

**Diagnostische Bedeutung von Lipocalin-2 für die Leberbeteiligung bei
zystischer Fibrose im pädiatrischen Alter**

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt

von

Victoria Carolin Klotter

aus Marburg

Gießen 2020

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Schwerpunkt Gastroenterologie
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MHAC
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

2. Gutachter: PD Dr. med. Jan de Laffolie

Tag der Disputation: 02.10.2020

Veröffentlichungen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalarbeiten:

„Assessment of pathologic increase in liver stiffness enables earlier diagnosis of CFLD: Results from a prospective longitudinal cohort study“

Victoria Klotter, Caroline Gunchick, Enno Siemers, Timo Rath, Helge Hudel,
Lutz Naehrlich, Martin Roderfeld, Elke Roeb
PLoS One (2017) 12 (6): e0178784. DOI:10.1371/journal.pone.0178784

Abstracts/ Poster:

„Prospektive, longitudinale Kohortenstudie zur hepatischen Elastographie: Frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose“

Victoria Klotter, Caroline Gunchick, Enno Siemers, Helge Hudel, Martin Roderfeld,
Elke Roeb
ScienceDay, 16.11.2018, Gießen
Abstractpräsentation, 1. Preis für den „besten Vortrag aus dem Bereich klinische
Forschung/Patientennahe Forschung“

„Prospektive, longitudinale Kohortenstudie zur hepatischen Elastographie: Frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose“

Victoria Klotter, Caroline Gunchick, Enno Siemers, Helge Hudel, Martin Roderfeld,
Elke Roeb
34. Jahrestagung GASL, 26.-27.01.2018, Hamburg
Abstractpräsentation
Zeitschrift für Gastroenterologie (2018) 56 (1): e2-e89, DOI: 10.1055/s-0037-1612709

„Prospective, longitudinal cohort study of the pathologic increase in liver stiffness: early diagnosis of liver disease in cystic fibrosis“

Victoria Klotter, Caroline Gunchick, Enno Siemers, Helge Hudel, Martin Roderfeld, Elke Roeb

Workshop Falk Foundation eV., 25.-26.01.2018, Hamburg

Poster Visit Session II Clinical Hepatology

Posterpräsentation: Nr. 18

„Die Steigerung der Lebersteifigkeit erlaubt eine frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose: Ergebnisse einer prospektiven, longitudinalen Kohortenstudie“

Victoria Klotter, Caroline Gunchick, Enno Siemers, Helge Hudel, Martin Roderfeld, Elke Roeb

72. Jahrestagung DGVS, 13.-16.09.2017, Dresden

Abstractpräsentation

Zeitschrift für Gastroenterologie (2017) 55 (8): e57-e299, DOI: 10.1055/s-0037-160508

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historische Entwicklung	2
1.2	Epidemiologie und Ätiologie	4
1.3	Pathophysiologie der CFTR-Mutation	6
1.4	Klinisches Bild und Symptome der CF	8
1.5	Diagnostik der CF	9
1.5.1	Klinische Diagnostik	11
1.5.2	Neugeborenen-Screening	11
1.5.3	Der Schweißtest	12
1.5.4	Genetische Diagnostik	13
1.5.5	Elektrophysiologische Diagnostik	13
1.6	CF-assoziierte Leberbeteiligung	14
1.6.1	Pathophysiologie der Leberbeteiligung bei CF	15
1.6.2	Klinisches Bild der Leberbeteiligung bei CF	16
1.6.3	Diagnostik der CF-assoziierten Leberbeteiligung	18
1.6.3.1	Invasive Diagnostik: Leberbiopsie	19
1.6.3.2	Nicht-invasive Diagnostik	22
1.6.3.2.1	Klinische Untersuchung bei Leberbeteiligung	22
1.6.3.2.2	Indirekte Fibrosetests	23
1.6.3.2.3	Direkte Fibrosetests	27
1.6.3.2.4	Bildgebende Diagnostik	30
1.7	Lipocalin-2	32
2	Fragestellung	34
3	Patienten, Untersuchungsmaterial und Methoden	35
3.1	Patienten	35
3.2	Transiente hepatische Elastographie (TE)	37
3.2.1	Gerätfunktion und -prinzip des FibroScans 502®	37
3.2.2	Untersuchungsdurchführung	38
3.3	Laborgeräte und Materialien	40
3.3.1	Laborgeräte	40
3.3.2	Verbrauchsmaterialien	41

3.3.3	Chemikalien und Reagenzien.....	41
3.3.4	Kommerzielle Labor-Kits	41
3.4	Serumproben	42
3.4.1	Gewinnung und Lagerung der Serumproben	42
3.4.2	Routinelaboruntersuchung und Bestimmung der Leberparameter	42
3.5	Proteinbiochemische Methoden	42
3.5.1	Prinzipien der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).....	42
3.5.2	Sandwich-ELISA	43
3.5.3	Versuchsdurchführung des ELISA-Tests für Lipocalin-2	44
3.6	Lungenfunktionstest	45
3.7	Statistische Methoden und Auswertung	46
4	Ergebnisse	49
4.1	Demographische Daten der CF-Patientenkohorte.....	49
4.2	Ergebnisse und Merkmalsunterschiede der CFnoLD- und der CFLD-Gruppe im Altersvergleich.....	49
4.3	Klinische Daten der CF-Patientenkohorte	51
4.3.1	Ergebnisvergleich der Messung von Lipocalin-2	54
4.3.2	Ergebnisvergleich der transienten Elastographie (TE)	55
4.4	Analyse der pädiatrischen CF-Patientenkohorte	56
4.4.1	Ergebnisse der Lipocalin-2-Messung.....	56
4.4.2	Ergebnisse der transienten Elastographie (TE)	57
4.4.3	ROC-Analyse: Messgenauigkeit von Lipocalin-2, TE und Fibrosemarkern	58
4.5	Analyse der erwachsenen CF-Patientenkohorte.....	60
4.5.1	Ergebnisse der Lipocalin-2-Messung.....	60
4.5.2	Ergebnisse der transienten Elastographie (TE)	60
4.5.3	ROC-Analyse: Messgenauigkeit von Lipocalin-2, TE und Fibrosemarkern	61
4.6	Korrelationen von Lipocalin-2 mit den Vergleichsparametern	63
4.6.1	Zusammenhang von Lipocalin-2 und der TE.....	64
4.6.2	Zusammenhang von Lipocalin-2 und den Serumparametern	65
4.6.3	Zusammenhang von Lipocalin-2 und den Lungenparametern.....	66
4.7	Separierte Korrelation unter Ausschluss der Lungenbeteiligten.....	67
4.8	Relationen der Laborparameter und Messergebnisse zu ihren Grenzwerten....	71

5	Diskussion	73
5.1	Vergleich und kritische Hinterfragung der angewandten Methodik und des Patientenkollektivs	74
5.1.1	Kohortenstärke und ihre Vergleichbarkeit (Ziel- und Kontrollgruppen).....	74
5.1.2	Limitationen der Screeningmethoden für eine CFLD-Diagnostik.....	75
5.1.2.1	Kosteneffizienz und Diagnosegenauigkeit der transienten hepatischen Elastographie.....	75
5.1.2.2	Beurteilbarkeit der Leberbeteiligung mittels etablierter Laborparameter	78
5.1.2.3	Beurteilbarkeit der Leberbeteiligung mittels der Bestimmung von Lipocalin-2-mRNA und Lipocalin-2-Induktoren/-Regulatoren	81
5.2	Lipocalin-2 als Biomarker zur Früherkennung der Leberbeteiligung in der Akute-Phase-Reaktion	82
5.3	Einfluss der Lungenbeteiligung auf Lipocalin-2.....	86
5.4	Diagnostische Bedeutung von Lipocalin-2	87
5.5	Bedeutung von Lipocalin-2 als diagnostischer Marker in der Zielgruppe CF _{päd} ^{+lung}	88
5.6	Beantwortung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragen.....	91
5.7	Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchung.....	92
6	Ausblick	93
7	Zusammenfassung	94
8	Summary	96
9	Abkürzungsverzeichnis.....	98
10	Abbildungsverzeichnis	101
11	Tabellenverzeichnis	102
12	Literaturverzeichnis	103
13	Erklärung zur Dissertation	121
14	Anhänge.....	122

Genderhinweis

Allein aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde im Text die männliche Sprachform gewählt und auf die gleichzeitige Verwendung weiterer Formen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten für alle Geschlechter.

1 Einleitung

Die zystische Fibrose (*cystic fibrosis*, CF) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Bei homozygoter Erbfolge liegt eine Dysfunktion bzw. ein Mangel des epithelialen Ionenkanals *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) an sämtlichen exkretorischen Sekretionszellen des Körpers vor. Die Sekrete der besagten Drüsen weisen eine erhöhte Viskosität auf und können durch Obstruktion zur Schädigung des jeweiligen Organs führen.

Im deutschsprachigen Raum ist diese Erkrankung seit ihrer Erstbeschreibung (1938) als Mukoviszidose bekannt (lat.: *mucus* ‚der Schleim‘ und *viscidus* ‚klebrig‘ oder ‚zähflüssig‘).

