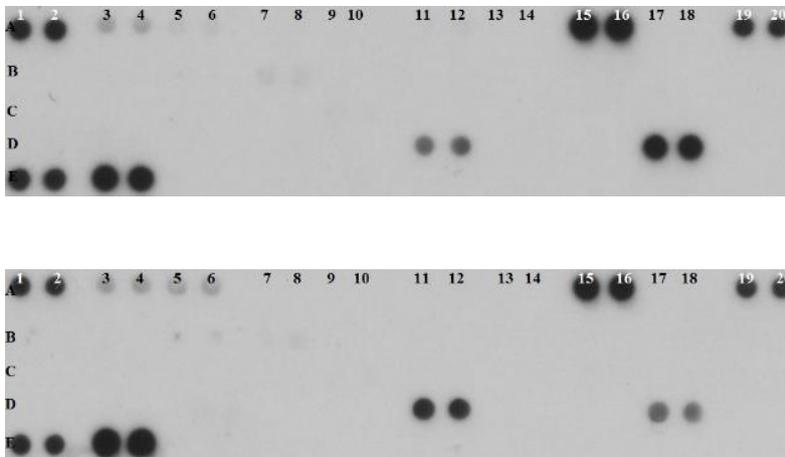


Abbildung 12 Nachweisbare Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung).

Die Membranen wurden mit einem gepoolten Serum von je vier CF Patienten mit bzw. ohne Leberbeteiligung versetzt. Alle Proteine sowie alle Kontrollen liegen in doppelter Form vor. Die mittlere Pixeldichte ergibt sich jeweils aus dem Mittelwert der Pixeldichte von zwei korrespondierenden Spots.

Für alle Cytokine, die mittels Proteome Profiler nachgewiesen werden konnten, wurde die mittlere Pixeldichte (MP) bestimmt und anschließend die Ratio (MP CFLD)/(MP CF ohne CFLD) errechnet. Abbildung 13 zeigt ein Protein, das im Serum von CFLD-Patienten mehr als 2-fach erhöht vorlag sowie die zwei Proteine, die mehr als 2-fach erniedrigt waren.

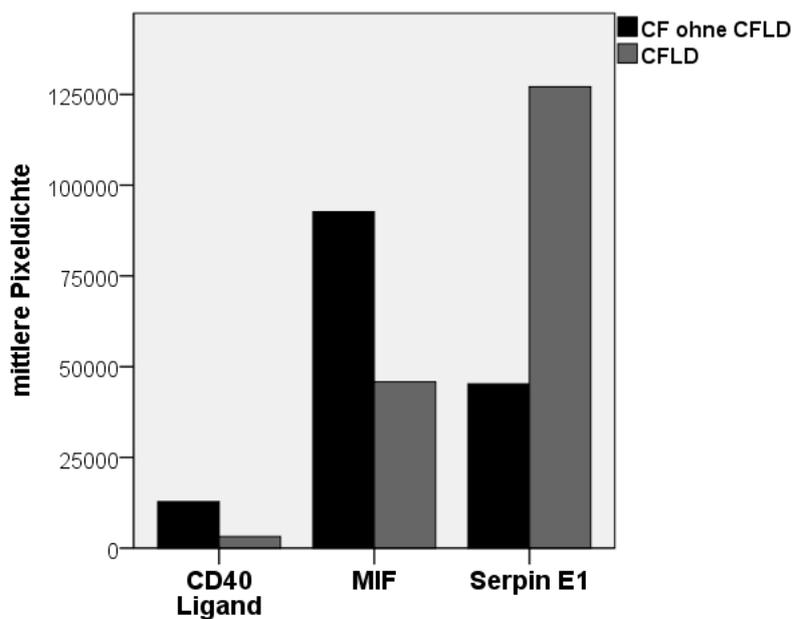


Abbildung 13 Darstellung der Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren.

Der Versuch wurde mit 100 µl und einer Expositionsdauer von je einer Minute und 15 Minuten durchgeführt. Eine Übersicht über alle relevanten Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A gibt Tabelle 16.

	eingesetzte Serummenge	100µl	100µl
	Expositionsdauer	1 Min	15 Min
Koordinaten	Protein	Ratio	Ratio
A5, A6	CD40 Ligand	0,25	0,28
D11, D12	MIF	0,49	
D17, D18	Serpin E1	2,81	2,04

Tabelle 16 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A

Es wurden nur Proteine in der Tabelle berücksichtigt, die sich in der Ratio CFLD/CF ohne CFLD um mindestens das 2-fache unterscheiden. Die Angaben der Koordinaten beziehen sich auf Tabelle 15.

### 3.3 Ergebnisse der ELISA – Analysen

#### 3.3.1 Expression der Serummarker bei Mukoviszidose

Bei allen Mukoviszidosepatienten wurde die Expression der Serummarker untersucht. Die Auswertung ergab eine signifikante Erhöhung der Expression von TIMP-4 und Endoglin im Serum von CFLD Patienten im Vergleich zu Serum von CF Patienten ohne CFLD. Bei HGF zeigte sich zwar eine Tendenz zu höheren Werten in der CFLD Gruppe, aber dieser Wert erreichte keine Signifikanz. Bei Pentraxin 3 war der Wert im Serum von CFLD Patienten im Vergleich zu CF Patienten ohne CFLD signifikant erniedrigt.

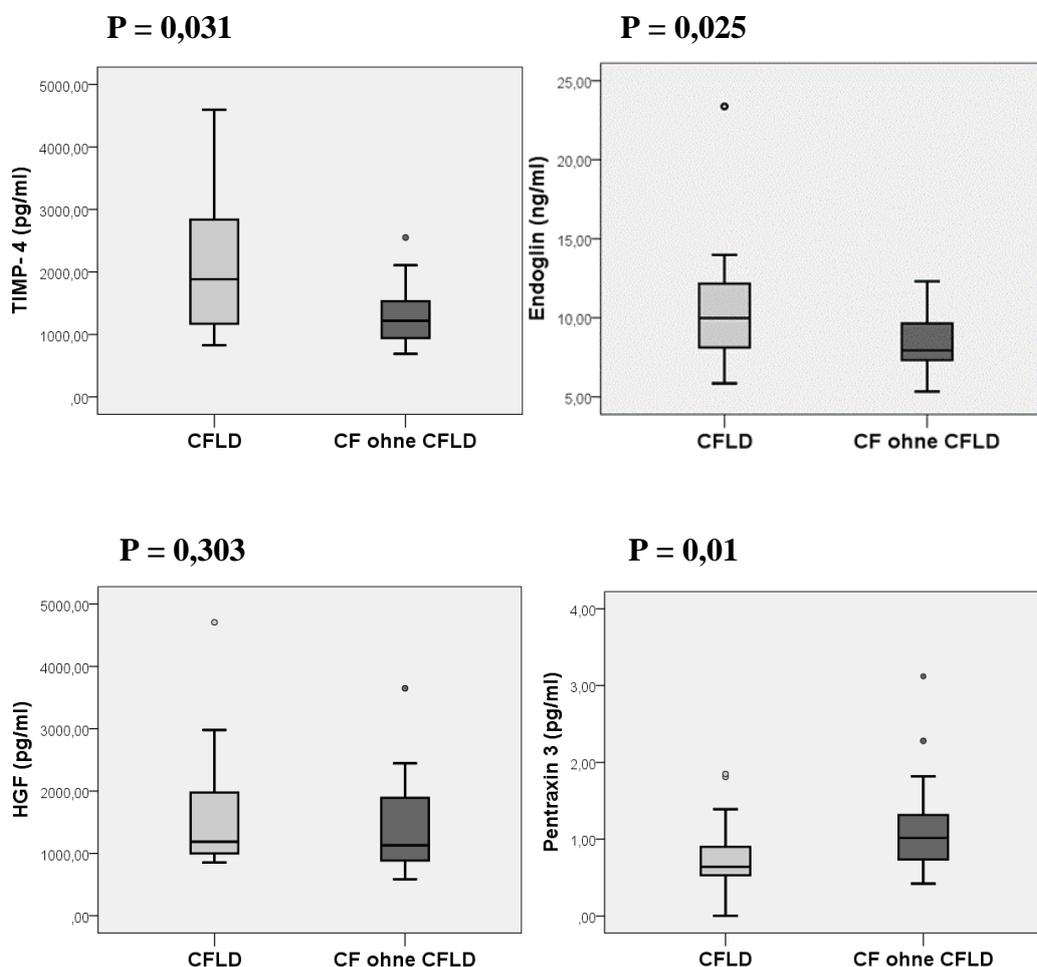


Abbildung 14 Darstellung der Expression von TIMP-4, Endoglin, HGF und Pentraxin 3 im Serum von CF Patienten mit bzw. ohne CFLD.

Beim Vergleich beider Gruppen zeigte sich eine signifikante Regulierung von TIMP-4, Endoglin und Pentraxin 3. Bei HGF lag eine vergleichbare Expression in beiden Gruppen vor.

Für die beiden Proteine, die signifikant erhöht waren, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt und der bezüglich Sensitivität und Spezifität bestmögliche Cut-Off-Wert für die Diagnose einer CFLD ermittelt.

#### *TIMP-4*

Für TIMP-4 liegt die Area under the curve bei 0,693 bei einem 95 % Konfidenzintervall von 0,520 – 0,866 und einem p-Wert von 0.031.

Der Cut-off-Wert für die Diagnose einer CFLD liegt bei 1603 pg/ml.

#### *Endoglin*

Für Endoglin liegt die Area under the curve bei 0,702 bei einem 95 % Konfidenzintervall von 0,533 – 0,871 und einem p-Wert von 0,025.

Der Cut-off-Wert für die Diagnose einer CFLD liegt bei 8,6 ng/ml.

### **3.3.2 Potentielle Einflussfaktoren auf die Expressionsrate der Serummarker**

#### *Lungenfunktionsstörung*

Wie bereits beschrieben, wurden die Patienten je nach Ausmaß der Lungenbeteiligung in zwei Gruppen eingeteilt und bezüglich Expression der Serummarker miteinander verglichen. Weder für TIMP-4, noch für Endoglin oder Pentraxin 3 zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 17 dargestellt.

	FEV1 $\leq$ 70%	VC $\leq$ 80 %	FEV1/VC $\leq$ 0,7
TIMP-4 (p-Wert)	0,071	0,188	0,071
Endoglin (p-Wert)	0,35	0,173	0,395
Pentraxin 3 (p-Wert)	0,799	0,575	0,98

*Tabelle 17 Einteilung der CF Patienten nach Vorhandensein einer Lungenfunktionsstörung und Überprüfung der statistischen Signifikanz beim Vergleich beider Gruppen.*

*FEV1: forcierte Einsekundenkapazität, VC: Vitalkapazität*

#### *Therapie mit UDCA*

Um einen potentiellen Einfluss einer Therapie mit UDCA auf die Expression der Serummarker zu untersuchen, wurden die Patienten je nach Vorhandensein einer Therapie mit UDCA in zwei Gruppen eingeteilt. Beim Vergleich beider Gruppen zeigte

sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von TIMP-4, Endoglin und Pentraxin 3. Es ergaben sich folgende p-Werte im Einzelnen: TIMP-4: 0,481; Endoglin: 0,107 und Pentraxin 3: 0,334.

#### *Pankreasinsuffizienz*

Das Kollektiv der Mukoviszidosepatienten wurde bezüglich einer vorhandenen Pankreasinsuffizienz in zwei Gruppen eingeteilt und miteinander verglichen. Weder TIMP-4 noch Endoglin oder Pentraxin zeigten einen signifikanten Unterschied im Vergleich beider Gruppen. Die statistische Analyse erbrachte folgende p-Werte: TIMP-4: 1,00; Endoglin: 0,110 und Pentraxin 3: 0,194.

### **3.3.3 Zusammenhang zwischen Expression der Serummarker und Fibroestadien bei HCV-Patienten**

Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Expression von TIMP-4, Endoglin und Pentraxin 3 und dem histologisch determiniertem Staging zu untersuchen, wurde das Serum von 18 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion analysiert. Von diesen Patienten lag, im Gegensatz zu den Patienten aus dem Kollektiv der Mukoviszidosepatienten, das Resultat einer Leberbiopsie vor.

Zunächst wurden die Ergebnisse bei CFLD Patienten mit denen von HCV Patienten verglichen, wobei sich zeigte, dass es im Vergleich der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied gibt. Es ergaben sich folgende p-Werte: TIMP-4: 0,110; Endoglin: 0,581 und Pentraxin 3: 0,496.

Dann wurde das Serum von HCV-Patienten mit einer Zirrhose (F4) mit dem Serum von HCV-Patienten, bei denen eine mittelgradige bis hochgradige Fibrose (F2/3), aber keine Zirrhose vorlag, verglichen. Es zeigte sich, dass die Expression von TIMP-4 und Endoglin sowie HGF bei Patienten mit einem Staging von F4 signifikant erhöht war im Vergleich zu der Expression bei Patienten mit einem Staging von F2/3. Bezüglich Pentraxin 3 ergab sich kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich beider Gruppen.

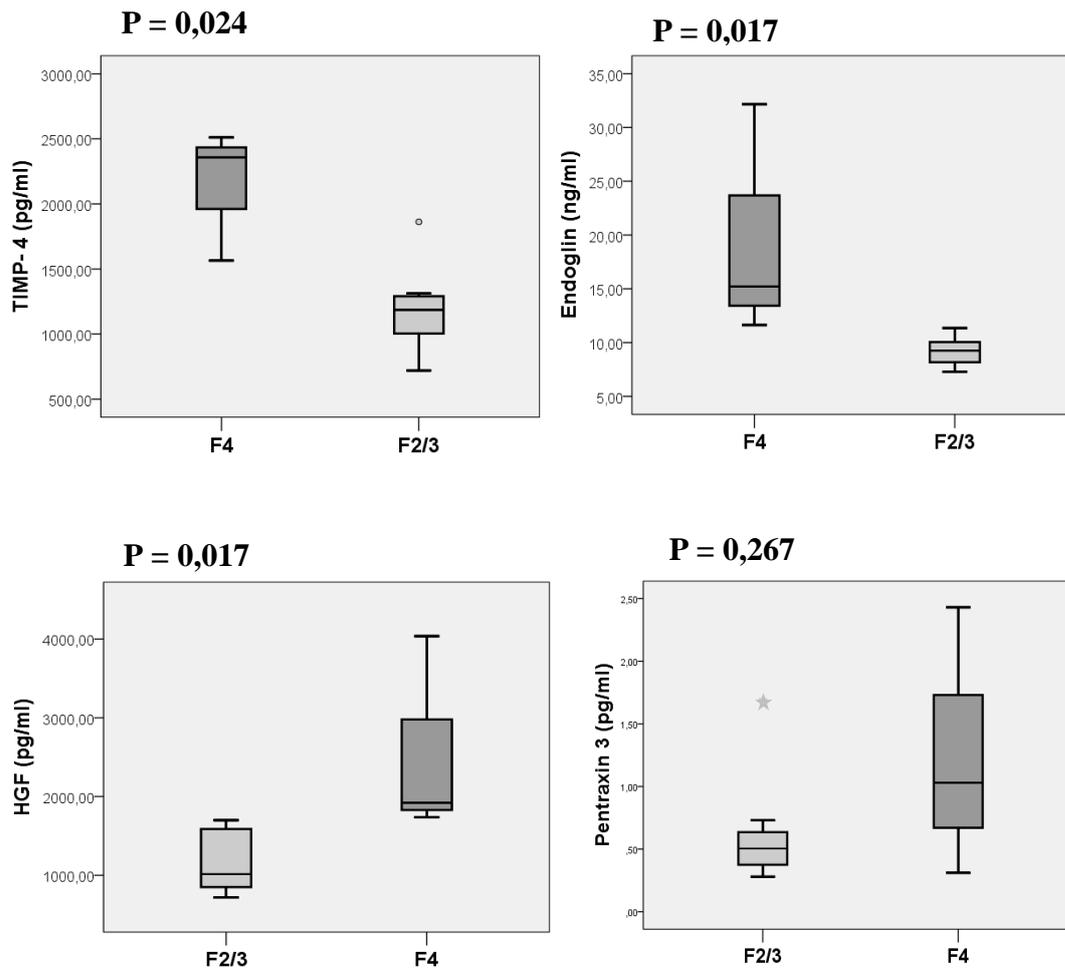


Abbildung 15 Darstellung der Expression von TIMP-4, Endoglin, Pentraxin 3 und HGF im Serum von HCV Patienten mit einer Zirrhose (F4) im Vergleich zu Patienten mit einer mittel- bis hochgradigen Fibrose (F2/3).

### 3.4 Ergebnisse der transienten hepatischen Elastographie (Fibroscan®)

#### 3.4.1 Einsatz der transienten Elastographie bei Mukoviszidosepatienten

Die transiente Elastographie konnte bei allen Patienten dieses Kollektivs durchgeführt werden. Eine Übersicht über die einzelnen Resultate der Messung gibt Abbildung 16.

In der Gruppe der CF Patienten ohne CFLD lag der niedrigste gemessene Wert bei 2,2 kPa und der höchste Wert bei 6,1 kPa. Bei den CFLD Patienten betrug der niedrigste Wert 3,3 kPa und der Maximalwert 75 kPa. Bei 75 kPa handelt es sich um den höchsten Wert, der als Ergebnis bei der Bestimmung der Lebersteifigkeit mit dem zur Verfügung stehenden Gerät möglich ist.

Bei dem Vergleich der Resultate beider Gruppen zeigte sich, dass die Lebersteifigkeit bei den CFLD Patienten signifikant erhöht war im Vergleich zu den CF Patienten ohne CFLD ( $p < 0,001$ ). In der Gruppe der CFLD Patienten betrug der Medianwert 9,95 kPa und in der CF Gruppe ohne CFLD 4,3 kPa.