Die zystische Fibrose ist eine organübergreifende Erkrankung, die neben Lunge und Leber auch das urogenitale System, das Pankreas, den Dünndarm und die Schweißdrüsen befällt [57, 142, 228].

Trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht gelungen ein Heilverfahren für die, im Falle einer Nichtbehandlung, letal verlaufende Erkrankung zu finden. Es konnten Teilerfolge erzielt und dadurch die eingeschränkte Lebenserwartung und Lebensqualität der CF-Patienten verlängert bzw. verbessert werden.

Zielführend für diese Teilerfolge ist eine frühzeitige Diagnosestellung der grundlegenden Stoffwechselerkrankung mit sofortiger Therapieeinleitung [185].

Neben dem Lungenbefall hat eine Leberbeteiligung (*liver disease*, LD) bei CF (CFLD) einen entscheidenden Einfluss auf die Morbidität und Mortalität. Wird die Leberbeteiligung klinisch auffällig sowie durch Laborparameter und Sonografie bestätigt, kann der bereits aufgetretene erhebliche Leberschaden durch sofortige Therapieeinleitung im besten Falle nur in seiner Progredienz aufgehalten, nicht aber behoben werden.

Solange es noch keine geeigneten Heilverfahren der Leberbeteiligung bei CF gibt, muss es das Ziel der Forschung sein, eine frühzeitige Diagnose der CF und insbesondere der CFLD zu gewährleisten. Durch eine sofortige Therapieeinleitung vor Symptomeintritt kann die Lebenszeit und Lebensqualität der zumeist jugendlichen Patienten signifikant verlängert bzw. verbessert werden.

1.1 Historische Entwicklung

„Wehe dem Kind, das beim Kuss auf die Stirn salzig schmeckt,
es ist verhext und muss bald sterben.“[200]

Mit diesem Satz beschrieb J.X. Pfyffer bereits 1848 die Problematik, die sich mit dem Krankheitsbild der zystischen Fibrose verbindet: Eine schwierige Diagnosestellung mit zugleich ungünstiger Prognose [200].

Die ersten Beschreibungen des klinischen Bildes der zystischen Fibrose, wie „salzig schmeckende Kinder“ [29], lassen sich bis in das Mittelalter zurückverfolgen. Es wurde von einem „verhexten Krankheitsbild“ [29] berichtet [29].

1595 beschrieb der niederländische Professor für Anatomie und Botanik, Peter Pauw, in seinem Obduktionsbericht über ein elfjähriges, damals scheinbar verhextes Mädchen erstmalig über das Phänomen des „geschwollenen und verhärteten sowie weißlich schimmernden Pankreas“ [115].

Zwischen dem 16. und 19. Jahrhundert erschienen weitere Berichte über derartige Hinweise wie vermehrtes Auftreten von Steatorrhö und Mekonium-Komplikationen in Verbindung mit einer Pankreasinsuffizienz [26–28, 222].

1905 publizierte Karl Landsteiner die erste Beobachtung einer Pankreatitis bei Mekoniumileus anhand einer Obduktion eines nach fünf Lebenstagen verstorbenen Mädchens mit aufgetriebenem Abdomen. Der „eingedickte Glaserkitt“ [154] gilt seitdem als pathognomonisch für die zystische Fibrose [115, 154, 205]. Damals wurden diese Symptome von zahlreichen Forschungsgruppen als „zöliakisches Syndrom“ bezeichnet. Sie beobachteten bei betroffenen Säuglingen mit Mekoniumileus eine häufig familiär gebundene Koinzidenz der Lungenbeteiligung [15].

Guido Fanconi und Kollegen beschrieben 1936 erstmalig den Zusammenhang des „Zöliakiesyndroms bei angeborener zystischen Fibromatose (Bindegewebswucherung) des Pankreas mit Bronchialbeteiligung“ [77].

1938 spezialisierte sich die US-amerikanische Pädiaterin und Pathologin Dorothy Andersen auf Gewebeeränderungen des Pankreas und weiterer Organe mit Schleimdrüsen. Sie grenzte diese Veränderungen eindeutig von der vermuteten Verknüpfung mit einer Zöliakie ab und betitelte diese erstmalig als eigenständiges Krankheitsbild der sogenannten „zystische Fibrose“ [3, 169, 280].

1944 führte der Pathologe Sidney Farber die genannten Symptome auf eine systemische Erkrankung zurück, welche eine Störung der exokrinen Drüsen verursacht. Farber etablierte den Terminus „Mukoviszidose“. Dieser setzt sich bis heute, abgesehen vom englischsprachigen Raum, in vielen Ländern durch [78, 79]. Zwecks Einheitlichkeit wird in dieser Arbeit von zystischer Fibrose bzw. *cystic fibrosis* (CF) gesprochen.

1946 wiesen Andersen und Hodges nach, dass es sich bei der zystischen Fibrose um eine genetische Mutation, speziell um eine autosomal-rezessive vererbare Stoffwechselerkrankung, handelt [4].

Die erhöhte Elektrolytkonzentration (insbesondere Chlorid) im Schweiß der betroffenen Patienten entdeckten 1953 Sant'Agnese und Kollegen. 1959 galt diese Entdeckung für Gibson *et al.* als das Fundament für die Entwicklung des Pilocarpin-Iontophorese-Schweißtests. Dieser Test stellt bis heute den Goldstandard der CF-Diagnostik dar [53, 232].

1981 publizierten Knowles *et al.* folgende plausible Erklärung für diesen erhöhten Elektrolytgehalt: Ein abnormer Spannungsunterschied wird von einer erhöhten Natrium-Ionen (Na^+)-Aufnahme des dysfunktionalen respiratorischen Epithels erzeugt. Daraus resultiert ein osmotischer Entzug von Wasser und eine erhöhte Viskosität des Mukus. Dies erklärt wiederum die erhöhte Affinität zu Bakterien [144, 145].

1983 konnte diese Theorie durch Quinton *et al.* bestätigt werden. Sie stellten an der Membran isolierter Schweißdrüsenausführungsgänge der betroffenen CF-Patienten eine niedrige Permeabilität für Chloridionen fest. Die Sekretion von Chlorid ist damit nicht mehr ausreichend möglich, sodass die Chlorid-Konzentration in dem Schweißdrüsenkanal ansteigt. Das Sekret besitzt somit keine osmotisch wirkenden Chloridionen, woraus eine hohe Viskosität resultiert [204, 205]. Bei der nun teilweise aufgeklärten Pathophysiologie gab es allerdings noch keine molekulargenetischen Kenntnisse über die autosomal-rezessive Erkrankung. Zahlreiche Forschungsgruppen versuchten eine molekulargenetische Funktionsbestimmung des identifizierten Gens zu finden [115].

1985 entdeckten Eiberg *et al.* und Knowlton *et al.* mithilfe von bestimmten Markern bei pädiatrischen CF-Patienten ein hochfrequent gehäuftes Auftreten von polymorphen Serum-Paroxinasen und einen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, welche mit dem CF-Gen verknüpft waren [74, 147]. Noch im selben Jahr erweiterten Tsui *et al.* die Kopplungsanalyse sowie die Genkartierung von Knowlton *et al.* auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q31) [147, 205, 258].

1989 publizierten u.a. Riordan *et al.* die Identifizierung sowie Klonierung des Genprodukts mittels sogenannter Chromosomenwanderung. Diese Methodik dient der Charakterisierung langer genomischer DNA-Abschnitte. Die Identifizierung und Klonierung des Genprodukts gelten als Meilenstein der CF-Forschung. Das identifizierte Membranprotein wurde als „Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator (CFTR)“ bezeichnet [133, 215, 224]. Bei nahezu jedem Patienten, der unter den verschiedenen klinischen Symptomen der zystischen Fibrose litt, konnte eine Läsion auf diesem CFTR-Gen nachgewiesen werden.

1991 wiesen Anderson *et al.* nach, dass es sich bei dem Produkt CFTR um einen Adenosin-3', 5'-Monophosphat (cAMP)-regulierten Chloridkanal handelt. Eine Mutation der Lysine an den Positionen 95 oder 335 hin zu sauren Aminosäuren veränderte die Selektivität des Kanals. Andersons Untersuchungen legten nahe, dass CFTR ein cAMP-regulierter Chloridkanal ist und dass die Lysine an Position 95 und 335 die Anionenselektivität bestimmen [5].

1992 widerlegten Bear *et al.* die Theorie, dass es sich bei dem CFTR-Protein um einen Regulator handelt und lieferten den ersten sicheren Beweis für einen mutierten cAMP-abhängigen Chloridkanal [12].

1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die zystische Fibrose erreicht weltweit unterschiedliche Inzidenzen.

In der kaukasischen Bevölkerung ist die CF mit einer Inzidenz von etwa 1:2500 der Lebendgeburten die häufigste lebenslimitierende autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung [59, 212]. Die Inzidenz in Deutschland beträgt etwa 1:3200-4800, während die zystische Fibrose in anderen Völkergruppen weniger häufig vertreten ist:

- amerikanische Bevölkerung 1:3500
- afrikanische Bevölkerung ca. 1:7000
- asiatische Bevölkerung (unterdiagnostiziert) ca. 1:4000-350000 [179, 183, 242, 244, 281]

Die weltweite Prävalenz beläuft sich auf über 70000 Individuen [40, 194]. In dem aktuellen Deutschen Mukoviszidose-Register (Stand 24.04.2020) sind 6340 CF-Patienten gelistet. Zu diesen kommen jährlich ca. 300 Neugeborene hinzu [184].

Bis heute sind über 2085 verschiedene Mutationen bekannt, welche die CFTR-Produktion, -Funktion oder -Stabilität beeinträchtigen. Die Anzahl der Sequenzvarianten nimmt kontinuierlich zu [21]. Die häufigste CF-verursachende Mutation ist die $\Delta F508$ -Mutation, auf die später näher eingegangen wird (siehe Kapitel 1.3). Weltweit besitzen etwa 90% der CF-Patienten diese Veränderung an mindestens einem CFTR-Allel. Gemäß des letzten Updates des „Patient Registry Annual Data Report (2018)“ [57] von der Cystic Fibrosis Foundation (USA) sind 44,2% der CF-Patienten homozygot für die $\Delta F508$ -Mutation [21, 57].

In der kaukasischen Bevölkerung ist eine Heterozygotenfrequenz von bis zu 1:20 zu beobachten. Durch den autosomal-rezessiven Erbgang besteht folglich für ein Kind, dessen Eltern beide heterozygote Merkmalsträger sind, eine 25%ige Wahrscheinlichkeit, homozygot zu sein und eine zystische Fibrose zu entwickeln [169, 240].

Bei 2940 (46,4%) der in Deutschland gelisteten CF-Patienten wurde eine homozygote $\Delta F508$ -Mutation nachgewiesen. Die Genotypisierung ergab bei 2504 (39,2%) der CF-Patienten eine Heterozygotie für die $\Delta F508$ -Mutation. In der gesamten deutschen Bevölkerung kommen ca. 5% heterozygote Merkmalsträger vor [177, 184].

Noch bevor die zystische Fibrose von anderen Stoffwechselerkrankungen klar abzugrenzen war (1938), wurde die Lebenserwartung ab dem Zeitpunkt der Diagnose auf nur sechs Monate geschätzt [60]. Aufgrund des von Gibson *et al.* etablierten Pilocarpin-Iontophorese-Schweißtests und der weiteren Fortschritte in der Genanalyse konnte die Diagnostik und damit die gezielte Therapie verbessert werden. Gemäß des aktuellen Deutschen Mukoviszidose-Registers [184] beträgt in Deutschland das mediane Sterbealter der CF-Patienten 33 (17-58) Jahre. Eine tendenzieller Anstieg der Lebenserwartung ist zu beobachten [53, 60, 184].

Bei der 1995 erstmalig erstellten bundesweiten Querschnittsanalyse wurde im Rahmen der CF-Diagnose nur bei knapp 40% der Neugeborenen innerhalb des ersten Lebensjahres eine zystische Fibrose diagnostiziert [247].

Nachdem in Deutschland 2016 das Neugeborenen-Screening zur Diagnose der zystischen Fibrose eingeführt wurde, stieg die Rate der Diagnosen im ersten Lebensjahr aktuell auf

68% an. Damit konnte die Therapie früher eingeleitet und eine Verbesserung der Prognose erzielt werden [68, 109, 184].

Die Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose (CFLD) ist eine weit verbreitete und bekannte Komplikation. Je nach Diagnostik wird die CFLD bei bis zu 2/3 der pädiatrischen bzw. erwachsenen CF-Patienten erkannt [17, 149, 153].

Nach wie vor gilt die Leberbeteiligung als die dritthäufigste Todesursache der CF-Patienten, die laut Studien bei über 30% der Patienten und Patientinnen in der ersten Lebensdekade eintritt. Aus diesem Grund ist die frühestmögliche Diagnosestellung für den Krankheitsverlauf entscheidend [47, 142, 153, 156].

1.3 Pathophysiologie der CFTR-Mutation

Die Pathophysiologie der CF ist auf die Mutation eines Gens zurückzuführen, welches den epithelialen Ionenkanal CFTR – ein aus 1480 Aminosäuren bestehendes Protein – codiert [133]. Die Mutation befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7, Locus 7q31-32. Das Gen codiert für ein integrales, membranständiges Protein, das den cAMP-regulierten Ionenkanälen sowie den (ABC)-Transportern zuzuordnen ist, deren gemeinsames Strukturelement eine Adenosintriphosphat-bindende-Kassette ist [133, 215, 224].

Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Aufbau des CFTR-Kanals. Der eigentliche Transportkanal umfasst zwei Untereinheiten (MSD 1 und 2), die jeweils aus sechs Transmembrandomänen bestehen. Für den erfolgreichen Chloridtransport muss eine Aktivierung der regulatorischen (R-) Domäne mittels Phosphorylierung durch eine (in Abbildung 1.1 nicht dargestellte) Proteinkinase A erfolgen. Die zwei ATP-abhängigen Nukleotid-Bindedomänen (NBD1 und 2) liefern durch die Spaltung von ATP die nötige Energie für den Pumpvorgang [36, 262]. Neben der Chlorid-Sekretion stellt der Bikarbonattransport eine weitere Funktion des CFTR-Kanals dar, welcher der Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten und der pH-Regulation dient [148, 230].

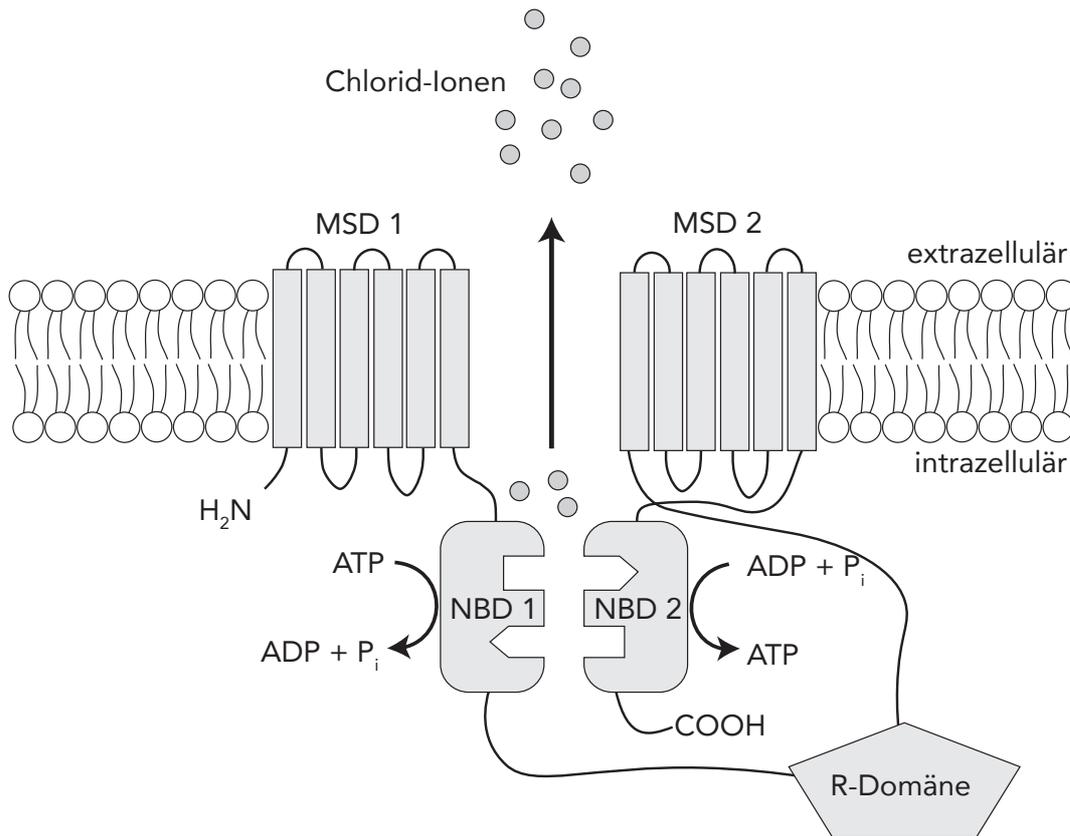


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des CFTR-Kanals, modifiziert nach [221]

Abkürzung: MSD = membran spanning domain; H₂N = Amino-Terminus; COOH = Carboxy-Terminus; NBD = Nukleotid-Bindedomäne; ATP = Adenosintriphosphat; ADP = Adenosindiphosphat; P_i = Phosphat-Ionen; R-Domäne = regulatorische Domäne

Seit des letzten Updates der Cystic Fibrosis Mutation Database sind 2085 verschiedene CFTR-Mutationen bekannt [223]. Laut des WHO-Reports [267] und der Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der zystischen Fibrose [250] sowie des Deutschen Mukoviszidose-Registers [184] sind europaweit 22-87% und deutschlandweit über 70% der Mutationen der $\Delta F508$ zuzuordnen [184, 223, 250].