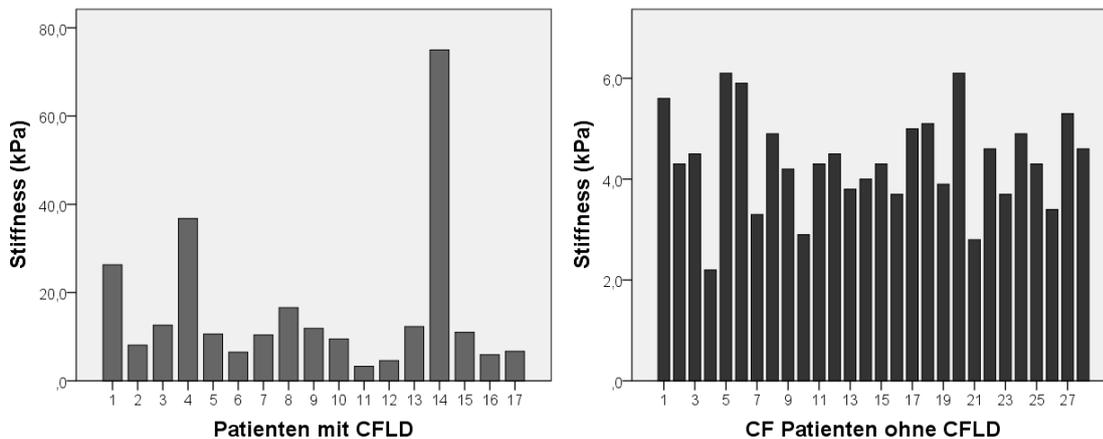


Abbildung 16 Übersicht über die erhobenen Werte der Lebersteifigkeit (Stiffness) bei Patienten mit bzw. ohne CFLD.

Der maximal erhobene Wert liegt bei den Patienten mit CFLD (linke Abbildung) bei 75 kPa und bei den Patienten ohne CFLD (rechte Abbildung) bei 6,1 kPa. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei den Abbildungen eine unterschiedliche Größenordnung der Skalierung gewählt.

Die ROC-Analyse erbrachte für die Lebersteifigkeit eine Area under the curve von 0,906 bei einem 95 % Konfidenzintervall von 0,779 – 1,000 und einem p-Wert  $< 0,001$ . Der optimale Cut-Off-Wert für die Diagnose einer CFLD liegt bei 6,3 kPa.

### 3.4.2 Zusammenhang zwischen Höhe der gemessenen Lebersteifigkeit und den Resultaten eines Sonographiescores zur Beurteilung des Ausmaßes der Leberschädigung bei Mukoviszidosepatienten

Der Score mit Werten zwischen 1 und 5 beschreibt die sonographisch detektierten Veränderungen der Leber und lag bei 44 von 45 Mukoviszidosepatienten vor. Im Folgenden wurden die Patienten je nach Score und somit je nach Vorhandensein bzw. Schwere der Lebererkrankung in zwei Gruppen eingeteilt und bezüglich der Höhe der gemessenen Lebersteifigkeit miteinander verglichen (siehe Abbildung 17). Unter Berücksichtigung der Verteilung der einzelnen Scores innerhalb des Patientenkollektivs (siehe Tabelle 5) handelt es sich bei der Einteilung S1/2 und S3/4/5 zudem um die Einteilung von CF Patienten mit CFLD und CF Patienten ohne CFLD.

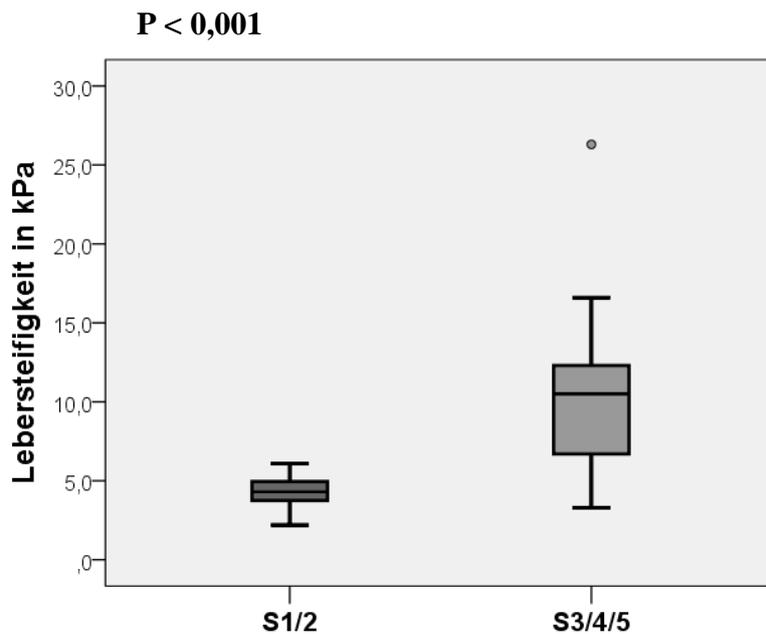


Abbildung 17 Einteilung der Patienten je nach sonographisch detektiertem Score und Vergleich der Höhe der gemessenen Lebersteifigkeit in beiden Gruppen.

Aus Gründen der besseren Betrachtbarkeit wurde auf die Darstellung der zwei Ausreißer (36,8 kPa und 75 kPa) verzichtet.

S1/2: Sonographiescore 1 und 2, S3/4/5: Sonographiescore 3,4 und 5

Es zeigten sich signifikant höhere Werte in der Gruppe von Patienten mit einem Sonographiescore von 3 oder größer im Vergleich zu der Gruppe von Patienten mit einem geringeren Sonographiescore.

### **3.4.3 Zusammenhang zwischen transienter hepatischer Elastographie (Fibroscan ®) und Expression der Serummarker**

Mittels ROC-Analyse wurde ein optimaler Cut-Off-Wert von 6,3 kPa für die Diagnose einer CFLD ermittelt. Im Folgenden wurde überprüft, ob sich die Expression der Serummarker signifikant unterscheidet, wenn die Patienten je nach ermittelter Lebersteifigkeit unter- oder oberhalb des Cut-Off-Wertes in 2 Gruppen eingeteilt werden. Für Endoglin zeigten sich signifikant erhöhte Werte bei den Patienten mit einer Lebersteifigkeit von > 6,3 kPa, die Werte für Pentraxin 3 waren in dieser Gruppe signifikant erniedrigt. Für TIMP-4 zeigten sich tendenziell erhöhte Werte in der Gruppe von Patienten mit einer Lebersteifigkeit > 6,3, allerdings ohne eine statistische Signifikanz. Die Expression von HGF war über beide Gruppen von Patienten gleichverteilt.

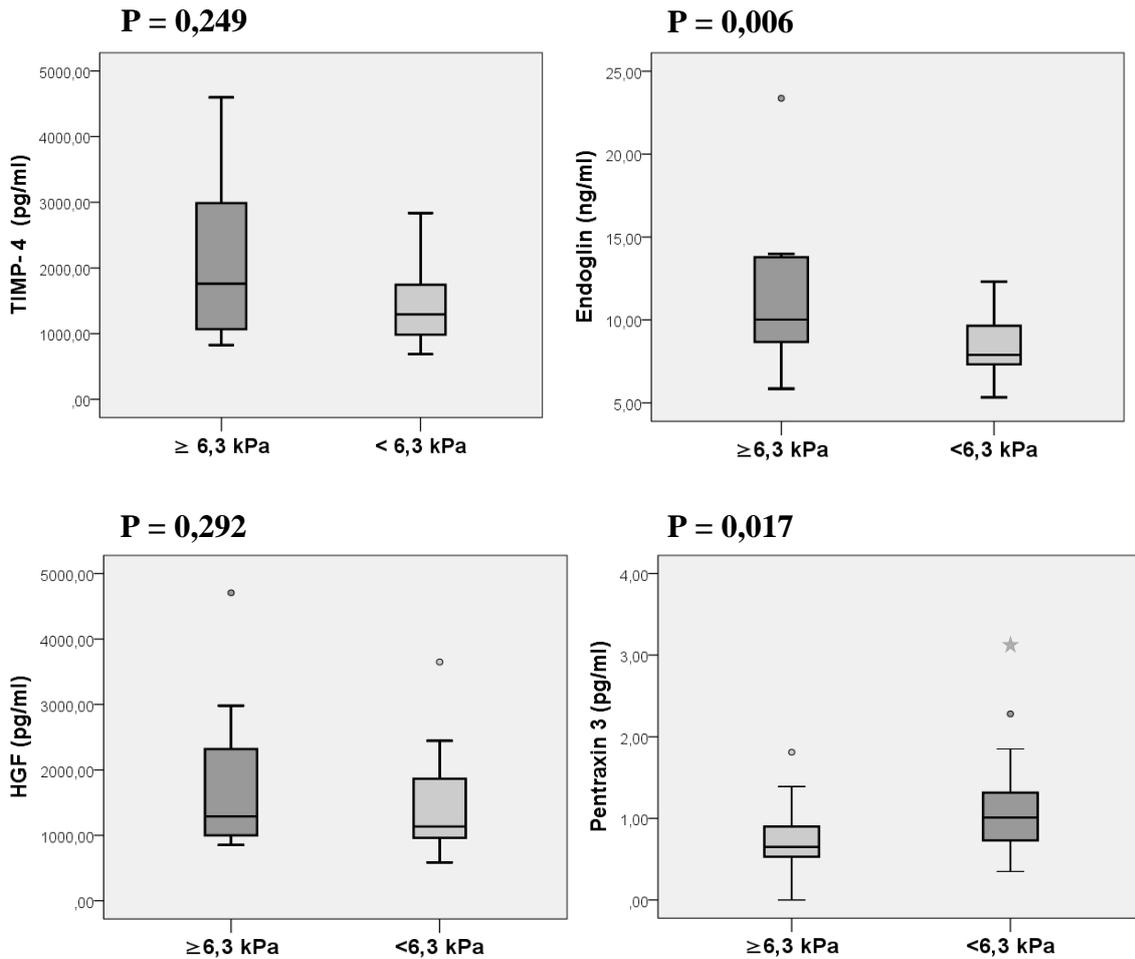


Abbildung 18 Einteilung der CF Patienten je nach Wert der Lebersteifigkeit und Vergleich der beiden Gruppen bezüglich Expression von TIMP-4, Endoglin, HGF und Pentraxin 3.

### 3.5 Diagnostische Performance klinischer Parameter und neuer Marker für die Diagnose einer CFLD

Nachdem mittels ROC Analyse für TIMP-4, Endoglin und die Stiffness ein geeigneter Grenzwert für die Diagnose einer CFLD festgelegt wurde, ist im nächsten Schritt die diagnostische Performance, das heißt Angaben zur Sensitivität und Spezifität sowie dem positiven und negativen Prädiktiven Wert, ermittelt worden. Um die Ergebnisse mit einem klinisch bereits genutzten Marker vergleichen zu können, wurde auch für APRI, dem AST/Thrombozyten-Ratio Index, eine ROC-Analyse durchgeführt. Für die Area under the curve ergab sich für APRI ein Wert von 0,748 bei einem 95 % Konfidenzintervall von 0,584 – 0,912 und einem p-Wert von 0,008. Zieht man die Ergebnisse der ROC-Analyse von der transienten Elastographie, TIMP-4 und Endoglin

hinzu, zeigt sich mit einer AUROC von 0,906 ein höheres Ergebnis für die Transiente Elastographie. Die Ergebnisse für TIMP-4 und Endoglin waren mit einer AUROC von 0,693 und 0,702 nur geringfügig erniedrigt im Vergleich zu APRI.

	Grenzwert	Sensitivität	95 % KI	Spezifität	95 % KI	PPW	95 % KI	NPW	95 % KI
ARPI	0,133	46,7	22,3 - 72,6	96,4	79,8 - 99,8	87,5	46,7 - 99,3	77,1	59,4 - 89
TE	6,3 kPa	82	55,8 - 95,3	100	85 - 100	100	73,2 - 100	90,33	73,1 - 97,5
TIMP-4	1603 pg/ml	64,7	38,6 - 84,7	82,1	62,4 - 93,2	68,8	41,5 - 87,9	79,3	59,7 - 91,3
Endoglin	8,6 ng/ml	70,6	44 - 80,6	71,4	51,1 - 86	60	36,4 - 80	80	58,7 - 92,4

Tabelle 18 Übersicht über die diagnostische Aussagekraft von ARPI, der Transienten Elastographie, TIMP-4 und Endoglin unter Berücksichtigung des jeweils optimalen Grenzwertes für die Diagnose einer CFLD.

TE: Transiente Elastographie, 95 % KI: 95 % Konfidenzintervall, PPW: Positiver Prädiktiver Wert, NPW: Negativer Prädiktiver Wert, APRI: AST/Thrombozyten-Ratio Index

Im Vergleich zu ARPI, Timp-4 und Endoglin weist die transiente Elastographie mit 82 % die höchste Sensitivität und mit 100 % die höchste Spezifität auf. Auch der positive prädiktive Wert und der negative prädiktive Wert sind bei der transienten Elastographie im Vergleich zu ARPI, TIMP-4 und Endoglin mit 100 % und 90,33 % am höchsten.

Die diagnostische Performance bei Kombination von TIMP-4 und Endoglin, TIMP-4 und transiente Elastographie und Endoglin und transiente Elastographie ist in Tabelle 19 dargestellt.

	Grenzwert	Sensitivität	95 % KI	Spezifität	95 % KI	PPW	95 % KI	NPW	95 % KI
TIMP-4 und Endoglin	1603 pg/ml 8,6 ng/ml	88,2	62,3 - 98	53,6	34,2 - 72	53,6	34,2 - 72	88,2	62,3 - 98
TE und Endoglin	6,3 kPa 8,6 ng/ml	88,2	62,3 - 98	71,4	51,1 - 86	65,2	42,8 - 82,8	90,9	69,4 - 98,4
TE und TIMP-4	6,3 kPa 1603 pg/ml	100	77,1 - 100	82,1	62,4 - 93,2	77,3	54,2 - 91,3	100	82,2 - 100

Tabelle 19 Übersicht über die diagnostische Aussagekraft bei Kombination von TIMP-4, Endoglin und der transienten Elastographie unter Berücksichtigung des jeweils optimalen Grenzwertes für die Diagnose einer CFLD.

95 % KI : 95 % Konfidenzintervall, PPW: Positiver Prädiktiver Wert, NPW: Negativer Prädiktiver Wert  
TE: Transiente Elastographie

Die höchsten Werte in allen vier Kategorien, d.h. für Sensitivität, Spezifität, sowie für den positiven und negativem prädiktiven Wert wurden bei Kombination von TIMP-4 und der transienten Elastographie erzielt.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Relevanz der Fragestellung**

Wie bereits aus der Einleitung hervorgeht, ist die CFLD eine Manifestation der Mukoviszidose mit zunehmender Häufigkeit. Immer mehr Patienten erkranken und leiden an den Komplikationen einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie. Die transiente Elastographie wurde bereits in einigen Studien getestet, ist aber noch nicht Gegenstand der aktuellen Leitlinie zur Diagnose einer CFLD. Zudem gibt es noch keinen ubiquitär akzeptierten Cut-Off-Wert anhand dessen die Diagnose CFLD gestellt oder als unwahrscheinlich erachtet werden könnte. Zur Komplementierung der nicht invasiven Diagnostik bietet sich die Bestimmung von Serummarkern an, da dies im Rahmen einer routinemäßigen Blutentnahme erfolgen kann. Bislang gibt es noch keinen Serummarker, der bei Verdacht auf CFLD standardmäßig bestimmt wird.

Gerade bei Kindern muss abgewogen werden, ob eine UDCA Therapie inklusive aller Komplikationen und Risiken mehr Vorteile als Nachteile bietet. Kinder sind generell durch die chronische Erkrankung belastet und müssen zahlreiche Medikamente einnehmen. Es ist wünschenswert, den optimalen Zeitpunkt für einen Therapiebeginn mit UDCA zu finden, um die Kinder nicht durch unnötige oder verfrühte Medikamentengabe zusätzlich zu belasten. Die Therapie sollte aber bereits im Frühstadium begonnen werden um die Progression zu einer manifesten Fibrose zu verhindern. Dieser Punkt hebt noch einmal die Dringlichkeit für eine regelmäßige und im besten Fall nicht invasive Diagnostik zur Überwachung der Patienten hervor, da es für fortgeschrittene Hepatopathien bis dato noch keine etablierten Therapieverfahren gibt.

### **4.2 Beurteilung der identifizierten Serumfibrosemarker**

#### **4.2.1 Endoglin**

Endoglin, auch bekannt unter dem Namen Cluster of Differentiation 105 (CD105), agiert als Korezeptor des Transforming Growth Factors  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Zur Gruppe der TGF- $\beta$ -Familie gehören mehr als 40 Proteine mit vielfachen Funktionen, wie zum Beispiel die Beteiligung an der Regulation der Morphogenese, der Embryonalentwicklung, der Stammzellendifferenzierung, sowie der Immunregulation, Wundheilung und Entzündung. Alle Liganden der TGF- $\beta$ -Familie binden an zwei Rezeptoren: Serin-Treonin Kinase Rezeptor Typ 1 und 2 (TBR 1 und 2). Die Aktivität der Rezeptoren kann unter anderem

durch die Korezeptoren Endoglin und Betaglykan reguliert werden (Santibañez et al. 2011). Endoglin kann die Affinität der Rezeptoren zu den einzelnen Liganden verändern und so in bestimmte intrazelluläre Signalwege eingreifen. Es gibt sowohl Signalwege die inhibiert, also auch welche, die augmentiert werden (Finsson und Philip 2012). Zusätzlich ist Endoglin in der Lage auch ohne Rezeptorbeteiligung bestimmte Liganden der TGF- $\beta$ -Familie zu binden. Veränderungen einzelner Liganden, Rezeptoren oder Signalwege können zu Erkrankungen führen, wie zum Beispiel Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, der Lunge sowie der Muskeln und Knochen (Santibañez et al. 2011). Gut beschrieben ist zudem der Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$  und Fibrose, wobei die Fibrose durch ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau extrazellulärer Matrix gekennzeichnet ist (Verrecchia und Mauviel 2007). TGF- $\beta$  induziert eine Fibrose durch eine direkte Aktivierung hepatischer Sternzellen, Stimulation der Extrazellulärmatrix, und durch Verhinderung des Abbaus der Extrazellulärmatrix durch vermehrte Synthese von Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen. Endoglin wird von aktivierten hepatischen Sternzellen und von portalen sowie septalen Myofibroblasten exprimiert (Clemente et al. 2006). Durch eine vermehrte Expression kann Endoglin die TGF- $\beta$  Signaltransduktionskette zugunsten der profibrinogen Eigenschaften von TGF- $\beta$  verschieben (Meurer et al. 2014). Eine gestörte Regulation von TGF- $\beta$  ist verantwortlich für alle Stadien der Leberfibrose bzw. Zirrhose bis hin zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) (Dooley und Dijke 2012).