$\Delta F508$ ist das Kürzel für die Mutation, welche auf eine spezifische Deletion, In-Frame-Deletion (Δ), von drei Basenpaaren im Exon 10 zurückzuführen ist und sich in dem Wegfall eines Phenylalaninrests (F) an der Aminosäureposition 508 äußert [58, 133, 148, 272].

Die physiologische Funktion des CFTR-Kanals in den exokrinen Epithelzellen, die Sekretion von Chlorid- und Natriumionen, ist durch die Mutation nicht mehr gegeben. Aus dieser verringerten Konzentration resultiert der kritisch verminderte osmotische Effekt, welcher zu einem reduzierten Wassergehalt des jeweiligen Sekrets führt.

Es folgt die Bildung eines zähen Mukus mit extrem hoher Viskosität, welcher den perfekten Nährboden für eine Infektion bildet [266].

1.4 Klinisches Bild und Symptome der CF

Das Erscheinungsbild der zystischen Fibrose ist vielseitig und wechselhaft, weswegen klare Manifestationsorte sowie -zeitpunkte nicht vorliegen. Während bei einigen Patienten über Jahre ein asymptomatischer Verlauf zu beobachten ist, sind bei Säuglingen und pädiatrischen Patienten teilweise bereits schon frühzeitig klinische Auffälligkeiten zu finden. Typische Symptome konzentrieren sich auf eine pulmonale, hepatische oder pankreatische Beteiligung [185].

Symptome bei pulmonaler Manifestation sind rezidivierende Pneumonien, atypisches Asthma, wiederkehrendes Giemen oder Keuchen (*wheezing*), Dyspnoe und thorakaler Schmerz. Eine hepatische und/oder pankreatische Beteiligung äußert sich meist in einem Mekoniumileus (7-10%), intestinaler Obstruktion, chronischer Diarrhö, Steatorrhö, Flatulenzen, abdominalen Schmerzen, gastrointestinalen Blutungen, Juckreiz, Diabetes mellitus und Malnutrition verbunden mit Wachstumsstörungen [105, 240].

Eine Lungenbeteiligung bei zystischer Fibrose geht mit einer bis zu 85%igen Morbiditäts- sowie Mortalitätsrate einher und repräsentiert somit die Hauptmanifestation dieser Erbkrankheit [83, 174].

Durch die verringerte Viskosität des Mukus wird eine persistierende Entzündung der Lungenanteile herbeigeführt, welche Destruktionen und Geweberemodelling provozieren. Dadurch wird die mukoziliäre Reinigung bzw. der Abtransport (*Clearance*) gehemmt und folglich die Ausschwemmung von Bakterien (z.B. aus den Atemwegen) verringert [96, 225]. Die so geschädigte und infizierte Lunge ist sehr empfänglich für endobronchiale, bakterielle Infektionen mit u.a. *Pseudomonas aeruginosa* und/oder *Burkholderia cepacia*-Komplex. Irreversible Bronchialobstruktionen, -ektasien oder sogar endgültiges Lungenversagen können die Folge sein [85, 150]. Die Patienten klagen über episodenhaften, teilweise produktiven Husten, verbunden mit Gewichtsverlust, Anorexie und Fatigue. Dieser Symptomkomplex wird als „pulmonale Exazerbation“ bezeichnet [83].

Eine Beteiligung des Urogenitalsystems kann sich in einer verschobenen und/oder ausbleibenden Ausbildung von sekundären Geschlechtsmerkmalen zeigen.

Ein Hodenhochstand oder eine Hydrozele werden beim männlichen Geschlecht beobachtet, während beim weiblichen Geschlecht meist eine Amenorrhö vorliegt. Zudem liegt aufgrund der möglichen fehlenden Anlage der *Vasa deferentes* beim männlichen Geschlecht häufig eine Sterilität oder Infertilität vor. Die Fertilität bei weiblichen Patienten kann jedoch uneingeschränkt bleiben. Des Weiteren weist die Nasenschleimhaut neben einer *Rhinitis* Nasenpolypen auf [240].

1.5 Diagnostik der CF

Die Diagnose der CF ist bezüglich einer Verbesserung der Prognose so früh wie möglich zu stellen. Je früher die Diagnose CF gestellt wird, desto eher kann die Therapie eingeleitet und damit die Prognose verbessert werden.

Laut der 026/023-S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ [185] und der Handlungsempfehlung nach Nährlich *et al.* [186] müssen für die Diagnose der zystischen Fibrose mindestens ein „diagnostischer Hinweis“ [185] und ein Nachweis der CFTR-Funktionsstörung vorliegen [185, 186].

Unter „diagnostischer Hinweis“ ist Folgendes zu verstehen:

- ein positives Ergebnis im Neugeborenen Screening,
- klinische Hinweise wie chronische sinopulmonale, gastrointestinale Erkrankungen, das Salzverlustsyndrom oder eine genitale Erkrankung wie die obstruktive Azoospermie,
- eine positive Familienanamnese mit Geschwistern, die an CF erkrankt sind [185].

Die CFTR-Funktionsstörung kann mittels Nachweis von zwei CF-zugrundeliegenden CFTR-Mutationen, erhöhter Schweißchloridwerte von ≥ 60 mmol/l in mindestens zwei unabhängigen Messungen sowie mittels nasaler Potentialdifferenz (NPD) oder intestinaler Kurzschlussstrommessung (ICM) erkannt werden [16, 145, 185].

Um die Hospitalisierungsrate zu senken und die Prognose der CF-Patienten zu verbessern, ist eine frühestmögliche Diagnose Voraussetzung [41].

In Abbildung 1.2 ist die Handlungsempfehlung als Algorithmus bei klinischem Verdacht auf CF anschaulich dargestellt.

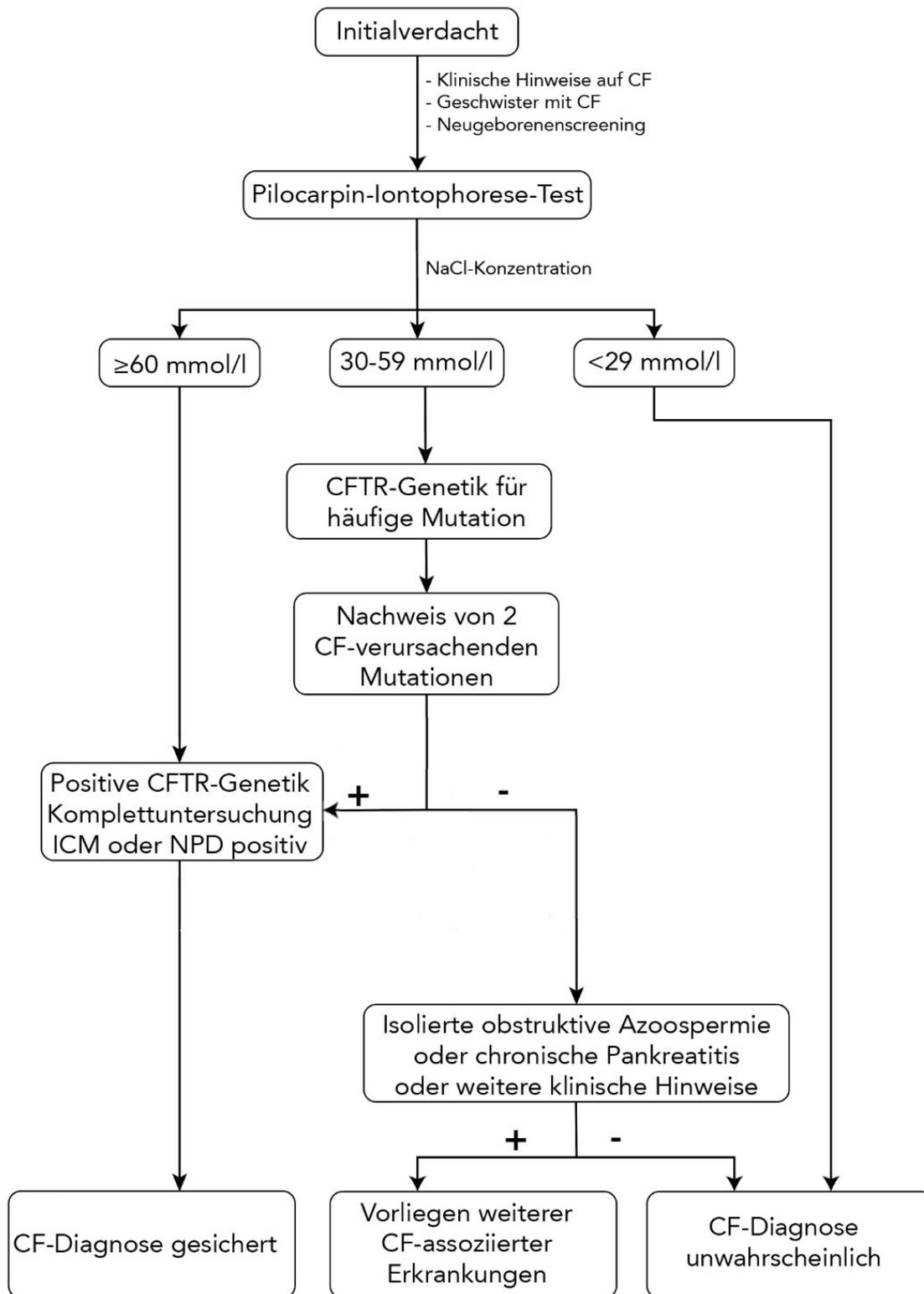


Abbildung 1.2 Algorithmus der Handlungsempfehlung zur CF-Diagnose, modifiziert nach [186, 268]

Abkürzungen: CF = zystische Fibrose; CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; NaCl = Natriumchlorid; ICM = intestinale Kurzschlussstrom-Messung; NPD = nasale Potentialdifferenzmessung

1.5.1 Klinische Diagnostik

Die klinisch gestellte CF-Diagnose wird nur als Arbeitsdiagnose verstanden, da der Nachweis klinischer Manifestationen von CF krankheitshinweisend aber nicht krankheitsdefinierend ist. Erst nach Einsatz apparativer Diagnostika bzw. Labortechniken kann die klinisch gestellte Arbeitsdiagnose bestätigt oder verworfen werden [268].

1.5.2 Neugeborenen-Screening

Noch bevor typische Symptome einer CF auftreten, kann die CF durch das seit 2016 erweiterte Neugeborenen-Screening (NBS) mittels einer effektiven, effizienten und wenig invasiven Messung erkannt werden. Damit wurde bereits eine Prognoseverbesserung für die betroffenen Patienten erreicht [109, 268]. Bis zur Einführung des NBS für Mukoviszidose wurde nur bei 55% (Stand 2015) der Neugeborenen innerhalb des ersten Lebensjahrs ein Screening durchgeführt. Auch sind nur klinisch auffällige Patienten oder von CF betroffene Verwandte auf genetische Veränderungen getestet worden [183, 283].

Die häufigsten Screeningverfahren lassen sich in zwei Schritte einteilen, bei welchen jeweils das Pankreasenzym Immunreaktives Trypsin (IRT) im Kapillarblut des Neugeborenen mit einer hohen Sensitivität (85,7%) und hohen Spezifität (99,8%) als Initialmessung bestimmt wird [99, 183].

Die Ergebnisse sind wie folgt einzuordnen:

- >99,9. Perzentile: positiv
- 99-99,9. Perzentile: weitere Tests folgen zur Validierung
- <99. Perzentile: negativ

Bei unklar erhöhten IRT-Werten bieten sich weitere Möglichkeiten zur Validierung wie der IRT/DNA-Test, die IRT/IRT-Methode oder das IRT/PAP-Verfahren an.

Im IRT/DNA-Test folgt nach unklar erhöhten IRT-Werten die genetische Analyse für die in Deutschland häufigsten 31 CFTR-Mutationen. Die IRT/IRT-Methode beinhaltet eine Wiederholung der IRT-Messung nach zwei Wochen [183, 217, 275].

In einem weiteren Verfahren, der sogenannten IRT/PAP, schließt sich nach einem erhöht gemessenen IRT-Wert die Messung des Pankreatitis-assoziierten Proteins (PAP) zur Validierung des Testergebnisses an [244].

Positiv prädiktive Werte (PPV) liegen bei diesen Verfahren allerdings nur bei unter 20%. Demnach kann nur bei jedem fünften Kind mit kontrollbedürftigen Werten auch tatsächlich die zystische Fibrose nachgewiesen werden [268]. Ein zeitnahe Schweißtest (Pilocarpin-Iontophorese-Test) ist zur Validierung des Testergebnisses erforderlich [81].

1.5.3 Der Schweißtest

Bei auffälligem Neugeborenencreening, klinischen Symptomen oder positiver Familienanamnese, schließt sich in dem CF-Diagnose-Algorithmus der Schweißtest als Bestätigung, aufgrund der häufig falsch positiven Ergebnisse der vorab genannten Verfahren, an [81, 268].

Der Schweißtest ist ein kostengünstiger, nicht-invasiver und auch von Neugeborenen gut tolerierbarer Test, welcher eine 96,5%ige Sensitivität sowie eine 99%ige Spezifität aufweist. Der Schweißtest ist somit die Messmethode der Wahl [16, 183]. Die Probenentnahme, Aufbereitung sowie quantitative Analyse erfolgen nach Angaben der CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)-Leitlinie [158].

Grundlegend beruht der von Gibson und Cooke (1959) etablierte Schweißtest auf dem Nachweis des erhöhten Gehalts von Natrium- und Chloridionen im Schweiß der Patienten [95, 180]. Die Hautstimulation erfolgt nach fünf Minuten durch das Parasympathomimetikum Pilocarpin per Iontophorese. Die Chloridkonzentration wird nach 30 Minuten durch einen sogenannten Chloridometer an zwei verschiedenen Hautstellen gemessen [152].

Laut der CF Foundation Consensus-Leitlinie [131] sind die Ergebnisse wie folgt zu bewerten:

- ≤ 29 mmol/l: Normalbereich (CF unwahrscheinlich)
- 30-59 mmol/l: Kontrollbereich (weitere CF-Diagnostik erforderlich)
- ≥ 60 mmol/l: Diagnose CF (Diagnosesicherung per molekulargenetischer Diagnostik)

1.5.4 Genetische Diagnostik

Die genetische Diagnostik schließt sich erst bei unklarem (Na^+ -Konzentration 30-59 mmol/l) oder auffälligem (Na^+ -Konzentration ≥ 60 mmol/l) Befund im Schweißtest an [16, 80]. Bei Schweißtest-Werten von ≥ 60 mmol/l dient die molekulargenetische Diagnostik der Diagnosesicherung. Werte im Kontrollbereich (Na^+ -Konzentration 30-59 mmol/l) werden durch den molekularen Nachweis von mindestens zwei CFTR-Mutationen in trans-Isomerie als sichere Diagnose angesehen [185, 186].

Laut des deutschen Gendiagnostikgesetzes [25] sowie der S2-Leitlinie Humangenetischer Diagnostik [65] wird für die genetischen Untersuchungen eine Aufklärung sowie eine genetische Beratung der Patienten vorausgesetzt [25, 65, 185]. Die prädiktive genetische Untersuchung bei Eltern von Patienten mit bereits nachgewiesener CFTR-Mutation ist als Diagnosesicherung der vermuteten kombinierten/komplexen-Heterozygotie oder Homozygotie des CF-Patienten indiziert [25, 185]. Hingegen ist eine allgemeine Heterozygotentestung bei gesunden Kindern nicht vorgesehen [25]. Nach aktuellen Angaben der Clinical and Functional Translation of CFTR (2020) [40] und der Cystic Fibrosis Mutation Database (2011) [223] sind von den 2085 verschiedenen CFTR-Mutationen nur 352 für eine krankheitsverursachende Mutation aufgelistet [40, 223].

Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Mutationen steht u.a. in einer Abhängigkeit zu der Ethnizität, welche z.B. in dem WHO-Report von 2004 aufgeführt ist. Der Großteil der in Deutschland nachgewiesenen Mutationen mit einer Häufigkeit von $\geq 1\%$ sind: $\Delta F508$, N1303K, G542X, R553X, G551D und R347P [39, 267].

1.5.5 Elektrophysiologische Diagnostik

Patienten, bei denen keine klaren Ergebnisse zur Diagnosesicherung aus dem Neugeborenen-Screening, Schweißtest (Kontrollbereich von 30-59 mmol/l) und aus der genetischen Untersuchung (fehlender Nachweis von mindestens zwei Mukoviszidose-verursachenden CFTR-Mutationen) hervorgehen, werden elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen [31, 80, 185].

Für diese elektrophysiologische Diagnostik bietet sich die nasale Potentialdifferenz (NPD)-Messung und Intestinale Kurzschlussstrom-Messung (ICM) als mögliche Differenzierungsmaßnahme zwischen „CF positiv“ und „CF unwahrscheinlich“ an [16, 80, 98, 176].

Beide Messungen basieren auf bioelektrischen Potentialdifferenzen in chloridfreier Lösung, welche durch Inhibierung von epithelialen Natriumkanälen durch Amilorid und der Stimulation von cAMP-abhängigen CFTR-vermittelten Chloridtransportern erzeugt werden. Diese Differenzen ergeben Aufschluss auf die CFTR-Funktion [11, 38, 173, 227, 238].

Die NPD-Messung erfolgt *in vivo* zwischen einer kutanen Referenzelektrode und einer auf dem respiratorischen Epithel der inferioren Nasenmuschel platzierten Elektrode. Es wird die Chloridsekretion in Ruhe und in Reaktion auf Stimulatoren des Chloridkanals (Isoproterenol, einem β -Agonisten und Noradrenalin-Derivat) gemessen [146]. Anhand der ICM wird die bioelektrische Potentialdifferenz *ex vivo* an fünf bis sechs oberflächlicher Rektumschleimhaut-Biopsien unter Zugabe von Chloridkanal-Aktivatoren (IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) und Forskolin) berechnet [11, 38, 227, 238].