Endoglin liegt neben der membrangebundenen Form auch in einer löslichen Form vor, die durch proteolytische Spaltung entstanden und im Serum von Patienten nachweisbar ist (Finsson und Philip 2012). In mehreren Studien ist die Bedeutung von Endoglin als Marker für bestimmte Erkrankungen diskutiert worden. Dazu zählen unter anderem der Progress von Arteriosklerose bei Diabetikern, Systemischer Lupus Erythematoses, Hypertension, Brustkrebs, prämalige Läsionen des Colons und plötzlicher Kindstod (Meurer et al. 2014). Ein Einsatz von Endoglin in der Diagnose einer Mukoviszidose-assoziierten Hepatopathie ist bislang nicht beschrieben worden. Mithilfe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Endoglin vermehrt exprimiert wird bei Patienten mit einer Leberschädigung und zwar unabhängig von der Ätiologie der Lebererkrankung. Desweiteren korreliert die Höhe der gemessenen Werte für Endoglin mit dem Staging bei HCV-Patienten. Diese Ergebnisse decken sich mit der Arbeit von Yagmur et al., in der zusätzlich gezeigt werden konnte, dass erhöhte Serumkonzentrationen von Endoglin ein

erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms anzeigen (Yagmur et al. 2007).

Perspektivisch ergeben sich durch den Nachweis der Beteiligung von Endoglin bei der Entstehung und Progression einer Leberfibrose bzw. Zirrhose neue therapeutische Ansätze. In einem anderen Kontext gibt es bereits eine Phase 1 Arzneimittelstudie, in der die Wirkung und Verträglichkeit von Endoglinantikörpern bei metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom getestet wird (Karzai et al. 2014). Es ist durchaus vorstellbar, dass Endoglin auch ein molekularer Angriffspunkt für die Therapie einer Leberfibrose sein könnte (Finsson und Philip 2012).

#### **4.2.2 TIMP-4**

Mitglieder der Tissue inhibitor of metalloproteinases, die in ihrer Funktion unter anderem als Regulatoren der Matrix metalloproteinases (MMP) agieren, sind im Kontext einer Leberfibrose bereits beschrieben worden. Bei den MMPs handelt es sich um Endopeptidasen, die sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vorhanden sind und eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Extrazellulärmatrix und damit bei der Entstehung bzw. Verhinderung einer manifesten chronischen Fibrose spielen. Zu den Aufgaben gehören die Aufrechterhaltung und Regulation der Extrazellulärmatrix durch Degradation und Umbau. Als weitere Funktionen sind unter anderem eine Beeinflussung von zellulären Aktivitäten wie Proliferation, Zellmigration und Apoptose, sowie Leukozytenaktivierung beschrieben worden. Insgesamt sind 25 verschiedene MMPs bekannt und es gibt sowohl welche mit pro- als auch welche mit antifibrotischen Eigenschaften (Giannandrea und Parks 2014). Am Beispiel der pulmonalen Exazerbation bei Mukoviszidose konnte gezeigt werden, dass einzelne Marker der Extrazellulärmatrix selektiv erhöht sind und somit bestimmte Erkrankungen anzeigen können. So ließen sich beispielsweise MMP-8 und MMP-9 im Serum von Mukoviszidosepatienten mit pulmonaler Exazerbation im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne Anzeichen einer pulmonalen Exazerbation signifikant erhöht nachweisen. Die nachgewiesene Menge an MMP-1, MMP-2 und MMP-13 hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich beider Gruppen. (Rath et al. 2014).

Zur Familie der TIMPs gehören vier Proteine (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4), die zum Teil große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. TIMP-4 ist ein 195 Aminosäuren langes, nicht glykosyliertes Protein, dessen Expression anfangs nur in Herz, Niere,

Plazenta, Kolon und Hoden nachgewiesen werden konnte (Greene et al. 1996). Eine der Hauptaufgaben von TIMP-4 über den N-Terminus des Proteins ist die Inhibition der extrazellulären Aktivität von MMPs. Wie bereits beschrieben, gibt es sowohl pro als auch antifibrotische MMPs, sodass der Effekt von TIMP-4 auf die Extrazellulärmatrix je nach inhibiertem MMP sowohl aufbauend als auch degradierend sein kann. Weitere Funktionen von TIMP-4 werden über den C-Terminus vermittelt und sind unabhängig von der Interaktion mit MMP (Melendez-Zajgla et al. 2008). Diese Funktionen sind besonders in der Krebsforschung untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass TIMPs Einfluss nehmen können auf Angiogenese, Proliferation und Apoptose von Tumorzellen (Chirco et al. 2006). Über die Expression von TIMP-4 in hepatischem Gewebe und über den Einfluss von TIMP-4 auf die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Leberfibrose ist wenig bekannt. In einer Studie am Mausmodell konnte dargestellt werden, dass TIMP-4 bei Mäusen mit einer induzierten biliären Atresie und daraus resultierender Leberfibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war (Nadler et al. 2010). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass TIMP-4 bei Mukoviszidosepatienten mit einer Hepatopathie signifikant höher war im Vergleich zu Patienten ohne Leberbeteiligung. Desweiteren stellte sich heraus, dass die höchsten Werte von TIMP-4 bei HCV-Patienten mit einer manifesten Zirrhose auftraten, sodass in Erwägung gezogen werden kann, dass die Höhe an exprimierten TIMP-4 in Zusammenhang mit dem Schweregrad der Fibrosierung steht. In einer früheren Arbeit wurde bereits deutlich, dass die Expression von TIMP-2 im Serum von Mukoviszidosepatienten mit einer CFLD und begleitender portaler Hypertension signifikant erhöht war im Vergleich zu CFLD Patienten ohne portale Hypertension und zu CF Patienten ohne CFLD (Rath et al. 2012). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch andere Mitglieder der TIMP-Familie mit der Schwere einer Lebererkrankung ansteigen und somit das Ausmaß einer Leberbeteiligung anzeigen können. Bislang ist TIMP-4 noch nicht als potentieller Serummarker für die Diagnose einer Leberfibrose beschrieben worden. Im Rahmen einer Studie bei Patientinnen mit einer Brustkrebserkrankung im Frühstadium zeigte sich, dass signifikant erhöhte Werte von TIMP-4 mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für langfristiges rezidivfreies Überleben assoziiert waren und dass TIMP-4 ein prognostischer Marker und Indikator für eine aggressivere Therapie bei Diagnosestellung sein könnte (Liss et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TIMP-4 in Kombination mit der transienten Elastographie eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 82,1 % aufweist und somit ein gutes Verfahren für die Diagnose einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie darstellt. Aus diesen Gründen sollte der mögliche Einsatz von TIMP-4 als diagnostischer Marker einer Leberfibrose weiter untersucht werden.

#### **4.2.3 Pentraxin 3**

Bei Pentraxin 3 (PTX3) handelt es sich um ein Akut-Phase Protein, das der gleichen Superfamilie wie das C-reaktive Protein (CRP) angehört. Bei beiden Proteinen handelt es sich um wichtige Bestandteile der angeborenen humoralen Immunität. Während CRP, ein Pentraxin mit kurzem Arm, hauptsächlich in der Leber produziert wird, wird das lange Pentraxin, Pentraxin 3, am Ort der Entzündung gebildet. Erstmals beschrieben wurde das Vorkommen von Pentraxin 3 in vaskulären Endothelzellen. Inzwischen ist bekannt, dass es auch von Monozyten, Makrophagen, polymorphonukleären Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen und dendritischen Zellen produziert wird (Larsson et al. 2013). Neben der Produktion von Pentraxin 3 am Ort der Entzündung bzw. Verletzung wird es auch in speziellen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert und bei Bedarf freigesetzt (Jaillon et al. 2007). Der Einsatz von Pentraxin 3 zur Diagnostik einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie ist in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben worden. Eine japanische Arbeitsgruppe untersuchte den klinischen Nutzen einer Bestimmung von Pentraxin 3 bei Patienten mit einer nicht alkoholischen Fettleber (NAFL) und bei Patienten mit einer Fettleberhepatitis (NASH). Es konnte gezeigt werden, dass PTX3 bei Patienten mit einer NASH signifikant erhöht war im Vergleich zu den Patienten mit einer NAFL. Zudem waren die Werte im fortgeschrittenen Stadium der NASH signifikant höher im Vergleich zu früheren Stadien der NASH. Des Weiteren zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der Höhe von PTX3 und den Fibrorestadien der Patienten (Yoneda et al. 2008). In einer anderen Studie wurde Pentraxin 3 im Rahmen eines Tierversuchs bei einem Paracetamol-induziertem Leberschaden untersucht. Hierzu wurden 30 Ratten auf 3 Gruppen aufgeteilt. 10 Tiere dienten als Kontrolle, die beiden anderen Gruppen unterschieden sich durch die Menge an gastral injiziertem Paracetamol, und zwar 1 bzw. 2 g Paracetamol/kg KG (APAP-1 und APAP-2). Es konnte gezeigt werden, dass PTX3 in der Leber von Tieren der APAP-1 Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Zudem war die Menge an PTX3 bei Tieren, die mit 2 g Paracetamol / kg KG behandelt wurden, signifikant erhöht im Vergleich zu Tieren, die mit 1 g Paracetamol /

kg KG behandelt wurden, sodass die Vermutung nahe liegt, dass PTX3 ein Marker für einen akuten Leberschaden darstellt und mit dem Ausmaß der Verletzung korreliert. Ein weiteres Resultat der Studie lag in der Erkenntnis, dass PTX3 auch von Hepatozyten produziert wird (Yaman et al. 2013). Die Auswertung der Proteome Profiler im Rahmen der vorliegenden Arbeit lässt vermuten, dass PTX3 im Serum von Mukoviszidosepatienten mit einer CFLD im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne CFLD vermehrt exprimiert wird. Interessanterweise konnte dieses Ergebnis durch die ELISA-Methode nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen von Yoneda et al. und Yaman et al. konnte gezeigt werden, dass PTX3 im Serum von Mukoviszidosepatienten mit einer Hepatopathie signifikant erniedrigt vorlag im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne CFLD. Dieses Ergebnis weicht damit von den zuvor beschriebenen Beobachtungen ab, dass die Höhe von PTX3 mit dem Ausmaß einer Leberschädigung korreliert und zur Diagnostik einer Hepatopathie herangezogen werden kann. Auch wenn die beschriebenen Studien nicht spezifisch für eine Hepatopathie bei Mukoviszidose waren, so wurde doch in zwei unterschiedlichen Modellen, einmal vor dem Hintergrund einer Steatohepatitis und einmal bei einem akuten Leberschaden durch Paracetamol Intoxikation gezeigt, dass PTX3 signifikant erhöht, und nicht wie in der vorliegenden Arbeit erniedrigt war. Eine Erklärung für das abweichende Resultat unserer Ergebnisse könnte sein, dass PTX3 ein unspezifischer Marker ist, der nicht nur bei einer Hepatopathie erhöht ist. Weitere Erkrankungen, die im Zusammenhang mit PTX3 beschrieben worden sind, sind zum Beispiel: akute und chronische Nierenerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen wie Arteriosklerose und Herzinsuffizienz, Autoimmunerkrankungen, Komplikationen in der Schwangerschaft und auch Sepsis und septischer Schock (Speeckaert et al. 2013). Bei Patienten mit einem Myokardinfarkt stellt der 24 Stunden nach Infarkt gemessene Serumspiegel von PTX 3 einen Prädiktor sowohl für die 30-Tage-Mortalität als auch für die ein-Jahres-Mortalität dar und hilft so, Patienten mit einem erhöhten Risiko zu identifizieren (Tomandlova et al. 2015). In einem Tierversuch mit Mäusen wurde die Rolle von Pentraxin 3 bei einem akuten Lungenversagen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PTX3 in der bronchoalveolären Lavage erhöht war und mit der Schwere des akuten Lungenversagens korreliert. Zusätzlich nahm die Höhe von PTX3 bei erfolgreicher Therapie des Lungenversagens ab, sodass es als potentieller Biomarker für die Detektion und Therapieüberwachung eines akuten Lungenversagens diskutiert wurde (He et al. 2010). Sowohl die Rolle bei systemischer Infektion und Entzündung, als auch der

Zusammenhang mit pulmonaler Dysfunktion könnten eine Erklärung für die hier gewonnenen Ergebnisse liefern, die sich von anderen Studien in der Bedeutung von PTX3 bei Leberschädigung unterscheiden.

#### **4.2.4 Hepatocyte Growth Factor**

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) stellt einen Wachstumsfaktor dar, der erstmals in Zusammenhang mit einer Leberregeneration nach partieller Hepatektomie beschrieben worden ist. HGF wird vorrangig von mesenchymalen Zellen sezerniert und verbleibt als inaktive Form bis zur Aktivierung durch posttranslationale Konversion in der Extrazellulärmatrix. Eine besondere Bedeutung kommt HGF bei der Embryogenese und Organentwicklung zu (Molnarfi et al. 2014). Aber auch in adultem Gewebe beeinflusst HGF die Zellproliferation, Migration und dreidimensionale Morphogenese und führt so zu Erholung und Reorganisation von Gewebe nach Verletzungen. Inzwischen ist bekannt, dass HGF nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Organen, wie zum Beispiel Niere, Lunge, Nervensystem, Gastrointestinaltrakt und dem kardiovaskulären System protektive und regenerative Effekte ausübt. Vermittelt wird die Aktivität von HGF über den c-Met-Rezeptor, der intrazellulär an eine Tyrosinkinase gekoppelt ist (Nakamura et al. 2011). In einem Tierversuch wurde der Einfluss von HGF auf Ratten mit einer durch Dimethylnitrosamin induzierten Leberzirrhose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HGF die Apoptose von Hepatozyten supprimiert, die Apoptose von Actin-positiven Myofibroblasten fördert und so zur Auflösung der Zirrhose beiträgt (Kim et al. 2005). HGF übt somit vornehmlich einen regulatorischen und protektiven Effekt auf die Leber aus. Anhand eines Kollektivs von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C konnte gezeigt werden, dass HGF bei Patienten mit einer Zirrhose signifikant erhöht ist im Vergleich zu Patienten ohne bzw. mit einer milden Leberfibrose (Andersen et al. 2011). Dieses Ergebnis deckt sich mit einer weiteren Arbeit, in der ebenfalls gezeigt wurde, dass HGF bei einer Zirrhose vermehrt exprimiert wird und einen potentiellen Biomarker darstellt (Costantini et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten mit der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Zwar war das Ergebnis der Proteome Profiler Analyse in Bezug auf HGF vielversprechend und in der ELISA Messung zeigte sich, dass HGF im Serum von Mukoviszidosepatienten mit einer Hepatopathie im Vergleich zu Patienten ohne Hepatopathie erhöht war, aber diese Werte zeigten keine statistische Signifikanz. Ein Grund hierfür könnten die bereits beschriebenen vielfältigen Funktionen von HGF in

unterschiedlichen Geweben sein, die eine genaue Zuordnung zu einem bestimmten Gewebetyp erschweren.

Neben den physiologischen Funktionen sind HGF und der zugehörige Rezeptor auch in Invasion und Metastasierung von Tumorgewebe unterschiedlichen Ursprungs involviert (Nakamura et al. 2011) und ein erhöhter Nachweis von HGF wird als Hinweis auf die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms bei Patienten mit einer Leberzirrhose diskutiert (Costantini et al. 2013). Ein vermehrtes Augenmerk wurde in den letzten Jahren auf den potentiellen therapeutischen Nutzen einer Therapie mit HGF gerichtet. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass mesenchymale Stammzellen einen positiven Effekt auf die Reduktion einer Fibrose ausüben, wurde in einer Studie anhand von Ratten mit einer durch Dimethylnitrosamin induzierten Zirrhose untersucht, wie sich eine vermehrte Expression von HGF durch genetisch veränderte mesenchymale Stammzellen auf eine manifeste Zirrhose auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass eine noch stärkere Reduktion der Fibrose als bei einer alleinigen Therapie mit mesenchymalen Stammzellen erreicht wurde, und dass sich die Leberfunktion verbesserte, sodass von einer Erholung der Leber ausgegangen werden kann (Kim et al. 2014). Die neuen therapeutischen Ansätze von HGF im Rahmen von Tierversuchen sind vielversprechend und es wäre wünschenswert, dass sich diese Erkenntnisse bald auch auf eine Therapie an Menschen übertragen lassen. Dieser Ausblick bietet Hoffnung für Patienten, da eine Zirrhose oder schwere Fibrose bis dato nicht therapierbar sind.