Die Kombination aus beiden Ergebnissen erwies sich als bester Testparameter für die CFTR-Funktionsbestimmung [11].

1.6 CF-assoziierte Leberbeteiligung

Die zystische Fibrose (CF) assoziierte Leberbeteiligung (CFLD) ist mit einer Mortalität von aktuell 3,4% (2018) verbunden und stellt nach der Lungenbeteiligung und den Komplikationen nach einer Organtransplantation die dritthäufigste Todesursache der CF dar [57, 142, 228].

CFLD weist eine Vielzahl von hepatobiliären Abnormalitäten auf, bei denen die biliäre Zirrhose am relevantesten ist. Dies ist auf ihre hepatische Ausbreitung von initial fokal zu multilobulär zurückzuführen. Eine daraus resultierende portale Hypertension (PHT) mit weiteren klinischen Komplikationen ist möglich [17, 62]. Klinische Zeichen sind erhöhte Leberenzyme, neonatale Cholestasen und Cholangiopathien [128]. Die Prävalenz der CFLD erreicht einen Anteil von 2 bis 68% der CF-Patienten, bei denen biochemische und/oder sonografische Nachweise einer Leberbeteiligung bereits in der ersten Lebensdekade festzustellen sind [17, 44].

1.6.1 Pathophysiologie der Leberbeteiligung bei CF

Der CFTR-Kanal ist in der Leber an der apikalen Membran des biliären Epithels und der Cholangiozyten lokalisiert. Dieser Kanal reguliert durch die biliäre Chloridsekretion und den daraus entstehenden osmotischen Effekt den Gallenfluss [43, 137]. Ist diese Funktion gestört oder nicht gegeben, kommt es zu einer abnormalen Mucinproduktion, was in einer Akkumulation und einer Ausfällung der hyperviskösen (zähen) Gallenflüssigkeit resultiert [167, 196]. Die eingedickte, konzentrierte und damit toxische Gallenflüssigkeit in den Gallengängen provoziert rezidivierende Entzündungen in den Cholangiozyten und Hepatozyten [69]. Die Verlegung der Gallengänge und die Akkumulation der Entzündungsmediatoren der eosinophilen Granulozyten sind frühe, zytologische Merkmale, die bei Säuglingen und Kindern mit zystischer Fibrose nachzuweisen sind [190]. Die rezidivierenden Schädigungen auf zellulärer Ebene aktivieren mutmaßlich die Kupfferzellen sowie die hepatischen Sternzellen (früher Itozellen genannt). Diese Zellen synthetisieren daraufhin vermehrt profibrinogene Zytokine (z.B. der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- β)), was eine vermehrte Kollagensynthese zur Folge hat und in einer Leberfibrose oder im weiteren Verlauf in einer -zirrhose enden kann [162, 167, 243].

Dem gegenüber steht die Absorption und Retention hydrophober Gallensäuren verursacht durch die erhöhte intestinale Permeabilität bei CF als eine weitere Theorie der Pathogenese der CFLD. Die toxischen Gallensäuren lösen eine Sekretion proinflammatorischer und profibrogenen Zytokine aus, wodurch eine Fibrose oder Zirrhose verursacht werden kann [6, 138, 203].

Die histologischen Umbauvorgänge, die zu irregulären und nekrotischen Cholangiozyten und periduktalen Kollagenablagerungen führen, gelten als erste Schritte der Entwicklung der periportalen Fibrose und konnten regelmäßig bei CF-Patienten elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [51, 168]. Der zunächst am Gallengangsepithel beginnende lokal begrenzte Fibroseprozess entwickelt sich zur fokale biliären Zirrhose, welche sich weiter zur multilobulären Zirrhose über die gesamte Leber ausbreiten kann [168].

Die Pathologie der CFLD beinhaltet sämtliche hepatischen Veränderungen. Zu diesen gehören neben erhöhten Leberenzymen u.a. eine hepatische Steatose, eine Cholangiopathie, eine neonatale Cholestase, eine fokale biliäre bis multilobuläre Zirrhose und folglich eine portale Hypertension, welche Ösophagusvarizen und eine

Splenomegalie zur Folge haben kann [61, 128]. Die hepatische Steatose besitzt mit 23-75% die höchste Prävalenz bei CF-Patienten aller Altersgruppen [113, 164].

Es liegt kein Zusammenhang zwischen der spezifischen CFTR-Mutation und dem Auftreten der Entwicklungsgeschwindigkeit oder dem Schweregrad der Leberbeteiligung vor [45, 86, 271]. Angenommen wird ein multifaktorieller Prozess. Zu diesem gehören sogenannte Nicht-CF-Modifier-Gene, welche unabhängig von dem CFTR-Gen vererbt werden können. Es wird vermutet, dass diese polymorphen Gene Entzündungen, oxidativen Stress sowie Fibrose verstärken und eine erhöhte Anfälligkeit für eine Leberbeteiligung verleihen [51, 270].

Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer Leberbeteiligung sind vielfältig und werden kontrovers diskutiert. Zu den Risikofaktoren gehören das männliche Geschlecht, schwere CFTR-Mutationen, ein Mekoniumileus, eine Pankreasinsuffizienz bzw. eine späte Diagnosestellung [47, 82, 271].

1.6.2 Klinisches Bild der Leberbeteiligung bei CF

Über ein Drittel der CF-Patienten entwickeln bereits in ihrer ersten Lebensdekade eine Leberbeteiligung, die häufig zunächst asymptomatisch verläuft. Meist weist diese Leberbeteiligung eine langsame, aber stetige Progredienz auf, sodass sie erst im Erwachsenenalter symptomatisch wird [270].

Hinweise auf eine Leberbeteiligung ergeben sich häufig durch den klinischen Tastbefund oder die sonografische Diagnostik der Hepatomegalie – mit oder ohne Splenomegalie [62].

Die höchste Prävalenz der Leberbeteiligung bei erwachsenen CF-Patienten erreicht die hepatische Steatose. Die Leberzirrhose und -insuffizienz, die das Endstadium des Fibroseprozesses und den am meisten befürchteten Komplikationen bedeuten, weisen eine Inzidenz bei erwachsenen CF-Patienten von 1,5-25% auf. Die Leberzirrhose geht größtenteils mit einer portalen Hypertension verbunden mit möglicher Ausbildung portokavaler Anastomosen einher. In 20-50% der Fälle werden Ösophagusvarizen beobachtet, welche eine hohe Mortalitätsrate aufgrund der erhöhten Blutungsgefahr besitzen [63, 97, 122]. Es kann zur Ausbildung weiterer portokavaler Umgehungskreisläufe wie über die *Venae paraumbilicales (Caput Medusae)* oder über das venöse Geflecht des *Corpus cavernosum recti* mit Hämorrhoidalleiden kommen.

Aszites oder die bereits erwähnte Splenomegalie repräsentieren häufige Nebenbefunde. Aufgrund des lienalen Umgehungskreislaufs kann sich ein Hypersplenismus entwickeln, welcher sich entsprechend mit Laborveränderungen (z.B. eine Thrombozytopenie) äußert. Klinische Symptome wie Leistungsabfall, Dyspnoe, Immunschwäche sowie Blutgerinnungsstörungen mit petechialen Blutungen können auftreten [161, 249, 278].

Die Leberzirrhose, verbunden mit einer portalen Hypertension, erhöht das Risiko für die Manifestation verschiedener extrahepatischer Komplikationen. Darunter sind Komplikationen in Form einer Verschlechterung des respiratorischen Status über eine Malnutrition bis hin zum CF-assoziierten Diabetes Mellitus zu verstehen [13, 51].

Durch die Hepatomegalie, den erhöhten Pfortaderdruck und die Aszites-induzierte Diaphragmaeinengung können sich intrapulmonale Shunts bilden, welche die Atemfunktion nachteilig beeinflussen. Rezidivierende respiratorische Infektionen durch multiresistente und/oder nosokomiale Keime sind häufig die Folge [48].

Analog zu der Gallengangobstruktion und den Alveolen/Bronchiolen verstopft im Pankreas das verdickte Sekret die *Ductus pancreatici*. Daraus folgt eine Entzündungsreaktion bis zum chronischen Entzündungsprozess mit einem fibrotischen Umbau der Bauchspeicheldrüse [2, 13]. Dieser fibrotische Umbau führt zu einer exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz [2, 13, 165, 264]. Die zuletzt genannte endokrine Pankreasinsuffizienz äußert sich zunächst in einer Glukoseintoleranz, später in einem CF-assoziierten Diabetes mellitus [13]. Ebenso induziert die Cholestase und insuffiziente Produktion der exokrinen Pankreasenzyme eine Maldigestion, die gleichzeitig verbunden mit der Malabsorption eine gestörte Resorption und Metabolisierung der Nährstoffe zur Folge hat [161, 197, 259].