#### **4.3 Bewertung der transienten Elastographie zur nicht invasiven Diagnostik der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose**

Das technische Prinzip der transienten Elastographie wurde ursprünglich in der Käseindustrie zur Bestimmung des Reifestadiums von Käseleibern eingesetzt (Benedito et al. 2000). Inzwischen wird die Fibroscanuntersuchung an 47 Standorten in Deutschland angeboten (Stand 08/2014, Hämatochromatose Vereinigung Deutschland e.V.). Eine der ersten Studien, die sich mit der Aussagekraft der Fibroscanuntersuchung in Korrelation zu Leberbiopsien bei Patienten mit einer chronischen Hepatopathie beschäftigte, stammt aus dem Jahr 2003 (Sandrin et al. 2003). Seitdem folgten viele weitere Studien, und die transiente Elastographie ist bei unterschiedlichen chronischen Erkrankungen der Leber, wie zum Beispiel Hepatitis B und C sowie bei der nicht alkoholischen Fettlebererkrankung untersucht worden. Je nach Ätiologie ergeben sich unterschiedliche

Cut-Off-Werte der Lebersteifigkeit zur Diagnose einer Leberfibrose bzw. Zirrhose und für die Stadieneinteilung (Wilder und Patel 2014). Bei lebergesunden Probanden beträgt die Stiffness im median 4 kPa (Alsebaey et al. 2015). Eine Studie aus dem Jahr 2013, die vom Ablauf der Untersuchung und den diagnostischen Kriterien einer CFLD mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist, beschäftigte sich mit dem Nutzen der transienten Elastographie bei der nicht invasiven Evaluation der CFLD. Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lebersteifigkeit bei Patienten mit einer CFLD signifikant erhöht war im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne CFLD. Der in der Studie ermittelte Cut-Off-Wert für die Diagnose einer Leberbeteiligung lag bei 6,8 kPa und ist vergleichbar mit dem in dieser Arbeit ermitteltem Wert von 6,3 kPa. Als weiteres Ergebnis konnte gezeigt werden, dass eine Kombination der Fibroscanuntersuchung mit Fibrosemarkern wie zum Beispiel dem Forns Test (basierend auf Alter,  $\gamma$ GT, Cholesterin und Thrombozytenzahl) keine Verbesserung bezüglich der Aussagekraft der Fibroscanuntersuchung erbrachte (Kitson et al. 2013). Interessanterweise konnte jedoch mithilfe der vorliegenden Daten errechnet werden, dass die diagnostische Aussagekraft der transienten Elastographie in Kombination mit Serummarkern ansteigt. Bei einer alleinigen Bestimmung der Lebersteifigkeit lag die Sensitivität bei 82 %, in Kombination mit TIMP-4 oder Endoglin vergrößerte sich die Sensitivität auf 100 % bzw. 88 %. Es erscheint somit sinnvoll, die Kontrolle dieser Serummarker mit der transienten Elastographie zu verbinden. Für die Diagnostik einer Leberfibrose bei viralen Hepatitiden ist die Kombination aus Bildgebung und serologischem Marker bereits ein gut untersuchtes Diagnostikum (Castera 2012).

Wie eingangs beschrieben, handelt es sich bei der Fibroscanuntersuchung um ein nicht invasives Verfahren, mit den Vorteilen schnell und einfach durchführbar und reproduzierbar zu sein. Der Fibroscan kann nicht nur zur Diagnostik einer Lebererkrankung aber auch zum Therapiemonitoring und zur Prognoseeinschätzung eingesetzt werden (Walker et al. 2015). Es gibt allerdings auch Limitationen der Untersuchung. Bei Patienten mit Aszites oder Adipositas liefert die Messung keine verlässlichen Ergebnisse. In Puncto Adipositas gibt es mittlerweile eine XL-Sonde, die auch für Patienten mit einem Hautkapselabstand  $> 2,5$  cm geeignet ist. Allerdings muss diese XL-Sonde erst in Studien validiert werden (Wilder und Patel 2014). Es ist anzumerken, dass gerade pädiatrische Mukoviszidosepatienten gemessen an gesunden Kontrollprobanden ein signifikant niedrigeres Gewicht aufweisen (Umlawska et al. 2014) und Adipositas als Limitation somit in den meisten Fällen vernachlässigt werden kann.

Bei akuter Inflammation und temporärer Erhöhung der Alanin-Aminotransferasen kann der ermittelte Wert der Lebersteifigkeit fälschlicherweise erhöht sein und zu einer fehlerhaften Interpretation der Messergebnisse führen (Tapper et al. 2012), sodass Kontrolluntersuchungen und Kontrollen der Laborparameter unerlässlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer ausgeprägten Steatosis der Leber die ermittelten Werte falsch niedrig sein können und somit auch das Fibroestadium zu niedrig angegeben wird (Wilder und Patel 2014). Dies könnte bei Mukoviszidosepatienten relevant sein, bei denen in ca. 45 % steatotische Veränderungen der Leber gefunden werden (Menten et al. 2010). Bei diesen Patienten sind die begleitende Sonographie und ggf. auch eine Biopsie der Leber besonders wichtig, um eine Steatosis zu diagnostizieren und bei der Interpretation der Fibroscanergebnisse zu berücksichtigen.

Weitere Einsatzmöglichkeiten der Fibroscanuntersuchung liegen in der Diagnose bzw. dem Ausschluss von portaler Hypertension und Ösophagusvarizen (Kitson et al. 2013). Die Kosten für die Fibroscan-Untersuchung müssen außerhalb von Studien in der Regel vom Patienten selbst getragen werden, die gesetzlichen Krankenkassen übernehmen die Kosten bisher noch nicht generell. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass die Fibroscanuntersuchung bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C ein kosteneffektives Verfahren zur Überwachung einer Fibrose darstellt (Canavan et al. 2013).

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um festzustellen, ob es sich bei der Fibroscanuntersuchung im Rahmen eines Screenings auf CFLD um ein kosteneffektives Verfahren handelt und ob ggf. eine Aufnahme in den Katalog der kassenärztlichen Leistungen denkbar ist. Damit könnte allen Mukoviszidosepatienten diese nichtinvasive nebenwirkungsfreie Möglichkeit der Diagnostik angeboten werden.

#### **4.4 Vergleich der transienten hepatischen Elastographie (Fibroscan ®) mit weiteren diagnostischen Methoden zur Bestimmung der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose**

##### **4.4.1 Leberpunktion**

Mithilfe eine Leberbiopsie kann hepatisches Gewebe entnommen und anschließend histologisch untersucht werden. Es stehen verschiedene Techniken für die Gewebeentnahme zur Verfügung, die sich hinsichtlich Indikation und Komplikationsrate unterscheiden. Als Standard hat sich die sonographisch gesteuerte perkutane

Leberbiopsie etabliert, die schnell und kostengünstig durchzuführen ist. Mögliche Komplikationen sind postoperative Blutungen und Austreten von Gallenflüssigkeit in die Bauchhöhle. Verletzungen anderer Organe wie Lunge und Niere sind seltene, aber neben der Mortalität, die in 0,1 % der Fälle auftritt, gefürchtete Komplikationen. Weitere Techniken sind die laparoskopisch durchgeführte Biopsie sowie die transjuguläre Biopsie (Tannapfel et al. 2012). Obwohl die Leberpunktion generell Goldstandard zur Diagnose einer Hepatopathie ist, wird Sie bei Mukoviszidosepatienten nur selten durchgeführt und ist kein etabliertes Diagnostikum (Behrens et al. 2013). Ein Grund dafür ist, dass es sich bei der Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie pathognomonisch um eine fokal billiäre Zirrhose handelt, mit dem Stanzzyylinder aber nur 1/50.000 des Lebervolumens untersucht werden kann (Cholongitas et al. 2006). Im Vergleich dazu ist das untersuchte Lebervolumen bei der Fibroscanuntersuchung ca. 100 mal größer als bei einer Biopsie (Ziol et al. 2005).

In einer Studie mit 40 Mukoviszidosepatienten wurde die Diagnostik und Vorhersagekraft für die Entwicklung einer CFLD mittels klinischer Zeichen, Messung der Transaminasen und Sonographie mit den Ergebnissen einer Leberbiopsie über einen Zeitraum von 12 Jahren verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die klinische Untersuchung, sowie die Höhe von ALT und das Ergebnis einer sonographischen Untersuchung der Leber vor allem geeignet sind, um Patienten mit einer fortgeschrittenen CFLD zu diagnostizieren. Eine Vorhersage über das Auftreten einer Leberfibrose oder die Entwicklung einer portalen Hypertension ist mit den genannten Parametern allerdings nicht möglich. Die Leberbiopsie, zur Vermeidung von Stichprobenfehlern als „dual pass“ Biopsie durchgeführt, ist hingegen in der Lage, die Entwicklung einer manifesten CFLD mit begleitender portaler Hypertension vorherzusagen. Nach Meinung der Autoren sollte die Leberbiopsie eine größere Anwendung, ggf. auch in Kombination mit nicht invasiver Bildgebung und der Bestimmung von Serummarkern, bei der Betreuung von Patienten mit einer potentiellen Leberbeteiligung erfahren (Lewindon et al. 2011).

Da bei dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit keine Leberbiopsien durchgeführt wurden, kann nicht auf Vergleichbarkeit und Übereinstimmung hinsichtlich der transienten Elastographie untersucht werden. Grundsätzlich gilt: bei der Leberbiopsie handelt es sich um ein invasives Verfahren, welches mit einem Risiko von Komplikationen sowie Probeentnahmefehlern behaftet ist (Dezsófi und Knisely 2014). Zudem ist das Ergebnis, im Gegensatz zu der Fibroscanuntersuchung, nicht unmittelbar verfügbar und bedarf einer weiteren Auswertung durch einen Pathologen. Sind

Folgeuntersuchungen nötig, wie bei der Verlaufsbeurteilung einer Mukoviszidose-assoziierten Hepatopathie empfohlen (Debray 2012), wäre jedes Mal ein invasiver Eingriff durchzuführen.

Die Fibroscanuntersuchung hat, wie bereits dargestellt, den Vorteil, dass sie nicht invasiv sowie gut zu reproduzieren ist (Bonder und Afdhal 2014). Zudem ist es durch die Einführung der S-Sonde, welche speziell für Kinder mit einem Thoraxdurchmesser < 75 cm entwickelt wurde, auch möglich, die Untersuchung jüngeren Kindern anzubieten (Goldschmidt et al. 2013). Da mithilfe der Fibroscanuntersuchung allerdings keine Aussage über die Ätiologie einer Lebererkrankung getroffen werden kann, muss in unklaren Fällen weiterhin eine Biopsie durchgeführt werden.

#### **4.4.2 Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)**

Die Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Methode stellt ein neueres Verfahren zur Bestimmung der Leberelastizität dar. Das Prinzip beruht ebenfalls auf der Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Schwerwellen. Allerdings kommt es hier nicht wie bei der transienten Elastographie zu einer mechanischen Kompression des Gewebes durch Vibration, sondern zu einer akustischen Generierung und Ausbreitung des Signals. Auch hier handelt es sich um eine eindimensionale Elastizitätsmessung, allerdings mit dem Unterschied, dass die Positionierung, anders als bei der Fibroscanuntersuchung, frei über ein zweidimensionales B-Bild erfolgen kann. Das Ergebnis wird in m/s angegeben und ist nach wenigen Sekunden verfügbar. Die Technik zur Generierung des akustischen Signals und zur Bestimmung der Schwerwellengeschwindigkeit ist im Abdomenschallkopf des Ultraschallgeräts vorhanden, sodass kein weiteres Gerät zur Bestimmung der Lebersteifigkeit vonnöten ist (Fruhling und Trillaud 2013).

In einer großen Studie aus dem Jahr 2013 mit 321 Patienten erfolgte ein Vergleich der ARFI Methode sowohl mit der M als auch mit der XL-Sonde des Fibroscans. Auch wenn es sich hierbei nicht um eine Studie speziell bei Mukoviszidosepatienten handelte, können dennoch einige generelle Aussagen getroffen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die M-Sonde des Fibroscans und die ARFI-Methode bei der Diagnose einer schweren Fibrose und einer Zirrhose nicht signifikant unterscheiden. Bei der Diagnose einer moderaten Fibrose erbrachte die M-Sonde hingegen bessere Ergebnisse. Bei einem Vergleich der ARFI-Methode mit der XL-Sonde gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Diagnose einer milden oder schweren Fibrose oder einer Zirrhose. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die diagnostische Aussagekraft der ARFI-Methode steigt,

wenn Sie bei normalgewichtigen Patienten angewandt wird, daher kann sie besonders bei nicht-übergewichtigen Patienten zur Diagnose einer Leberfibrose herangezogen werden (Cassinotto et al. 2013).

In einer der ersten Studien, die sich mit der ARFI-Messung bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten beschäftigte, konnte gezeigt werden, dass die Resultate der ARFI Messung in m/s mit der Höhe der durch Leberultraschallsonographie ermittelten Ultraschallscores und somit mit der Schwere der Leberbeteiligung ansteigen. Des Weiteren wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt, bestehend aus CF Patienten ohne CFLD, CFLD Patienten, sowie CFLD Patienten mit portaler Hypertension und CFLD Patienten mit Ösophagusvarizen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe der ARFI Resultate beim Vergleich dieser vier Gruppen. Die Autoren folgerten daraus, dass es sinnvoll sein könne, die ARFI-Untersuchung allen Patienten anzubieten und bei Überschreitung des Grenzwertes eine endoskopische Untersuchung zur Abklärung von Ösophagusvarizen anzuschließen (Manco et al. 2012). In einer weiteren Arbeit über pädiatrische Patienten sah man die Stärke der ARFI-Untersuchung vor allem in der Frühdiagnostik einer Hepatopathie, da dort durch leicht erhöhte ARFI-Werte bei noch normalem oder nur diskret verändertem B-Bild der konventionellen Sonographie nützliche Zusatzinformationen gewonnen werden können (Behrens et al. 2013).

Ein Vorteil der ARFI-Messung liegt in der Tatsache begründet, dass nicht nur der rechte Leberlappen, wie bei der Fibroscanuntersuchung, sondern auch der linke Leberlappen und zusätzlich auch andere Organe, wie zum Beispiel das Pankreas untersucht werden können (Friedrich-Rust et al. 2013a). Die Frage, ob es bei der Diagnose einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie einen Vorteil bringt, auch den linken Leberlappen in die Messung miteinzubeziehen, wird momentan diskutiert (Karlas et al. 2012). Tatsache ist, dass die Messungen des linken Leberlappens durch die Atemexkursionen des Diaphragmas und durch den Herzschlag erschwert werden (Manco et al. 2012).

Noch liegt kein einheitlicher Grenzwert zur Diagnose einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie mittels ARFI vor. Zwar gab eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2013 als mittleren optimalen Cut-Off-Wert für die Diagnose einer signifikanten Fibrose einen Wert von 1,31 m/s und für die Diagnose einer Zirrhose einen Wert von 1,8 m/s an (Bota et al. 2013), aber diese Werte sind nicht auf Mukoviszidosepatienten bezogen. Wie bei der transienten Elastographie scheint es auch bei der ARFI-Messung Ätiologie spezifische Grenzwerte zu geben und der Grenzwert bei Mukoviszidosepatienten scheint

tendenziell niedriger zu sein als bei anderen chronischen Hepatopathien (Karlas et al. 2012).

Die Tatsache, dass die CFLD pathognomonisch eine fokal biliäre Zirrhose zeigt, kann auf der einen Seite zu einer Überschätzung der Anzahl von Patienten mit CFLD führen, wenn mittels ARFI-Methode gezielt die Elastizität in der Läsion gemessen und nicht die gesamte Leber berücksichtigt wird. Auf der anderen Seite kann es zu einer Unterschätzung der Diagnose CFLD kommen, wenn aufgrund des fokalen Charakters der Läsion bei der transienten Elastographie nur weniger betroffenes Lebergewebe untersucht wird (Friedrich-Rust et al. 2013b).

Die transiente Elastographie ist ein mittlerweile gut validiertes Verfahren, welches zunehmend zur Diagnose einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie zum Einsatz kommt. Um abschließend beurteilen zu können, ob die ARFI-Untersuchung eine Alternative darstellen kann, muss diese Methode zunächst in Studien genauer untersucht und mit histopathologischen Befunden der Leber verglichen werden. Der Vorteil, an gezielten Stellen der Leber die Elastizität messen zu können, und die Tatsache, dass sowohl der linke Leberappen als auch andere Organe, wie zum Beispiel das Pankreas untersucht werden können, sind sehr interessant und stellen Stärken gegenüber der transienten Elastographie dar. Es ist durchaus vorstellbar, dass die ARFI-Messung neben der transienten Elastographie eine sinnvolle Ergänzung der nicht invasiven Diagnostik einer Mukoviszidose assoziierten Hepatopathie sein kann.

#### **4.4.3 Abdomensonographie**

Bei der Abdomensonographie handelt es sich um ein kostengünstiges, weit verbreitetes, nicht invasives Verfahren, das gerade bei Kindern den Vorteil bietet, dass keine Sedierung zur Durchführung der Untersuchung notwendig ist (Mueller-Abt et al. 2008). Zur Beschreibung von Veränderungen der Leber und zur Festlegung, ob eine Mukoviszidose assoziierte Hepatopathie vorliegt, stehen verschiedene Scores zur Verfügung. Bei dem Williams-Score werden das Leberparenchym, die Begrenzung und das Ausmaß der periportalen Fibrose beurteilt und mit Punkten zwischen 1 und 3 bewertet, wobei 3 Punkte dem am Meisten ausgeprägten Befund entsprechen. Anhand der Scores kann eine Zirrhose bei 8-9 Punkten und eine weniger fortgeschrittene Leberbeteiligung bei 4-7 Punkten diagnostiziert werden (Williams, Simon G. J. et al. 1995). Eine weitere Klassifizierung, die auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, teilt die Ergebnisse der Leberensonographie in einen Score von 1 bis 5 ein. Ein Score von 1

beschreibt eine normale Leber, bei 2 liegt eine homogene Hyperechogenität vor und bei einem Score von 3 handelt es sich um eine heterogene Hyperechogenität. Ein Score von 4 beschreibt eine noduläre Veränderung der Leber und bei 5 zeigen sich neben einer heterogenen Hyperechogenität (Score 3) oder einer nodulären Veränderung (Score 4) noch Zeichen für eine portale Hypertension. Dazu zählen Aszites, verlangsamter oder umgekehrter portalvenöser Fluss oder Splenomegalie (Menten et al. 2010). In einer anderen Studie wurden die Patienten entsprechend der Schwere der hepatischen Veränderung in 3 Gruppen eingeteilt: normales, intermediäres und zirrhotisches Bild der Leber (Mueller-Abt et al. 2008). Die Aufzählung der unterschiedlichen Scores zur Evaluation und Diagnose einer CFLD macht deutlich, dass noch kein Konsens gefunden wurde, mit welchem Score oder welcher Beschreibung eine Hepatopathie am besten klassifiziert werden kann. Zwar ist jeder Score für sich gesehen schlüssig, aber das Vorhandensein mehrerer Scores erschwert den Vergleich unterschiedlicher Studien miteinander. Die transiente Elastographie hat den klaren Vorteil, dass das Ergebnis in kPa für alle Zentren nachvollziehbar, reproduzierbar und vergleichbar ist. Wechselt der Patient in ein anderes Zentrum können frühere Werte herangezogen und für die Verlaufsbeurteilung der Hepatopathie genutzt werden. Anhand einer Studie mit 30 pädiatrischen Patienten, bei denen sowohl eine Biopsie als auch eine Sonographie durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Sonographie keinen verlässlichen Marker für die Frühdetektion einer Hepatopathie darstellt, wohl aber bei ausgeprägten Veränderungen der Leber ein guter Prädiktor für eine fortgeschrittene Fibrose oder Zirrhose ist (Mueller-Abt et al. 2008). Interessanterweise wurde in einer anderen Studie hervorgehoben, dass sich die Sonographie als ein guter Marker für die frühe Leberbeteiligung und auch für die Progression der Lebererkrankung erweist. Der Nachteil einer sonographischen Untersuchung liegt hier nicht in der Frühdetektion, sondern vielmehr in der Tatsache begründet, dass die Sonographie untersucherabhängig ist und eine gewisse Erfahrung voraussetzt. Ein weiteres Problem der sonographischen Beurteilung der Leber liegt in der Überschätzung einer CFLD, da hepatische Veränderungen auch durch Infektion und Malnutrition bedingt sein können (Nash et al. 2008). Bei einem Vergleich von Sonographie und Fibroscan zeigte sich eine konstante Beziehung zwischen diesen beiden Messmethoden, auch wenn es vereinzelt Abweichungen in den Patientengruppen gab (Menten et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit ergaben sich signifikant höhere Werte der Lebersteifigkeit bei Patienten mit einem Score von 3 oder größer im Vergleich zu Patienten mit einem geringeren Score. In einer

anderen Studie wurde hervorgehoben, dass die Sonographie ein wichtiger Parameter für die frühe Diagnostik einer Hepatopathie ist, oftmals aber keine Differenzierung zwischen unspezifischer Steatosis und einer Fibrosierung erlaubt (Behrens et al. 2013).

Ein nicht unwesentlicher Punkt liegt in den Anschaffungskosten. Ein Ultraschallgerät mit einem Schalkopf ohne Dopplerfunktion liegt je nach Qualität bei ca. 15.000 €, wohingegen der Fibroscan ca. 70.000 € kostet (Witters et al. 2009). Während mit einem Ultraschallgerät neben der Leber natürlich auch andere abdominelle Organe und bei entsprechender Schallkopfausstattung auch die Schilddrüse sowie Gefäße untersucht werden können, ist der Fibroscan nur für die Bestimmung der Lebersteifigkeit geeignet. Ein Fibroscan wird demnach nur ein zusätzliches Diagnostikum sein und kann das Ultraschallgerät in seiner Gesamtheit nicht ersetzen.

#### **4.5 Vergleich der Serumfibresemarker bei HCV-Patienten mit den Ergebnissen bei Mukoviszidosepatienten**

Das Hauptkollektiv der vorliegenden Studie stellten Patienten dar, die aufgrund ihrer Erkrankung an die pädiatrische oder adulte Mukoviszidoseambulanz angegliedert waren. Da von diesen Patienten keine Leberbiopsien vorhanden waren, diente ein Kollektiv von Patienten mit einer nachgewiesenen chronischen Hepatitis C als Kontrolle.

2014 lag die weltweite Prävalenz der HCV-Infektion laut WHO bei 130 – 150 Millionen Menschen. 15 – 30 % der Patienten mit einer chronischen Hepatitis C entwickeln innerhalb von 20 Jahren eine Leberzirrhose und 350.000 – 500.000 Patienten sterben weltweit jährlich an den Folgen einer HCV-assoziierten Hepatopathie (WHO Fact sheet N°164, aktualisiert April 2014).

Von den Patienten mit einer chronischen Hepatitis C-Infektion, die in die Studie eingeschlossen wurden, lagen sowohl eine Biopsie und somit eine Einteilung des Fibrosegrades, als auch Blutproben vor. Anhand des Kontrollkollektives konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung von TIMP-4 und Endoglin bei Mukoviszidosepatienten auf die Lebererkrankung zurückzuführen ist. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe der Serummarker mit dem Ausmaß der Leberbeteiligung korreliert. Die höchsten Werte fanden sich bei Patienten mit einer manifesten Zirrhose im Vergleich zu Patienten mit einer Fibrose.

Die Überwachung von Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung ist essentiell, da fortgeschrittene Fibrorestadien mit Komplikationen, Hepatozellulärem Karzinom und

Tod assoziiert sind. Die Identifikation von Patienten mit einer progressiven Fibrose erlaubt den Beginn einer Behandlung und geht in die Entscheidung über eine Lebertransplantation ein. Auch bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Erkrankung gilt als momentaner Standard die Leberbiopsie, aber aufgrund der bereits beschriebenen Komplikationen und Risiken werden vermehrt nicht-invasive Methoden bevorzugt (Vergniol et al. 2014). Der Bedarf an Biopsien ist in der Folge durch den Einsatz nicht-invasiver Methoden signifikant gesunken (Castera 2015). Zum Ausschluss einer Zirrhose scheint die Kombination von Serummarkern und einem radiologischen Verfahren wie transiente Elastographie oder ARFI gut geeignet zu sein (Patel und Shackel 2014). Endoglin ist im Zusammenhang mit einer chronischen Hepatitis C Infektion bereits beschrieben worden. In einer Studie wurden Hepatitis C Patienten mit einem lebergesunden Kontrollkollektiv verglichen. Im Einklang zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Endoglin bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Fibrose signifikant erhöht war im Vergleich zu den Ergebnissen bei Patienten mit einer milden Fibrose bzw. der lebergesunden Kontrolle (Clemente et al. 2006).

Neben Endoglin war in der vorliegenden Arbeit auch TIMP-4 signifikant erhöht bei HCV-Patienten mit einer Leberzirrhose. Über TIMP-4 im Zusammenhang mit einer Hepatopathie bei HCV Patienten ist in der Literatur bislang noch nicht berichtet worden. Es gibt allerdings Studien, die TIMP-1, ein weiteres Mitglied der TIMP-Superfamilie, im Kontext einer chronischen HCV-Infektion untersucht haben (El-Kamary et al. 2013). Die Kombination aus Hyaluronsäure, TIMP-1 und Aminoterminalem Propeptid von Prokollagen des Typs III, auch bekannt als ELF-Test (Enhanced Liver Fibrosis), ist mittlerweile gut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mittels ELF-Test sowohl eine Fibrose als auch eine Zirrhose diagnostiziert werden können (Catanzaro et al. 2013).

Als weiterer Parameter wurde in unserer Arbeit HGF quantifiziert. Für das Kollektiv von Mukoviszidosepatienten galt: zwar waren die Werte bei Mukoviszidosepatienten mit einer Hepatopathie im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, aber es zeigte sich keine statistische Relevanz. Ein ähnliches Ergebnis für HCV-Patienten wurde in einer polnischen Studie erzielt. Der Vergleich des Serums von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion und einer gesunden Kontrolle erbrachte keinen signifikanten Unterschied (Glowacki et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression von HGF im Vergleich von HCV-Patienten mit einer Zirrhose zu HCV-Patienten mit einer moderaten bzw. schweren Leberfibrose. In einer anderen Studie wurde unter anderem die Expression von HGF im

Serum von Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion, von Patienten mit einer HCV-induzierten Zirrhose und von Patienten mit einem Hepatozellulären Karzinom bei HCV-Infektion untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von HGF im Serum von Patienten mit einer Zirrhose signifikant erhöht war im Vergleich zu Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion ohne manifeste Zirrhose und zu einer gesunden Kontrollgruppe (Costantini et al. 2013).

Pentraxin 3 ist zwar in der Pathogenese einer Hepatitis-C Infektion, nicht aber als Marker beschrieben worden. (Tarr et al. 2012)

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass YKL-40, ein an Gewebeumbau und Degradation von Extrazellulärmatrix beteiligtes Glykoprotein, im Serum von Mukoviszidosepatienten mit einer Hepatopathie im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne Hepatopathie signifikant erhöht nachweisbar ist. Die diagnostische Genauigkeit ist vergleichbar mit einer Fibroscanuntersuchung und die Sensitivität steigt in Kombination dieser beider Testverfahren an (Rath et al. 2012). Ein ähnliches Ergebnis konnte erzielt werden, als die Expression von YKL-40 im Serum von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion untersucht wurde. Hierbei zeigten sich signifikant höhere Werte bei Patienten mit einer schweren Fibrose bzw. Zirrhose im Vergleich zu Patienten mit einer milden Fibrose. In der Detektion einer schweren Fibrose und Zirrhose ist die Bestimmung von YKL-40 der transienten Elastographie in der diagnostischen Genauigkeit überlegen. Die Kombination aus YKL-40 und transienter Elastographie scheint vor allem für die Detektion von frühen Formen der Leberfibrose nützlich zu sein (Rath et al. 2011).

Es gibt viele Studien, die den Einsatz von Serummarkern, entweder alleine oder in Kombination mit anderen Markern oder bildgebender Diagnostik untersucht haben.

Für die Evaluation einer Hepatitis C Erkrankung stellen diese nicht invasiven Marker eine vielversprechende Chance dar. Gerade vor dem Hintergrund, dass Hepatitis C Infektionen ein weltweites Problem darstellen und mehr als 130 Millionen Menschen, gerade auch in Teilen der Welt mit unzureichender Gesundheitsversorgung, betroffen sind. Ein zuverlässiger, nicht invasiver kostengünstiger Marker würde helfen, die Prognose abzuschätzen und damit die Therapie besser planen zu können.

#### **4.6 Limitationen der Studie**

Bei dem untersuchten Kollektiv von Mukoviszidosepatienten wurde keine Biopsie durchgeführt und somit konnte auch nicht untersucht werden, in welchem Ausmaß die Höhe der Serummarker mit einer histologischen Stadieneinteilung übereinstimmt. Die Ergebnisse des Kontrollkollektivs von HCV-Patienten, bei denen eine Biopsie vorlag, haben gezeigt, dass die Expression der Serummarker bei Patienten mit einer Zirrhose signifikant erhöht war im Vergleich zu Patienten mit einer moderaten sowie schweren Fibrose. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch bei Mukoviszidosepatienten die Konzentration der Serummarker mit dem Ausmaß der Lebererkrankung zunimmt. Eine definitive Aussage kann darüber ohne vergleichende Biopsie allerdings nicht getroffen werden.

Der Vergleich mit dem Kollektiv von HCV-Patienten hat gezeigt, dass die identifizierten Marker TIMP-4 und Endoglin nicht erkrankungsspezifisch sind. Sie sind zwar gut geeignet, eine Hepatopathie anzuzeigen, aber es ist nicht mit Bestimmtheit zu sagen, dass es sich tatsächlich um eine Mukoviszidose spezifische Veränderung der Leber handelt. Das erscheint insofern kritisch, da eine Hepatopathie aufgrund einer Virusinfektion zum Beispiel einen ganz anderen Therapieansatz nach sich ziehen würde. Die Diagnose kann demnach immer erst dann gestellt werden, wenn andere Ursachen für eine Hepatopathie sicher ausgeschlossen werden können.

Die Bestimmung von Serummarkern ist noch nicht Teil der Routinediagnostik und es ist fraglich, ob experimentell ermittelte Serummarker tatsächlich einen klinischen Nutzen bringen können. Der Einsatz der Serummarker muss in einem größeren Kollektiv als dem hier vorliegenden, überprüft werden um die Ergebnisse auf Praktikabilität und Kosteneffizienz zu testen.

#### **4.7 Schlussfolgerungen**

In Anbetracht der Tatsache, dass die Biopsie bei der Detektion und Überwachung einer CFLD kein Standard ist, steht die Anwendung nicht invasiver Verfahren in der Diagnostik bei Mukoviszidosepatienten im Vordergrund. Mithilfe des Proteome Profiling Ansatzes konnten in einem ersten Schritt interessante Proteine identifiziert werden. Mittels ELISA Messung wurde bestätigt, dass TIMP-4 und Endoglin bei Mukoviszidosepatienten mit einer Hepatopathie signifikant erhöht und zur Diagnostik einer CFLD geeignet sind. Mittels ROC-Analyse ergab sich ein optimaler Grenzwert für

die Diagnose einer CFLD für TIMP-4 von 1603 pg/ml und für Endoglin von 8,6 ng/ml. Die Expression der beiden Proteine im Serum von HCV-Kontrollpatienten wurde mit den Ergebnissen einer Biopsie bei diesen Patienten verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Proteinkonzentrationen mit den histopathologischen Veränderungen ansteigen und somit ein Parameter für die Ausprägung der Erkrankung sein können.

Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die transiente Elastographie gut geeignet ist, um eine CFLD vorherzusagen. Bei dem Vergleich von CFLD Patienten zu CF Patienten ohne CFLD stellte sich die Lebersteifigkeit in der Gruppe der CFLD Patienten signifikant erhöht dar. Der errechnete Grenzwert für die Diagnose einer CFLD lag bei 6,3 kPa. Bei Anwendung dieses Grenzwertes ergaben sich für das untersuchte Kollektiv eine Sensitivität von 82 % und eine Spezifität von 100 % zur Diagnose einer CFLD. Kombiniert man die transiente Elastographie noch mit der Bestimmung von TIMP-4 oder Endoglin, nimmt die diagnostische Aussagekraft der Serummarker weiter zu.

Beide Verfahren stellen somit, besonders auch in ihrer Kombination, eine sinnvolle Methode für eine nicht invasive Diagnostik der CFLD dar.

#### **4.8 Ausblick**

Zur Überprüfung und Bestätigung der ermittelten Ergebnisse sollte eine Langzeitstudie mit einer repräsentativen Auswahl an Mukoviszidosepatienten durchgeführt werden.

Ein interessanter Punkt wäre die Validierung von 6,3 kPa als optimaler Cut-off-Wert für die Diagnose einer CFLD.

Zusätzlich sollten die Serummarker routinemäßig bestimmt werden, um einerseits die Praktikabilität im klinischen Alltag zu testen und andererseits um zu untersuchen, ob sie für die Frühdiagnostik einer CFLD geeignet sind.

Das Kollektiv von HCV-Patienten diene in der vorliegenden Arbeit als Kontrollgruppe um nachzuweisen, dass die Erhöhung bestimmter Parameter sicher auf eine Hepatopathie zurückzuführen ist. Es wäre interessant TIMP-4 und Endoglin in einem größeren Kollektiv von Patienten mit einer Hepatitis C Infektion zu untersuchen um sie bei verlässlicher Bewertung als routinemäßige Serummarker für die Diagnose einer Fibrose bzw. Zirrhose bei HCV-Infektion zu etablieren.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund** Mukoviszidose ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen der kaukasischen Bevölkerung. Ca. 30 % der Patienten entwickeln im Rahmen ihrer Erkrankung eine Mukoviszidose assoziierte Hepatopathie (CFLD), die auch die dritthäufigste Todesursache darstellt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist noch kein geeigneter, nicht invasiver Parameter für die routinemäßige Diagnostik einer CFLD etabliert worden. Das Ziel der vorliegenden Studie war somit die Identifizierung potentieller neuer Serummarker für die Detektion einer CFLD unter Einbezug und Vergleich der Bestimmung der Lebersteife mittels transientser Elastographie.

**Material und Methoden** Das Kollektiv umfasste 45 Mukoviszidosepatienten, als Kontrolle dienten 18 Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion. Aus dem Kollektiv aller Mukoviszidosepatienten wurden je vier Patienten mit bzw. ohne CFLD für eine Proteome Profiler Analyse ausgewählt und deren Serum auf insgesamt 220 Proteine analysiert. Die Expression von vier interessanten Proteinen wurde im Anschluss bei allen 45 CF Patienten und den 18 HCV Patienten untersucht und verglichen.

**Ergebnis** Aus allen Proteinen der Proteome Profiler Analyse, die mindestens zweifach erhöht oder erniedrigt im Serum nachweisbar waren, wurden TIMP-4, Endoglin, HGF und Pentraxin 3 für die weitere Analyse mittels ELISA ausgewählt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TIMP-4 und Endoglin im Serum von CFLD Patienten signifikant erhöht und die Expression von Pentraxin 3 signifikant reduziert war. Im Serum von HCV Patienten war die Expression von TIMP-4 und Endoglin bei Patienten mit einer manifesten Zirrhose signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit einer mittel- bis hochgradigen Fibrose. Die Lebersteife war bei CFLD Patienten signifikant erhöht. Mittels ROC-Analyse wurde der optimale Cut-Off-Wert für die Diagnose einer CFLD für TIMP-4 bei 1603 pg/ml, für Endoglin bei 8,6 ng/ml und für die Lebersteife bei 6,3 kPa ermittelt. Sowohl TIMP-4 als auch Endoglin und die transiente Elastographie zeigten eine gute diagnostische Performance für die Diagnose einer CFLD. Durch die Kombination der drei Parameter nahmen die Sensitivität und Spezifität zu.