Die multifaktorielle Pathogenese der Malnutrition bei CF-Patienten mit Leberbeteiligung basiert zu einem Großteil auf dem erhöhten Energie- bzw. Nährstoffverlust sowie auf der verminderten Energiezufuhr durch limitierte orale Nahrungsaufnahme aufgrund von gastrointestinalen, CF-assoziierten Beschwerden (wie Oesophagitis, Obstipation oder extrahepatische Gallengangobstruktion). Zudem besteht ein erhöhter Energieverbrauch durch einen chronischen Entzündungsprozess, vermehrte Atemarbeit bei Lungenbeteiligung und mögliche Medikamentennebenwirkung. Vermutet wird auch ein direkter energieverbrauchender Effekt des CF-Gens auf den basalen Metabolismus [197, 248].

Die mangelhaft zur Verfügung stehende Energie beeinträchtigt die respiratorische Muskelfunktion und verschlechtert den respiratorischen Status. Zudem bewirkt die

verringerte Energie ein eingeschränktes Wachstum und ein abgeschwächtes Immunsystem bzw. einen möglichen Immundefekt. Die genannten Aspekte können zur Verringerung der Lebensqualität und Lebenserwartung führen [70, 197, 259].

Für den Knochenumsatz und den Aufbau der Knochenmineraldichte ist der Bedarf an Kalzium, Phosphaten und fettlöslichen Vitaminen (insbesondere Vitamin D und K) durch die Mangelernährung nicht gedeckt. Das Risiko für die Entwicklung einer Osteopenie oder Osteoporose steigt entsprechend [52, 62, 124, 157, 167, 198].

1.6.3 Diagnostik der CF-assoziierten Leberbeteiligung

Die Diagnostik der Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose basiert auf den Säulen:

- allgemeine routinemäßige körperliche Untersuchung,
- biochemische Leberfunktionstests,
- bildgebende Verfahren,
- Leberbiopsie [62, 196].

Für die Diagnose einer Leberbeteiligung und der Unterscheidung zwischen CFnoLD und CFLD stützt sich die klinische Studie, welche dieser Dissertation zugrunde liegt, auf die von Debray *et al.* festgelegten Diagnosekriterien.

Von diesen müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien zutreffen:

- eine klinisch feststellbare Hepatomegalie mit/ohne Splenomegalie,
- zwei abnormale Leberenzymwerte im Serum (ALT, AST, γ -GT),
- ein sonografischer Nachweis von weiteren Abnormalitäten der Leber wie z.B. eine inhomogene Echogenität aufgrund von erhöhten Impedanzsprüngen, Regeneratknötchen, ungleichmäßige Leberrandwinkel oder Anzeichen für eine portale Hypertension [62].

1.6.3.1 Invasive Diagnostik: Leberbiopsie

Die Leberbiopsie ist immer noch der Goldstandard für die Diagnostik der Leberbeteiligung bei CF-Patienten [54, 142]. Neben der Diagnose können Informationen über die Ätiologie, Chronizität, den Grad der entzündlichen Aktivität (Grading) und dem Fibrosestatus (Staging) gewonnen werden [22, 235].

Eine Leberverfettung und die fokale bzw. multilobuläre, biliäre Zirrhose werden somit erfasst, woraus Aussagen über den fibrotischen Umbauprozess der Leber getroffen werden können [202].

Insbesondere bei nicht eindeutigen Befunden (unklare Anamnese, fehlende oder auch normwertige serologische und biochemische Befunde) ist die Leberbiopsie anderen Diagnostika überlegen und besitzt eine hohe prädiktive Bedeutung für die Therapieentscheidung und die Prognose [110, 235].

Die Entnahme der Leberbiopsie sowie ihre Aufarbeitung, Begutachtung und Beurteilung erfolgt unter den nachfolgend genannten technischen Voraussetzungen:

- klinischer und serologischer Untersuchungsauftrag inklusive aller relevanten klinischen Fragestellungen und Daten und serologischen Parametern,
- mindestens acht Schnittstufen,
- Zylinderform, mehrere Portalfelder: ≥ 15 mm Länge, 1,2-1,8 mm Durchmesser,
- unmittelbare Fixation (Standardfixans: neutralgepufferte 2,5- bis 4%ige Formaldehydlösung \cong 6,25- bis 10%iges Formalin),
- adäquate Färbungen (HE-, Eisen- und Faserfärbung, zusätzlich empfohlen: PAS-D-Färbung),
- Einteilung in Chronizität, Grading, Staging und Ätiologie [235].

Zwar besitzt die Leberbiopsie eine diagnostische Überlegenheit mit einer hohen prädiktiven Bedeutung, geht aber durch die Invasivität und damit verbunden möglichen Schmerzen mit einigen Komplikationen, Risiken und Einschränkungen einher. Folglich sollte diese nicht routinemäßig empfohlen und eingesetzt werden. Bei 0,6-5% der Patienten treten Komplikationen wie Unbehagen, Sedierungsnebenwirkungen, Infektionen und Blutungen auf. Außerdem muss diese Untersuchung bei Kindern zumeist in Narkose durchgeführt werden. Die genannten Risiken führen zu einer eingeschränkten

Akzeptanz der Diagnostik, sodass die Leberbiopsie nur beim Versagen anderer, nicht-invasiver Verfahren eingesetzt werden sollte [104, 161, 170].

Der fibrotische Umbau des erkrankten Lebergewebes verläuft inhomogen und in frühen Krankheitsstadien fokal und periportal begrenzt. Durch das ca. 15 mm lange Biopsat werden formal nur ca. 1/50.000 des Lebervolumens erfasst. Diese geringe Biopsiemenge kann zu Stichproben- oder Interpretationsfehlern führen. Zudem ist eine hohe Intra- und Interobserver-Variabilität durch unterschiedliche Zeitpunkte oder verschiedene Untersucher gegeben [208]. Der Schweregrad der Leberbeteiligung wird somit häufig unterschätzt und/oder falsch eingeteilt. Daher kann nur eine mehrfach durchgeführte Biopsie eine Sicherung der Diagnose gewährleisten [114, 161, 164]. Im Vergleich zum laparoskopischen Vorgehen verfehlt die perkutane Leberbiopsie in 10-30% der Fälle das erkrankte Parenchym. Dies erklärt die Diskrepanz von mindestens einem Fibrorestadium zwischen der Biopsie und dem tatsächlichen Befund [193, 237]. Nach einer Leberbiopsie wiesen 33,1% der Patienten mindestens einen unterschiedlichen Fibrorestadium zwischen dem rechten und linken Leberlappen auf. Bei ca. 45% der Patienten sind sogar abweichende Fibrorestadien bei zwei aufeinanderfolgenden Punktionen in unmittelbarer Nähe festzustellen. Es handelt sich hierbei um mögliche Stichprobenfehler [214, 241].

Die Aussagekraft der Leberbiopsie leidet überdies unter uneinheitlichen histologischen Einschätzungen, bei denen der kontinuierliche Verlaufsprozess der Fibrosierung in ein ordinalskaliertes Punktesystem übertragen wird. Daraus resultiert zwangsläufig eine Inkongruenz der Beurteilung und Einteilung in die Fibrorestadien [171].

Die am häufigsten angewandten Klassifikationssysteme lauten:

METAVIR, Knodell, Desmet & Scheuer und Ishak [64, 121, 143, 255].

In der nachfolgenden Tabelle 1.1 sind die Fibrorestadien F0-F4 (bzw. nach Ishak F0-F6) aufgeführt und den einzelnen Klassifikationen zugeordnet. Eine signifikante Fibrose besteht ab dem Stadium F2 (Ishak F3). Stadium F3 (Ishak F4) definiert eine schwere Fibrose. Eine definitive Zirrhose wird als F4 (Ishak F5/6) bezeichnet [245].

Neben der geminderten Aussagekraft der Leberbiopsie durch die uneinheitlichen histologischen Systeme, geht die Leberbiopsie mit erhöhten Kosten einher. Diese entstehen durch den invasiven Eingriff per se mit einem hohen Personalaufwand (Anästhesie, Chirurgie, Pädiatrie) und einem Krankenhausaufenthalt von mindestens 6-18 h [274].

Tabelle 1.1 Histologische Klassifikationssysteme zur Einschätzung und Einteilung der Fibrosestadien hier am Beispiel der Virushepatitis, modifiziert nach [171]

<i>Fibrose-</i> <i>stadium</i>	<i>METAVIR</i>	<i>Knodell</i>	<i>Desmet & Scheuer</i>	<i>Ishak</i>
<i>0</i>	Keine Fibrose	Keine Fibrose	Keine Faservermehrung	Keine Fibrose
<i>1</i>	Portoportale Faservermehrung	Portoportale Faservermehrung	Portoportale Faservermehrung, keine Septenbildung	Wenig portale Faservermehrung ± Septenbildung
<i>2</i>	Portoportale Faservermehrung, inkomplette Septenbildung	-	(In-)komplette portoportale Septen, erhaltene Architektur	Viel portale Faservermehrung, ± Septenbildung
<i>3</i>	(In-) komplette Septen ohne Zirrhose	Portoportale oder portozentrale Septenbildung	Septenbildende Faservermehrung, veränderte Architektur	Portale Faservermehrung mit portoportalener Septenbildung
<i>4</i>	Zirrhose	Zirrhose	Zirrhose	Portale Faservermehrung mit ausgeprägten portoportalenen oder portozentralen Septen,
<i>5</i>	-	-	-	Ausgeprägte portoportale oder portozentrale Septenbildung, inkomplette Zirrhose (einzelne Knoten)
<i>6</i>	-	-	-	Zirrhose

Zeichen und Abkürzungen: - = keine Einteilung; ± = mit oder ohne

1.6.3.2 Nicht-invasive Diagnostik

Der Leberbiopsie als invasive Diagnostik stehen eine Reihe von nicht-invasiven Verfahren gegenüber, bei denen eine ubiquitäre Beurteilung der Leber ohne Risiken und Komplikationen möglich ist.