**Schlussfolgerung** TIMP-4 und Endoglin sind im Serum von CFLD Patienten signifikant erhöht und weisen gute diagnostische Eigenschaften zur Detektion einer CFLD auf. Die diagnostische Aussagekraft nimmt durch die Kombination mit der transienten Elastographie weiter zu. Anhand der HCV Patienten konnte gezeigt werden, dass die Expression der Serummarker mit dem Ausmaß der Leberbeteiligung korreliert.

## 6 Summary

**Background** Cystic fibrosis is one of the most common genetic diseases among the Caucasian population. About 30 % of the patients develop a Cystic fibrosis associated liver disease (CFLD) which is the third cause of death for patients suffering from Cystic Fibrosis. Due to the fact that there is no established non-invasive sensitive diagnostic tool for detecting CFLD, the aim of the study was to identify new experimental serum markers and to compare their expression with liver stiffness, obtained by transient Elastographie.

**Material and methods** The cohort contained 45 patients with Cystic fibrosis and was splitted in two groups, depending on the presence of CFLD. First, the serum samples of two subgroups with and without CFLD were analysed for 220 proteins using four different Proteome Profilers for the detection of chemokines, cytokines, soluble receptors and for angiogenesis factors. Subsequently, the expression of four interesting proteins was quantified by ELISA in the whole cohort. In order to compare the expression to the degree of hepatic fibrosis, a cohort of 18 patients with hepatitis C infection served as control. A liver biopsy of all patients in the control group was available.

**Results** Several proteins, at least two fold up- or down regulated could be identified by the use of the proteome profilers. Four out of all regulated proteins were chosen for further analyses. TIMP-4 and Endoglin were significantly upregulated und Pentraxin 3 significantly decreased in CDLD patients, compared to CF patients without CFLD. HGF did not differ in the two groups. The comparison of HCV patient with cirrhosis to patient with a moderate to severe fibrosis revealed a significant difference with higher values of TIMP-4 and Endoglin in the group of patients with cirrhosis. The liver stiffness of CFLD patients was significantly higher in CFLD patients than in CF Patients without CF. By the use of a ROC-Analyse, the optimal Cut-Off-Wert for Endoglin was 8,6 ng/ml, for TIMP-4 1602 pg/ml and for the stiffness of the liver 6,3 kPa. Endoglin as well as TIMP-4 and the stiffness showed a high diagnostic accuracy for the detection of CFLD with even better results by combining the transient Elastographie with TIMP-4 or Endoglin.

**Conclusion** TIMP-4 and Endoglin have a significantly higher expression in the serum of patients with CFLD compared to CF patients without CFLD and both show a highly diagnostic accuracy for the detection of CFLD. The combination of the serum marker with transient Elastographie may have remarkable impact on the non-invasive diagnostic of CFLD.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Ausgeschriebenes Wort</b>
A2M	Alpha-2-Macroglobulin
ABC-Transporter	ATP-binding cassette Transporter
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
ALT	Alanin-Aminotransferase
Ang	Angiopoietin
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APRI	AST-to platelet Ratio Index
APRI	AST/Thrombozyten-Ratio Index
ARFI	Acoustic Radiation Force Impulse
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Area under Curve
BACE	Beta-secretase
BCAM	Basal cell adhesion molecule
B-Mode	brightness modulation
BMPR-IB	Anti-Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B
C	Komplementkomponente
C1qR1	Complementcomponent 1 receptor 1
CALL	Neural cell adhesion molecule L1-like protein
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD	Cluster of Differentiation
CDH5	VE-Cadherin
CEACAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CFLD	Cystic fibrosis associated liver disease
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CRELD	Cysteine-rich with EGF-like domain protein
CRP	C reaktives Protein
CX3CL	Chemokine (C-X3-C motif) ligand
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (Fractalkine)
DIOS	Distales intestinales Obstruktionssyndrom
dpi	dots per inch
DPPIV	Dipeptidyl peptidase-4
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix protein
EGF	Epidermal growth factor
EGF R	Epidermal growth factor receptor

EG-VEGF	Endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor
EHL-Test	Enhanced Liver Funktion-Test
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ErbB	Epidermal growth factor receptor
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
FEV1	forcierte Einsekundenkapazität
FGF	Fibroblast growth factor
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
$\gamma$ GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gp130	Glycoprotein 130
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatocyte Growth factor
HKA	Haut-Kapsel-Abstand
HPRG	Histidine-rich glycoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
I-309	Chemokine (C-C motif) ligand
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IGLON	Neurotrimin
IgM	Immunglobulin M
IK	Interne Kontrolle
IL	Interleukin
IP	Interferon gamma-induced protein
IQR	Interquartil Range
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
ITGA	Integrin alpha
ITGB	Integrin Beta
JAG 1	Jagged 1 protein
JAM	Junctional adhesion molecule
KI	Konfidenzintervall
kPa	Kilopascal
LAP	Leukocyte alkaline phosphatase
LOX	Lysyl oxidase
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MAC-2BP	Galectin-3-binding protein
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
MCP	Monocyte chemotactic protein
MD-1	Lymphocyte Antigen 86
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
MIF	Macrophage migration inhibitory factor

MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrix metalloproteinases
MP	mittlere Pixeldichte
MRT	Magnetresonanztomographie
MUCDHL	Mucin and cadherin-like protein
MW	Mittelwert
n.e.	nicht erhoben
NAFL	nicht alkoholischen Fettleber
NASH	Fettleberhepatitis
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK	Negativkontrolle
NrCAM	Neuronal cell adhesion molecule
NRG1:	Neuregulin 1
PAR1	Prader-Willi/Angelman region-1
PBS	Phosphate buffered saline
PCAD	P-Cadherin
PD-ECGF	Platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor
PF4	Platelet factor 4
PK	Positivkontrolle
PLGF	Placental growth factor
PODXL	Podocalyxin-like protein 1
Pref-1	Preadipocyte factor 1
PTX3	Pentraxin 3
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	Standardabweichung
SDC	Syndecan
SDF	Stromal cell-derived factor
SEMA	Semaphorin
SICAM	Soluble intercellular adhesion molecule
SREC	Scavenger receptor expressed by endothelial cell
STC	Stanniocalcin
sTREM-1	Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1
TACE	Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme
TBR	Serin-Treonin Kinase Rezeptor
TE	Transiente Elastographie
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factors $\beta$
TIG-2	Tazarotene-induced gene 2 protein
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TM Modus	Time Motion Modus
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TROP	Tumor-associated calcium signal transducer

TSP	Thrombospondin
UDCA	Ursodeoxycholsäure
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VAP	Vascular adhesion protein
VC	Vitalkapazität
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIM	Vimentin
XCL1	Chemokine (C motif) ligand
$\beta$ IG-H3	Transforming growth factor $\beta$ -induced

## 8      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Sonde der Größe M, Firma Echosens, Paris .....	13
Abbildung 2 Aufbau des Fibroscans®, Firma Echosens, Paris .....	14
Abbildung 3 Überprüfung der korrekten Sondenposition anhand des TM; und des A-Modus.....	17
Abbildung 4 Nachweisbare Proteine des Human Chemokine Array Kits bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung).	27
Abbildung 5 Darstellung der Proteine des Human Chemokine Array Kits, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt vorlagen. ....	28
Abbildung 6 Nachweisbare Proteine des Human Angiogenesis Array Kits bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung). .....	29
Abbildung 7 Darstellung der Proteine des Human Angiogenesis Array Kits, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren. ....	30
Abbildung 8 Nachweisbare Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part N bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung). ....	31
Abbildung 9 Darstellung der Proteine des Human Soluble Receptor Array Kits Part N, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren.....	32
Abbildung 10 Nachweisbare Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part C bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung). ....	33
Abbildung 11 Darstellung der Proteine des Human Soluble Receptor Array Kits Part C, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren.....	34
Abbildung 12 Nachweisbare Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A bei Patienten mit einer CFLD (obere Abbildung) und bei CF Patienten ohne CFLD (untere Abbildung). .....	35

Abbildung 13 Darstellung der Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A, die im Vergleich des Serums von CFLD Patienten und CF Patienten ohne CFLD mehr als 2-fach erhöht oder erniedrigt waren. ....	36
Abbildung 14 Darstellung der Expression von TIMP-4, Endoglin, HGF und Pentraxin 3 im Serum von CF Patienten mit bzw. ohne CFLD. ....	37
Abbildung 15 Darstellung der Expression von TIMP-4, Endoglin, Pentraxin 3 und HGF im Serum von HCV Patienten mit einer Zirrhose (F4) im Vergleich zu Patienten mit einer mittel- bis hochgradigen Fibrose (F2/3).....	40
Abbildung 16 Übersicht über die erhobenen Werte der Lebersteifigkeit (Stiffness) bei Patienten mit bzw. ohne CFLD. ....	41
Abbildung 17 Einteilung der Patienten je nach sonographisch detektiertem Score und Vergleich der Höhe der gemessenen Lebersteifigkeit in beiden Gruppen. ....	42
Abbildung 18 Einteilung der CF Patienten je nach Wert der Lebersteifigkeit und Vergleich der beiden Gruppen bezüglich Expression von TIMP-4, Endoglin, HGF und Pentraxin 3.....	43

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Informationen über die verschiedenen Sonden (S, M, L) des Fibroscans® zur Bestimmung der Lebersteifigkeit .....	13
Tabelle 2 Zusammenstellung aller verwendeten Materialien und Geräte .....	19
Tabelle 3 Charakteristika der eingesetzten ELISA mit Angabe von verwendeter Verdünnung und eingesetzter Serummenge .....	22
Tabelle 4 Übersicht über die erhobenen demographischen und klinischen Parameter der Mukoviszidosepatienten .....	25
Tabelle 5 Darstellung der sonographisch ermittelten Scores zur Einteilung der Leberbeteiligung bei den Mukoviszidosepatienten (n = 45) .....	26
Tabelle 6 Häufigkeitsverteilung von Grading und Staging bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion .....	26
Tabelle 7 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human Chemokine Array Kits ..	27
Tabelle 8 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human Chemokine Array Kits .....	28
Tabelle 9 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human Angiogenesis Array Kits .....	29
Tabelle 10 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human Angiogenesis Array Kits .....	30
Tabelle 11 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part N .....	31
Tabelle 12 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human soluble Receptor Array Kits, Part N .....	32
Tabelle 13 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part C .....	33
Tabelle 14 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human soluble Receptor Array Kits Part C .....	34
Tabelle 15 Tabelle für die Zuordnung der Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A .....	35
Tabelle 16 Zusammenstellung aller relevanten Proteine des Human Cytokine Arrays Panel A .....	36

Tabelle 17 Einteilung der CF Patienten nach Vorhandensein einer Lungenfunktionsstörung und Überprüfung der statistischen Signifikanz beim Vergleich beider Gruppen.....	38
Tabelle 18 Übersicht über die diagnostische Aussagekraft von ARPI, der Transienten Elastographie, TIMP-4 und Endoglin unter Berücksichtigung des jeweils optimalen Grenzwertes für die Diagnose einer CFLD.....	44
Tabelle 19 Übersicht über die diagnostische Aussagekraft bei Kombination von TIMP-4, Endoglin und der transienten Elastographie unter Berücksichtigung des jeweils optimalen Grenzwertes für die Diagnose einer CFLD.....	44

## 10 Literaturverzeichnis

**Akata D**, Akhan O (2007): Liver manifestations of cystic fibrosis. In: *Eur J Radiol* 61 (1), S. 11–17. DOI: 10.1016/j.ejrad.2006.11.008.

**Ali AH**, Carey EJ, Lindor KD (2014): Diagnosis and management of primary biliary cirrhosis. In: *Expert Rev Clin Immunol* 10 (12), S. 1667–1678. DOI: 10.1586/1744666X.2014.979792.

**Alsebaey A**, Allam N, Alswat K, Waked I (2015): Normal liver stiffness: A study in living donors with normal liver histology. In: *World J Hepatol* 7 (8), S. 1149–1153. DOI: 10.4254/wjh.v7.i8.1149.

**Andersen DH** (1938): Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. In: *Am J Dis Child* 56 (2), S. 344. DOI: 10.1001/archpedi.1938.01980140114013.

**Andersen ES**, Ruhwald M, Moessner B, Christensen PB, Andersen O, Eugen-Olsen J, Weis N (2011): Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. In: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30 (6), S. 761–766. DOI: 10.1007/s10096-010-1149-y.

**Behrens CB**, Langholz JH, Eiler J, Jenewein R, Naehrlich L, Fuchs K, Harth S, Krombach GA, Alzen GF (2013): A pilot study of the characterization of hepatic tissue strain in children with cystic-fibrosis-associated liver disease (CFLD) by acoustic radiation force impulse imaging. In: *Pediatr Radiol* 43 (5), S. 552–557. DOI: 10.1007/s00247-012-2560-6.

**Benedito J**, Carcel J, Clemente G, Mulet A (2000): Cheese Maturity Assessment Using Ultrasonics. In: *Journal of Dairy Science* 83 (2), S. 248–254. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74871-5.

**Bhardwaj S**, Canlas K, Kahi C, Temkit M, Molleston J, Ober M, Howenstine M, Kwo PY (2009): Hepatobiliary abnormalities and disease in cystic fibrosis: epidemiology and outcomes through adulthood. In: *J. Clin. Gastroenterol.* 43 (9), S. 858–864. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31819e8bbd.

**Bodewes FA**, van der Doef HP, Houwen, RH, Verkade HJ (2015): Increase of Serum Gamma Glutamyltransferase (GGT) Associated With the Development of Cirrhotic Cystic Fibrosis Liver Disease. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* DOI: 10.1097/MPG.0000000000000758.

**Bonadia LC**, de Lima Marson FA, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF, Bertuzzo CS (2014): CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. In: *Gene* 540 (2), S. 183–190. DOI: 10.1016/j.gene.2014.02.040.

**Borowitz D**, Gelfond D (2013): Intestinal complications of cystic fibrosis. In: *Current opinion in pulmonary medicine* 19 (6), S. 676–680. DOI: 10.1097/MCP.0b013e3283659ef2.

**Bota S**, Herkner H, Sporea I, Salzl P, Sirli R, Neghina AM, Peck-Radosavljevic M (2013): Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33 (8), S. 1138–1147. DOI: 10.1111/liv.12240.

**Canavan C**, Eisenburg J, Meng L, Corey K, Hur C (2013): Ultrasound elastography for fibrosis surveillance is cost effective in patients with chronic hepatitis C virus in the UK. In: *Dig Dis Sci* 58 (9), S. 2691–2704. DOI: 10.1007/s10620-013-2705-y.

**Cassinotto C**, Lapuyade B, Aït-Ali A, Vergniol J, Gaye D, Foucher J, Bailacq-Auder C, Chermak F, Le Bail B, de Lédinghen V (2013): Liver fibrosis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse elastography--comparison with FibroScan M and XL probes and FibroTest in patients with chronic liver disease. In: *Radiology* 269 (1), S. 283–292. DOI: 10.1148/radiol.13122208.

**Castera L** (2012): Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. In: *Gastroenterology* 142 (6), S. 1293-1302.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.017.

**Castera L** (2015): Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 33 (4), S. 498–503. DOI: 10.1159/000374097.

**Castera L**, Forns X, Alberti A (2008): Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. In: *J. Hepatol.* 48 (5), S. 835–847. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.02.008.

**Catanzaro R**, Milazzo M, Arona S, Sapienza C, Vasta D, Arcoria D, Marotta F (2013): Diagnostic accuracy of enhanced liver fibrosis test to assess liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. In: *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 12 (5), S. 500–507.

- Chirco R**, Liu XW, Jung KK, Kim HR (2006): Novel functions of TIMPs in cell signaling. In: *Cancer Metastasis Rev* 25 (1), S. 99–113. DOI: 10.1007/s10555-006-7893-x.
- Cholongitas E**, Senzolo M, Standish R, Marelli L, Quaglia A, Patch D, Dhillon AP, Burroughs Ak (2006): A Systematic Review of the Quality of Liver Biopsy Specimens. In: *American Journal of Clinical Pathology* 125 (5), S. 710–721. DOI: 10.1309/W3XCNT4HKFBN2G0B.
- Ciuca IM**, Pop L, Tamas L, Taban S (2014): Cystic fibrosis liver disease - from diagnosis to risk factors. In: *Rom J Morphol Embryol* 55 (1), S. 91–95.
- Clemente M**, Nunez O, Lorente R, Rincon D, Matilla A, Salcedo M, Catalina MV, Ripoll C, Iacono OL, Bañares R, Clemente G, García-Monzón C (2006): Increased intrahepatic and circulating levels of endoglin, a TGF-beta1 co-receptor, in patients with chronic hepatitis C virus infection: relationship to histological and serum markers of hepatic fibrosis. In: *J Viral Hepat* 13 (9), S. 625–632. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2006.00733.x.
- Colombo C**, Russo MC, Zazzeron L, Romano G (2006): Liver disease in cystic fibrosis. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1, S. S49-55. DOI: 10.1097/01.mpg.0000226390.02355.52.
- Costantini S**, Capone F, Guerriero E, Maio P, Colonna G, Castello G (2010): Serum cytokine levels as putative prognostic markers in the progression of chronic HCV hepatitis to cirrhosis. In: *Eur Cytokine Netw* 21 (4), S. 251–256. DOI: 10.1684/ecn.2010.0214.
- Costantini S**, Capone F, Maio P, Guerriero E, Colonna G, Izzo F, Castello G (2013): Cancer biomarker profiling in patients with chronic hepatitis C virus, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In: *Oncol Rep* 29 (6), S. 2163–2168. DOI: 10.3892/or.2013.2378.
- Debray D**, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C (2011): Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 10, S. S29. DOI: 10.1016/S1569-1993(11)60006-4.

- Desai CS**, Gruessner A, Habib S, Gruessner R, Khan KM (2013): Survival of cystic fibrosis patients undergoing liver and liver-lung transplantations. In: *Transplantation proceedings* 45 (1), S. 290–292. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.02.033.
- Desmet VJ**, Gerber M, Hoofnagle J H, Manns M, Scheuer PJ (1994): Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. In: *Hepatology* 19 (6), S. 1513–1520.
- Dooley S**, ten Dijke P (2012): TGF- $\beta$  in progression of liver disease. In: *Cell Tissue Res* 347 (1), S. 245–256. DOI: 10.1007/s00441-011-1246-y.
- Edenborough FP** (2001): Women with cystic fibrosis and their potential for reproduction. In: *Thorax* 56 (8), S. 649–655.
- El-Kamary SS**, Mohamed MM, El-Raziky M, Shardell MD, Shaker OG, ElAkel WA, Esmat G (2013): Liver fibrosis staging through a stepwise analysis of non-invasive markers (FibroSteps) in patients with chronic hepatitis C infection. In: *Liver Int* 33 (7), S. 982–990. DOI: 10.1111/liv.12139.
- Farrell PM**, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; (2008): Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. In: *J Pediatr* 153 (2), S. S4-S14. DOI: 10.1016/j.jpeds.2008.05.005.
- Finnson KW**, Philip A (2012): Endoglin in liver fibrosis. In: *J Cell Commun Signal* 6 (1), S. 1–4. DOI: 10.1007/s12079-011-0154-y.
- Flass T**, Tong S, Frank DN, Wagner BD, Robertson CE, Kotter CV, Sokol RJ, Zemanick E, Accurso F, Hoffenberg EJ, Narkewicz MR (2015): Intestinal lesions are associated with altered intestinal microbiome and are more frequent in children and young adults with cystic fibrosis and cirrhosis. In: *PloS one* 10 (2), S. e0116967. DOI: 10.1371/journal.pone.0116967.
- Friedrich-Rust M**, Buggisch P, de Knecht RJ, Dries V, Shi Y, Matschenz K, Schneider MD, Herrmann E, Petersen J, Schulze F, Zeuzem S, Sarrazin C (2013a): Acoustic radiation force impulse imaging for non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. In: *Journal of viral hepatitis* 20 (4), S. 240–247. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2012.01646.x.

- 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 (2013b): Non-invasive measurement of liver and pancreas fibrosis in patients with cystic fibrosis. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 12 (5), S. 431–439. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.12.013.
- Fruio N**, Trillaud H (2013): Ultrasound elastography in liver. In: *Diagn Interv Imaging* 94 (5), S. 515–534. DOI: 10.1016/j.diii.2013.02.005.
- Giannandrea M**, Parks WC (2014): Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. In: *Disease models & mechanisms* 7 (2), S. 193–203. DOI: 10.1242/dmm.012062.
- Glowacki MK**, Ciesla A, Cibor D, Owczarek D, Mach T, Wilinski J, Wilinski B (2014): Selected apoptotic markers in serum of patients with chronic viral hepatitis C. In: *Przegl Lek* 71 (7), S. 369–373.
- Greene J**, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE (1996): Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. In: *J Biol Chem* 271 (48), S. 30375–30380.
- Griesenbach U**, Alton EW (2015): Recent advances in understanding and managing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction. In: *F1000Prime Rep* 7, S. 64. DOI: 10.12703/P7-64.
- Guggino WB**, Stanton BA (2006): New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (6), S. 426–436. DOI: 10.1038/nrm1949.
- Hayes D**, Tobias JD, Mansour HM, Kirkby S, McCoy KS, Daniels CJ, Whitson BA (2014): Pulmonary hypertension in cystic fibrosis with advanced lung disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 190 (8), S. 898–905. DOI: 10.1164/rccm.201407-1382OC.
- He X**, Han B, Bai X, Zhang Y, Cypel M, Mura M, Keshavjee S, Liu M (2010): PTX3 as a potential biomarker of acute lung injury: supporting evidence from animal experimentation. In: *Intensive Care Med* 36 (2), S. 356–364. DOI: 10.1007/s00134-009-1720-0.

**Healthcare Sector / Diagnostics Division** (18.07.2011): Leberfibrose sicherer und schneller erkennen: Siemens bringt den ersten automatisierten Biomarker-Test auf den Markt. Erlangen. Fischer, Sonja. Online verfügbar unter <http://www.siemens.com/press/de/pressemitteilungen/?press=/de/pressemitteilungen/2011/diagnostics/hdx201107038.htm&content=HDX&content=HCDX>.

**Herold G** und Mitarbeiter (2011): Innere Medizin 2011. eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln.

**Herrmann U**, Dockter G, Lammert F (2010): Cystic fibrosis-associated liver disease. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24 (5), S. 585–592. DOI: 10.1016/j.bpg.2010.08.003.

**Houwen RH**, van der Doef HP, Sermet I, Munck A, Hauser B, Walkowiak J, Robberecht E, Colombo C, Sinaasappel M, Wilschanski M, ESPGHAN Cystic Fibrosis Working Group (2010): Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 50 (1), S. 38–42. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181a6e01d.

**Jaillon S**, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F, Garlanda C, Romani L, Gascan H, Bellocchio S, Bozza S, Cassatella MA, Jeannin P, Mantovani A (2007): The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. In: *J Exp Med* 204 (4), S. 793–804. DOI: 10.1084/jem.20061301.

**Karlas T**, Neuschulz M, Oltmanns A, Güttler A, Petroff D, Wirtz H, Mainz JG, Mössner J, Berg T, Tröltzsch M, Keim V, Wiegand J (2012): Non-invasive evaluation of cystic fibrosis related liver disease in adults with ARFI, transient elastography and different fibrosis scores. In: *PLoS ONE* 7 (7), S. e42139. DOI: 10.1371/journal.pone.0042139.

**Karzai FH**, Apolo AB, Cao L, Madan RA, Adelberg DE, Parnes H, McLeod DG, Harold N, Peer C, Yu Y, Tomita Y, Lee MJ, Lee S, Trepel JB, Gulley JL, Figg WD, Dahut WL (2014): A phase I study of TRC105 anti-CD105 (endoglin) antibody in metastatic castration-resistant prostate cancer. In: *BJU Int*. DOI: 10.1111/bju.12986.

**Kelly T**, Buxbaum J (2015): Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. In: *Dig Dis Sci*. DOI: 10.1007/s10620-015-3546-7.

**Kim MD**, Kim SS, Cha HY, Jang SH, Chang DY, Kim W, Suh-Kim H, Lee JH (2014): Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis. In: *Exp Mol Med* 46, S. e110. DOI: 10.1038/emm.2014.49.

**Kim WH**, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T (2005): Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. In: *Am J Pathol* 166 (4), S. 1017–1028. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62323-1.

**Kitson MT**, Kemp WW, Iser DM, Paul E, Wilson JW, Roberts SK (2013): Utility of transient elastography in the non-invasive evaluation of cystic fibrosis liver disease. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33 (5), S. 698–705. DOI: 10.1111/liv.12113.

**Kobelska-Dubiel N**, Klincewicz B, Cichy W (2014): Liver disease in cystic fibrosis. In: *Prz Gastroenterol* 9 (3), S. 136–141. DOI: 10.5114/pg.2014.43574.

**Kreda SM**, Davis CW, Rose MC (2012): CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (9), S. a009589. DOI: 10.1101/cshperspect.a009589.

**Larsson A**, Ronquist G, Åkerfeldt T (2013): Lifestyle intervention is associated with decreased concentrations of circulating pentraxin 3 independent of CRP decrease. In: *Upsala journal of medical sciences* 118 (3), S. 165–168. DOI: 10.3109/03009734.2013.801540.

**Leeuwen L**, Magoffin AK, Fitzgerald DA, Cipolli M, Gaskin KJ (2014): Cholestasis and meconium ileus in infants with cystic fibrosis and their clinical outcomes. In: *Archives of disease in childhood* 99 (5), S. 443–447. DOI: 10.1136/archdischild-2013-304159.

**Legrys VA**, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ (2007): Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. In: *J. Pediatr.* 151 (1), S. 85–89. DOI: 10.1016/j.jpeds.2007.03.002.

**Leung DH**, Khan M, Minard CG, Guffey D, Ramm LE, Clouston AD, Miller G, Lewindon PJ, Shepherd RW, Ramm GA (2015): Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio and Fibrosis-4 as Biomarkers in Biopsy Validated Pediatric Cystic Fibrosis Liver Disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)*. DOI: 10.1002/hep.28016.

- Lewindon PJ**, Shepherd RW, Walsh MJ, Greer RM, Williamson R, Pereira TN, Frawley K, Bell SC, Smith JL, Ramm GA (2011): Importance of hepatic fibrosis in cystic fibrosis and the predictive value of liver biopsy. In: *Hepatology* 53 (1), S. 193–201. DOI: 10.1002/hep.24014.
- Liss M**, Sreedhar N, Keshgegian A, Sauter G, Chernick MR, Prendergast GC, Wallon UM (2009): Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 is elevated in early-stage breast cancers with accelerated progression and poor clinical course. In: *Am J Pathol* 175 (3), S. 940–946. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081094.
- Lörke J**, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D (2007): Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose (15.06.2007). Hg. v. Deutsches Ärzteblatt (104, 24). Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/archiv/56047/Nicht-invasive-Diagnostik-der-Leberzirrhose?s=Nicht+invasive+Diagnostik+der+Leberzirrhose>
- Lucidarme D**, Foucher J, Le Bail B, Vergniol J, Castera L, Duburque C, Forzy G, Filoche B, Couzigou P, de Lédinghen V (2009): Factors of accuracy of transient elastography (fibroscan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 49 (4), S. 1083–1089. DOI: 10.1002/hep.22748.
- MacKenzie T**, Gifford AH, Sabadosa KA, Quinton HB, Knapp EA, Goss CH, Marshall BC (2014): Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the cystic fibrosis foundation patient registry. In: *Ann Intern Med* 161 (4), S. 233–241. DOI: 10.7326/M13-0636.
- Manco M**, Zupone CL, Alghisi F, D'Andrea ML, Lucidi V, Monti L (2012): Pilot study on the use of acoustic radiation force impulse imaging in the staging of cystic fibrosis associated liver disease. In: *J Cyst Fibros* 11 (5), S. 427–432. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.04.001.
- Melendez-Zajgla J**, Del Pozo L, Ceballos G, Maldonado V (2008): Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled. In: *Molecular cancer* 7, S. 85. DOI: 10.1186/1476-4598-7-85.
- Menten R**, Leonard A, Clapuyt P, Vincke P, Nicolae AC, Lebecque P (2010): Transient elastography in patients with cystic fibrosis. In: *Pediatr Radiol* 40 (7), S. 1231–1235. DOI: 10.1007/s00247-009-1531-z.

- Meurer SK**, Alsamman M, Scholten D, Weiskirchen R (2014): Endoglin in liver fibrogenesis: Bridging basic science and clinical practice. In: *World J Biol Chem* 5 (2), S. 180–203. DOI: 10.4331/wjbc.v5.i2.180.
- Molnarfi N**, Benkhoucha M, Funakoshi H, Nakamura T, Lalive PH (2014): Hepatocyte growth factor: A regulator of inflammation and autoimmunity. In: *Autoimmun Rev*. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.11.013.
- Müller M** und Mitarbeiter (2012/13): Chirurgie für Studium und Praxis, 11. Auflage Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
- Mueller-Abt PR**, Frawley KJ, Greer RM, Lewindon PJ (2008): Comparison of ultrasound and biopsy findings in children with cystic fibrosis related liver disease. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 7 (3), S. 215–221. DOI: 10.1016/j.jcf.2007.08.001.
- Nadler EP**, Li X, Onyedika E, Greco MA (2010): Differential expression of hepatic fibrosis mediators in sick and spontaneously recovered mice with experimental biliary atresia. In: *The Journal of surgical research* 159 (2), S. 611–617. DOI: 10.1016/j.jss.2009.10.038.
- Naehrlich L**, Stuhmann-Stangenberg M, Barben J, Bargon J, Blankenstein O, Bremer W et al. (2013): S2-Konsensus-Leitlinie "Diagnose der Mukoviszidose" (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie. Online verfügbar unter [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/026-023IS\\_2k\\_Diagnose\\_der\\_Mukoviszidose\\_2013-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/026-023IS_2k_Diagnose_der_Mukoviszidose_2013-07.pdf)
- Nährlich L**, Zimmer KP (2013): Neonatal cystic fibrosis screening--time to begin! In: *Deutsches Ärzteblatt international* 110 (20), S. 354–355. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0354.
- Nakamura T**, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K (2011): Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. In: *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, S. 188–202. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x.
- Nash KL**, Allison ME, McKeon D, Lomas DJ, Haworth CS, Bilton D, Alexander GJ (2008): A single centre experience of liver disease in adults with cystic fibrosis 1995-2006. In: *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 7 (3), S. 252–257. DOI: 10.1016/j.jcf.2007.10.004.

- O'Sullivan BP**, Freedman S (2009): Cystic fibrosis. In: *The Lancet* (373), S. 1891–1904. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
- O'Donnell DH**, Ryan R, Hayes B, Fennelly D, Gibney RG (2009): Hepatocellular carcinoma complicating cystic fibrosis related liver disease. In: *J Cyst Fibros* 8 (4), S. 288–290. DOI: 10.1016/j.jcf.2009.05.002.
- Ooi CY**, Nightingale S, Durie PR, Freedman SD (2012): Ursodeoxycholic acid in cystic fibrosis-associated liver disease. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 11 (1), S. 72–73. DOI: 10.1016/j.jcf.2011.08.002.
- Pár G**, Trosits A, Pakodi F, Szabó I, Czimmer J, Illés A, Gódi S, Bajor J, Sarlós P, Kenyeres P, Miseta A, Vincze A, Pár A (2014): Tranziens elasztográfia mint a nyelőcső-varicositas prediktora májcirrhosisban szenvedő betegekben. Transient elastography as a predictor of oesophageal varices in patients with liver cirrhosis. In: *Orvosi hetilap* 155 (7), S. 270–276. DOI: 10.1556/OH.2014.29824.
- Patel K**, Shackel NA (2014): Current status of fibrosis markers. In: *Curr Opin Gastroenterol* 30 (3), S. 253–259. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000059.
- Perano S**, Rayner CK, Couper J, Martin J, Horowitz M (2014): Cystic fibrosis related diabetes—a new perspective on the optimal management of postprandial glycemia. In: *Journal of Diabetes and its Complications* 28 (6), S. 904–911. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2014.06.012.
- Pereira TN**, Lewindon PJ, Smith JL, Murphy TL, Lincoln DJ, Shepherd RW, Ramm GA (2004): Serum markers of hepatic fibrogenesis in cystic fibrosis liver disease. In: *J. Hepatol.* 41 (4), S. 576–583. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.06.032.
- Ploier R** (2012): Differenzialdiagnosen in der Kinder- und Jugendmedizin: Thieme. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=RUzvP2cKiNkC>.
- Rath T**, Menendez KM, Kügler M, Hage L, Wenzel C, Schulz R, Graf J, Nährlich L, Roeb E, Roderfeld M (2012): TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. In: *Dig Liver Dis* 44 (9), S. 780–787. DOI: 10.1016/j.dld.2012.04.008.
- Rath T**, Roderfeld M, Guler C, Wenzel C, Graf J, Beitinger F, Roeb E, Zachoval R (2011): YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis.

In: *Scand J Gastroenterol* 46 (11), S. 1369–1380. DOI:  
10.3109/00365521.2011.613949.

**Rath T**, Zwaschka L, Hage L, Kügler M, Menendez K, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E (2014): Identification of Neutrophil Activation Markers as Novel Surrogate Markers of CF Lung Disease. In: *PloS one* 9 (12), S. e115847. DOI:  
10.1371/journal.pone.0115847.

**Robic MA**, Procopet B, Metivier S, Peron JM, Selves J, Vinel JP, Bureau C (2011): Liver stiffness accurately predicts portal hypertension related complications in patients with chronic liver disease: a prospective study. In: *J Hepatol* 55 (5), S. 1017–1024. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.01.051.

**Rochholz EL** (1857): Alemannisches Kinderlied und Kinderspiel aus der Schweiz: Verlagsbuchhandlung JJ Weber, Leipzig. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=3iYPAAAAQAAJ>.

**Roderfeld M**, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E (2009): Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. In: *J Cyst Fibros* 8 (5), S. 338–347. DOI: 10.1016/j.jcf.2009.06.001.

**Rowland M**, Gallagher CG, O'Laoide R, Canny G, Broderick A, Hayes R, Greally P, Slattery D, Daly L, Durie P, Bourke B (2011): Outcome in cystic fibrosis liver disease. In: *The American journal of gastroenterology* 106 (1), S. 104–109. DOI:  
10.1038/ajg.2010.316.

**Sadler MD**, Crotty P, Fatovich L, Wilson S, Rabin HR, Myers RP (2015): Noninvasive methods, including transient elastography, for the detection of liver disease in adults with cystic fibrosis. In: *Can J Gastroenterol Hepatol* 29 (3), S. 139–144.

**Sandrin L**, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Zioli M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R (2003): Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. In: *Ultrasound Med Biol* 29 (12), S. 1705–1713.

**Sandrin L**, Oudry F, Bastard C, Fournier C, Miette V, Mueller S (2011): Non-Invasive Assessment of Liver Fibrosis by Vibration-Controlled Transient Elastography (Fibroscan®). In: Hirokazu Takahashi (Hg.): *Liver Biopsy*: InTech.

- Santibañez JF**, Quintanilla M, Bernabeu C (2011): TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 121 (6), S. 233–251. DOI: 10.1042/CS20110086.
- Sauerbruch T**, Appenrodt B, Schmitz V, Spengler U (2013): The conservative and interventional treatment of the complications of liver cirrhosis: Part 2 of a series on liver cirrhosis. In: *Deutsches Ärzteblatt international* 110 (8), S. 126-32, I. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0126.
- Schaaf CP**, Zschocke J (2008): Basiswissen Humangenetik. Mit 37 Tabellen ; [Schwerpunkt klinische Genetik]. Heidelberg: Springer Medizin (Springer-Lehrbuch).
- Scheuer PJ** (1991): Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. In: *J Hepatol* 13 (3), S. 372–374.
- Schirmacher P**, Fleig WE, Dienes HP (2004): Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis - Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und des Kompetenznetzes Hepatitis (HepNet). In: *Z Gastroenterol* 42 (2), S. 175–185. DOI: 10.1055/s-2004-812728.
- Siano M**, De Gregorio F, Boggia B, Sepe A, Ferri P, Buonpensiero P, Di Pasqua A, Raia V (2010): Ursodeoxycholic acid treatment in patients with cystic fibrosis at risk for liver disease. In: *Digestive and Liver Disease* 42 (6), S. 428–431. DOI: 10.1016/j.dld.2009.07.022.
- Solomon GM**, Marshall SG, Ramsey BW, Rowe SM (2015): Breakthrough therapies: Cystic fibrosis (CF) potentiators and correctors. In: *Pediatr Pulmonol*. DOI: 10.1002/ppul.23240.
- Speeckaert MM**, Speeckaert R, Carrero JJ, Vanholder R, Delanghe JR (2013): Biology of human pentraxin 3 (PTX3) in acute and chronic kidney disease. In: *J Clin Immunol* 33 (5), S. 881–890. DOI: 10.1007/s10875-013-9879-0.
- Staufer K**, Halilbasic E, Trauner M, Kazemi-Shirazi L (2014): Cystic fibrosis related liver disease-another black box in hepatology. In: *Int J Mol Sci* 15 (8), S. 13529–13549. DOI: 10.3390/ijms150813529.

- Stuhrmann-Spangenberg M**, Aulehla-Scholz C, Dworniczak B, Reiss J (2009): Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose. In: *medgen* 21 (2), S. 268–275. DOI: 10.1007/s11825-009-0155-x.
- Tannapfel A**, Dienes HP, Lohse AW (2012): The indications for liver biopsy. In: *Dtsch Arztebl Int* 109 (27-28), S. 477–483. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0477.
- Tapper EB**, Cohen EB, Patel K, Bacon B, Gordon S, Lawitz E, Nelson D, Nasser IA, Challies T, Afdhal N (2012): Levels of alanine aminotransferase confound use of transient elastography to diagnose fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (8), S. 932-937.e1. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.01.015.
- Tarr AW**, Urbanowicz RA, Ball JK (2012): The role of humoral innate immunity in hepatitis C virus infection. In: *Viruses* 4 (1), S. 1–27. DOI: 10.3390/v4010001.
- Tomandlova M**, Jarkovsky J, Tomandl J, Kubkova L, Kala P, Littnerova S, Gottwaldova J, Kubena P, Ganovska E, Poloczek M, Spinar J, Mueller C, Mebazaa A, Pavkova Goldbergova M, Parenica J (2015): Prognostic value of pentraxin-3 level in patients with STEMI and its relationship with heart failure and markers of oxidative stress. In: *Disease markers* 2015, S. 159051. DOI: 10.1155/2015/159051.
- Umlawska W**, Krzyzanowska M, Zielinska A, Sands D (2014): Effect of selected factors associated with the clinical course of the disease on nutritional status in children with cystic fibrosis. In: *Adv Clin Exp Med* 23 (5), S. 775–783.
- Vergniol J**, Boursier J, Coutzac C, Bertrais S, Foucher J, Angel C, Chermak F, Hubert IF, Merrouche W, Oberti F, de Lédinghen V, Calès P (2014): Evolution of noninvasive tests of liver fibrosis is associated with prognosis in patients with chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 60 (1), S. 65–76. DOI: 10.1002/hep.27069.
- Verrecchia F**, Mauviel A (2007): Transforming growth factor- $\beta$  and fibrosis. In: *World J Gastroenterol* 13 (22), S. 3056–3062. DOI: 10.3748/wjg.v13.i22.3056.
- Walker C**, Thimme R, Bausch B (2015): Fibroscan of the liver. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 140 (4), S. 267–270. DOI: 10.1055/s-0041-100442.

- Wilder J**, Patel K (2014): The clinical utility of FibroScan® as a noninvasive diagnostic test for liver disease. In: *Med Devices (Auckl)* 7, S. 107–114. DOI: 10.2147/MDER.S46943.
- Williams SG**, Evanson JE, Barrett N, Hodson ME, Boulton JE, Westaby D (1995): An ultrasound scoring system for the diagnosis of liver disease in cystic fibrosis. In: *Journal of Hepatology* 22 (5), S. 513–521. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80444-7.
- Wilschanski M** (2008): Patterns of gastrointestinal disease associated with mutations of CFTR. In: *Curr Gastroenterol Rep* 10 (3), S. 316–323.
- Witters P**, De Boeck K, Dupont L, Proesmans M, Vermeulen F, Servaes R, Verslype C, Laleman W, Nevens F, Hoffman I, Cassiman D (2009): Non-invasive liver elastography (Fibroscan) for detection of cystic fibrosis-associated liver disease. In: *J. Cyst. Fibros.* 8 (6), S. 392–399. DOI: 10.1016/j.jcf.2009.08.001.
- Yagmur E**, Rizk M, Stanzel S, Hellerbrand C, Lammert F, Trautwein C, Wasmuth HE, Gressner AM (2007): Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma. In: *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19 (9), S. 755–761. DOI: 10.1097/MEG.0b013e3282202bea.
- Yaman H**, Cakir E, Akgul EO, Aydin I, Onguru O, Cayci T, Agilli M, Aydin FN, Gulec M, Altinel O, Isbilir S, Ersoz N, Yasar M, Turker T, Bilgi C, Erbil KM (2013): Pentraxin 3 as a potential biomarker of acetaminophen-induced liver injury. In: *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 65 (1-2), S. 147–151. DOI: 10.1016/j.etp.2011.07.003.
- Yoneda M**, Uchiyama T, Kato S, Endo H, Fujita K, Yoneda K et al. (2008): Plasma Pentraxin3 is a novel marker for nonalcoholic steatohepatitis (NASH). In: *BMC Gastroenterol* 8, S. 53. DOI: 10.1186/1471-230X-8-53.
- Zamora Nava LE**, Aguirre Valadez J, Chavez-Tapia NC, Torre A (2014): Acute-on-chronic liver failure: a review. In: *Ther Clin Risk Manag* 10, S. 295–303. DOI: 10.2147/TCRM.S59723.
- Ziol M**, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M (2005): Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 41 (1), S. 48–54. DOI: 10.1002/hep.20506.

## 11 Anhang

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH • Zentrum für Innere Medizin •  
Schwerpunkt Gastroenterologie • Klinikstr. 33 • 35385 Gießen •



Standort Gießen

Zentrum für Innere Medizin  
Schwerpunkt Gastroenterologie  
Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb

35392 Gießen, Klinikstr. 33

35385 Gießen

(06 41) 985 -4 23 38(Sekretariat)

(06 41) 985 -4 23 39

Elke.Roeb@innere.med.uni-giessen.de

Gießen,  
Prof. Roeb

### Befundbogen: Hepatische Elastographie

Überweiser:

Datum:

Erstuntersuchung:

Folgeuntersuchung:

Indikation:

Mukoviszidose

Hepatitis B:

Hepatitis C:

Rechtesherzbelastung:

NASH/ASH:

Andere:

**Stiffness (kPa)** :

IQR :

CS :

**Sucess** :

**Procedere:**

Untersucher: Univ.-Prof. Dr. med. E. Roeb



Zentrum für Innere Medizin • Schwerpunkt Gastroenterologie  
Univ.-Prof. Dr. E. Roeb • Klinikstr. 33. • 35385 Giessen

**Medizinische Klinik u. Poliklinik II**  
**Zentrum für Innere Medizin**  
**-Gastroenterologie-**  
**- Internistische Intensivmedizin -**

## Studie

### **Früherkennung und Verlauf der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose-Patienten und anderen chronisch Lebererkrankten mittels Elastographie (Fibroscan)**

Leitung: Univ.- Prof. Dr. med. Elke  
Roeb

 **35385 Gießen**

 (06 41) 985-4 23 38

 (06 41) 985-4 23 39

E-Mail:

[Elke.Roeb@innere.med.uni-giessen.de](mailto:Elke.Roeb@innere.med.uni-giessen.de)

Giessen,

## Einwilligungserklärung

Ich habe die Patienteninformation über oben bezeichnete Studie gelesen und verstanden.

Über Wesen, Bedeutung und Reichweite der Studie sowie meine Beteiligung mit ihren Risiken bin ich durch Prof. Dr. Roeb und/oder deren Mitarbeiter mündlich aufgeklärt worden. Nach ausreichender Bedenkzeit gebe ich hiermit mein freiwilliges Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Alle meine Fragen wurden ausreichend beantwortet. Ich willige ein, dass die Ergebnisse der Elastographieuntersuchung sowie Serum für Forschungszwecke verwendet werden. Sollte es erforderlich sein, willige ich auch ein, 15 ml Blut (bei Kindern weniger) zur Verfügung zu stellen.

Mir ist bewusst, dass ich diese Einwilligung jederzeit widerrufen kann, ohne das mir dadurch Nachteile entstehen. Eine Kopie dieser Erklärung habe ich erhalten.

Giessen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient/-in oder  
Gesetzliche/r Vertreter/-in

Giessen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Arzt/Ärztin



Justus-Liebig  
Universität Giessen  
Standort Giessen

## UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIESSEN UND MARBURG



Philipps-Universität  
Marburg

Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Medizinische Klinik II, Gastroenterologie,  
Paul-Meimberg-Str. 5, 35385 Giessen

Prof. Dr. med. Elke Roeb

Medizinische Klinik II, Gastroenterologie  
Paul-Meimberg-Str. 5  
35385 Giessen, GERMANY  
☎ (0641) 99 42338  
☎ (0641) 99-42339

### Patienteninformation zur Studie

**Früherkennung und Verlauf der  
Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten  
und anderen chronisch Lebererkrankten mittels  
Elastographie (Fibroscan)**

eroeb@gmx.de  
www.med.uni-giessen.de

Giessen, 29. Mai 2009

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Bei Ihnen wird die Durchführung einer Elastographie der Leber mittels Fibroscan vorgenommen. Über diese Untersuchung wurden Sie ausführlich vorher aufgeklärt. Die Elastographie-Untersuchung der Leber dient der Unterstützung von Diagnose und Betreuung von Leberpatienten. Die Ergebnisse werden nur von Leberspezialisten interpretiert, denen die Erkrankung des Patienten und der klinische Rahmen der Erkrankung bekannt sind. Die Untersuchung ist relativ ungefährlich. Sie entspricht in etwa einer Sonographie (Ultraschall). Die Fibroscan-Untersuchung sollte nicht angewendet werden bei anderen Organen als der Leber, bei Patienten mit aktiven implantierten Vorrichtungen wie Herzschrittmacher, Defibrillator oder Pumpen, auf Wunden, bei Schwangeren oder bei Patienten mit Aszites.

Im Schwerpunkt Gastroenterologie der Justus-Liebig-Universität Giessen werden chronische Lebererkrankungen hinsichtlich des Risikos der Entwicklung einer Fibrose oder Zirrhose hin erforscht. Zu diesem Zweck bitten wir Sie heute um die zusätzliche Entnahme einer geringen Menge Serum über den klinischen Zweck hinaus. Es werden keinerlei kommerzielle Ziele verfolgt. Vielmehr dient diese Forschung dazu, in Zukunft bessere Ratschläge bezüglich Diagnostik, Medikamentengabe und -dosierung bei bestimmten Leber-Erkrankungen geben zu können.

Ihr Einverständnis ist freiwillig; nach Einwilligung in die Teilnahme an dieser Studie ist es jederzeit möglich, diese Einwilligung teilweise oder ganz zu widerrufen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile entstehen. Etwaige weitere Fragen richten Sie bitte an Ihren behandelnden Arzt, der Sie mündlich aufklären wird.

Wir danken für Ihre Mitarbeit.

Das Team der Gastroenterologie

Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb

## 12 Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Rath T, Menendez KM, Kügler M, Hage L, Wenzel C, Schulz R, Graf J, Naehrlich L, Roeb E. (2012): TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. In: Dig Liver Dis 44 (9), S. 780–787. DOI: 10.1016/j.dld.2012.04.008.

Rath T, Hage L, Kügler M, Menendez K, Zachoval R, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E. (2013) Serum proteome profiling identifies novel and powerful markers of cystic fibrosis liver disease. In: PLOS ONE 8 (3), S. e58955. DOI: 10.1371/journal.pone.0058955.

Rath T, Zwaschka L, Hage L, Kügler M, Menendez K, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E. (2014) Identification of Neutrophil Activation Markers as Novel Surrogate Markers of CF Lung Disease. In: PLOS ONE 9 (12), S. e115847. DOI: 10.1371/journal.pone.0115847.

### Abstracts

Hage L, Roderfeld M, Tschuschner A, Rath T, Roeb E. Identifizierung von HGF und uPA als potentielle Serum-Biomarker für die chronische Leberschädigung bei Mukoviszidose-Patienten mittels Proteom Profiler Analyse. Der Internist 2012; 13:12A (Abstract/Poster, DGIM 2012)

Hage L, Roderfeld M, Tschuschner A, Rath T, Roeb E. ADAM10, ein neuer Serummarker für die Leberbeteiligung bei Mukoviszidose - Ergebnisse einer Proteome Profiler Analyse. Z Gastroenterol 2012; 50:844A (Abstract/Vortrag, DGVS 2012, Reisestipendium)

Roderfeld M, Hage L, Rath T, Tschuschner A, Naehrlich L, Schulz R, Zachoval R, Roeb E. TIMP-4 und Endoglin sowie die Transiente Elastographie sind für die nicht invasive Diagnostik der Leberbeteiligung bei Zystischer Fibrose geeignet. Z Gastroenterol 2013; 1:77A (Abstract/Poster, GASL 2013)

Zwaschke L, Hage L, Rath T, Tschuschner A, Schulz R, Naehrlich R, Zachoval R, Roderfeld M, Roeb E. Etablierung nicht invasiver Diagnostik für die Einschätzung der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose. Tagungs-Abstractband (Abstract und Poster, MGG 2013, Der Gastroenterologe). Posterpreis

Siemers E, Radke C, Roderfeld M, Hage L, Tschuschner A, Rath T, Roeb E.  
Langzeit Untersuchung der Lebersteifigkeit mittels Fibroscan zeigt bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten mit Leberbeteiligung (CFLD) eine Verschlechterung der Werte. (Abstract/Vortrag DGVS 2015)

### 13 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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 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 oder 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.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 14 Danksagung

- Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Elke Roeb für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Studie unter ihrer Leitung durchführen zu können. Ich möchte mich noch einmal ausdrücklich für die hervorragende Betreuung und die vielen Vorschläge zur Optimierung meiner Arbeit bedanken.
- Ich danke PD Dr. Martin Roderfeld für seine Hilfsbereitschaft und den angenehmen, besonnenen Umgangston. Ich habe die vielen fachlich fundierten Gespräche und die wertvollen Hinweise zur Durchführung der Versuche sehr zu schätzen gewusst.
- Vielen Dank an Dr. Timo Rath, der mich bei der Planung und Auswertung der Ergebnisse beraten und stets unterstützt hat. Die gemeinsame Arbeit an unserer Veröffentlichung hat mir einen weiteren Aspekt der Wissenschaft gezeigt und mich begeistert.
- Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe, ganz besonders aber Annette Tschuschner für die sehr gute fachliche Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche und die angenehme Arbeitsatmosphäre auf Augenhöhe.
- Mein ausdrücklicher Dank geht an den Gießener Mukoviszidose Förderverein e.V. der dieses Projekt durch seine großzügige Spende in Form des Fibroscans® erst möglich gemacht hat. Mein Dank gilt hier besonders Herrn Prof. Lindemann.
- Ein besonderer Dank geht an das gesamte Team der Mukoviszidoseambulanzen und an Ute Seeger, die sehr engagiert und zuverlässig zum Gelingen dieser Studie beigetragen haben.
- Zu Beginn der Studie erfolgte eine Beratung durch Herrn Pons-Kühnemann der Arbeitsgruppe Medizinische Statistik der JLU Gießen, dafür vielen Dank.
- Ein großer Dank geht an das Promotionskolleg der JLU Gießen. Die finanzielle Unterstützung hat mir dazu verholfen, mich ganz auf die Anfertigung der Doktorarbeit konzentrieren zu können und die zahlreichen Angebote zur Vertiefung und Förderung der wissenschaftlichen Arbeit haben mich inhaltlich sehr unterstützt.
- Ich danke von Herzen meiner ganzen Familie, insbesondere aber meinen Eltern, die mich all die Jahre unterstützt und an mich geglaubt haben. Meinem Vater danke ich sehr, dass er es mir ermöglicht hat, die Zeit zwischen Examen und Arbeitsbeginn zu nutzen, um die Doktorarbeit zu vollenden. Ein großes Dankeschön auch an meine Schwester Kerstin, meinen Freund Johannes Fuchs und an Susanne Finke, die so sorgfältig meine Arbeit korrigiert und mir damit sehr geholfen haben.