1.6.3.2.1 Klinische Untersuchung bei Leberbeteiligung

Die Leberbeteiligung bei CF-Patienten macht sich aufgrund ihres zunächst subklinischen Verhaltens bei der routinemäßigen körperlichen Untersuchung erst bemerkbar, wenn pathologische Veränderungen dominieren bzw. so ausgeprägt sind, dass daraus eine Organvergrößerung resultiert [62]. Die Hepatomegalie ist ein weit verbreitetes klinisches Bild bei den CF-Patienten, obwohl Leberfunktionstests noch normale Werte anzeigen können [46, 49, 167].

Bei der klinischen Inspektion sind Leberhautzeichen wie Teleangiektasien (insb. *Spider Naevi*), periumbilikale Erweiterung der subkutanen Venen, Palmar- und Plantarerythem, Lacklippen und -zunge, trockene Haut sowie Juckreiz, Dupuytren'sche Kontrakturen, Weiß- und Uhrglasnägel, Bauchglatze, Gynäkomastie und Mundwinkelrhagaden hinweisend auf einen Leberschaden [62, 189]. Ein Ikterus kann bei Säuglingen mit neonataler Cholestase oder bei Patienten im Endstadium der multilobulären biliären Zirrhose entstehen [49].

Der Fokus der körperlichen Untersuchung liegt auf dem Tastbefund der Leber. Es muss auf Größe, Struktur und Konsistenz des Leberrandes unterhalb des rechten Rippenbogens auf Höhe der Medioklavikularlinie geachtet werden [113].

Aufgrund der möglichen portalen Hypertension ist mit einer Splenomegalie zu rechnen, weswegen bei der klinischen Untersuchung auch die Palpation der Milz durchgeführt werden sollte [172].

1.6.3.2.2 Indirekte Fibrosetests

Die sogenannten indirekten Fibrosetests basieren auf verschiedenen Routinelaborparametern, die einzeln betrachtet oder in Kombination und Relation zueinander hinweisend für eine Leberbeteiligung sein können. Da es sich um Routinelaborparameter handelt, ist diese Untersuchungsmethode schnell, kostengünstig und untersucherunabhängig.

a) Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl bildet die Grundlage der nachfolgend vorgestellten Scores. Mit einer Sensitivität von 77% sowie einer Spezifität von 88% (89% area under curve (AUC)) kann das jeweilige Fibroestadium bestimmt werden [151]. Die Thrombozytopenie ist bei einer Leberfibrose bzw. -zirrhose auf folgende Kriterien zurückzuführen: ein splenomegales Pooling, ein erhöhter Abbau der Thrombozyten und eine verminderte hepatische Thrombopoetinsynthese [245]. Eine Thrombozytenzahl von <150 G/l deutet in Kombination mit einem APRI-Score (s.u.) von $\geq 1,5$ (mit einem PPV von $>90\%$) auf eine signifikante Fibrose hin. Bei einem APRI Score von $<2,0$ und/oder eine Thrombozytenzahl von ≥ 150 G/l ist in ca. 80% eine Zirrhose unwahrscheinlich [151].

Bei einer Thrombozytopenie sollten differentialdiagnostische Abklärungen, welche eine Knochenmarkssuppression induzieren können, erfolgen. Zu diesen zählen u.a. die Einnahme von Zytostatika, der Konsum von Alkohol oder weiteren Chemikalien, aber auch Vorerkrankungen wie Leukämien, Lymphome oder knochenmarkinfiltrierende Myelome, Mangelzustände (Vitamin B12 oder Folsäure), aplastische Anämien oder Virusinfekte. Autoimmunerkrankungen wie Autoimmunthrombopenie (ITP), heparininduzierte Thrombopenie (HIT II), Antiphospholipidsyndrom oder systemischer Lupus erythematodes können durch einen vermehrten Thrombozyten-Verbrauch ebenfalls eine Ursache einer Thrombozytopenie sein. Als nicht-immunologische Ursachen der Thrombozytopenie ist u.a. der Hypersplenismus, die disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC), thrombotische Mikroangiopathien wie thrombotisch-thrombopenische Purpura (TTP) oder das hämolytisch-urämische Syndrom zu nennen [111].

b) AST/ALT-Ratio

Die Aspartat-Aminotransferase (AST)/Alanin-Aminotransferase (ALT)-Ratio (AAR), AST/ALT-Ratio oder auch der De-Ritis-Quotient, ist seit seiner Erstbeschreibung 1957 als Fibrosemarker anerkannt. Er besitzt eine gute Aussagekraft über eine mögliche Fibrose oder Zirrhose bei chronischer viraler Hepatitis C (HCV), nicht-alkoholischer und alkoholischer Steatohepatitis (NASH und ASH). Dieser Marker erlaubt die Einschätzung eines Leberzellschadens [20, 216, 245, 269].

Der Referenzbereich der dimensionslosen AAR liegt bei 0,6-0,8. Ab einem Grenzwert von ≥ 1 ist von einem Leberschaden auszugehen [269].

Die AAR zeigt jedoch im Vergleich zu anderen indirekten Fibrosetests (z.B. APRI (s.u.)) eine deutliche Unterlegenheit in der diagnostischen Genauigkeit [151].

c) Aspartat-Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI)

Der AST to Platelet Ratio Index (APRI) wurde 2003 von Wai *et al.* im Rahmen der Beurteilung einer chronischen Hepatitis C beschrieben. Wie in folgender Formel veranschaulicht, errechnet sich der Index aus dem Verhältnis von gemessener AST zu ihrer Obergrenze sowie zu der Thrombozytenzahl:

$$\text{APRI} = \frac{\left(\frac{\text{AST}}{\text{obere Normgrenze}} \right)}{\text{Thrombozyten [G/l]}} \times 100$$

Abbildung 1.3: Formel zur Berechnung des APRI-Scores, modifiziert nach [261]

Anhand der von Wai *et al.* beschriebenen optimierten Grenzwerten (signifikante Fibrose: 0,5-1,5; Zirrhose: 1,0-2,0) konnten 51% der signifikanten Fibrosen und sogar 81% der Zirrhosen bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C ohne invasive Diagnostik klassifiziert und identifiziert werden [261].

In einer Studie mit Virushepatitis-Patienten von Wai *et al.* beträgt der AUC-Wert für den APRI-Score zur Vorhersage einer signifikanten Fibrose 88% und einer Zirrhose 94%. Der APRI-Score gilt nicht bei Patienten mit AST-Erhöhung durch beispielsweise chronischen Alkoholabusus [237, 261]. Mehrfache Validierungen durch weitere

Arbeitsgruppen bestätigten die hohe Aussagekraft des APRI-Scores bezüglich einer Leberbeteiligung bei CF [30, 106, 151, 160].

d) FibroTest®

Der in Europa etablierte FibroTest® (Biopredictive, Paris, Frankreich), in den USA bekannt als FibroSURE™ (LabCorp, Burlington, North Carolina), wurde in französischen Studien ebenfalls als Fibrosemarker bei Patienten mit einer HCV-Erkrankung anhand von fünf Laborparametern bestimmt [120]. Der Wert für den FibroTest®, abgekürzt mit „f“, setzt sich aus α2-Makroglobulin, Haptoglobin, Apolipoprotein A1, Gesamtbilirubin und γ-Glutamyltransferase (γGT) in Abhängigkeit des Geschlechts zusammen [213]. Das Ergebnis des FibroTests® lässt sich mit einem vom Hersteller patentierten Algorithmus berechnen:

$$\begin{aligned}
 f = & 4.467 \times \log(\alpha 2 - \text{Makroglobulin [g/l]}) - 1.357 \times \log(\text{Haptoglobin [g/l]}) \\
 & + 1.017 \times \log(\gamma\text{GT [U/l]}) + 0.0281 \times (\text{Alter [in Jahren]}) \\
 & + 1.737 \times \log(\text{Bilirubin [\mu mol/l]}) - 1.184 \times (\text{Apolipoprotein A1 [g/l]}) \\
 & + 0.301 \times \text{Geschlecht [weiblich = 0, männlich = 1]} - 5.540
 \end{aligned}$$

Abbildung 1.4: Formel zur Berechnung des FibroTests®, modifiziert nach [256]

Die an die Fibrose-Klassifikationssysteme angelehnten Schwellenwerte sind in der nachfolgenden Tabelle (1.2) aufgeführt.

Tabelle 1.2: Konversion der FibroTest®-Werte zu den Fibrorestadien (nach METAVIR) [182]

Fibrorestadium	<i>F0</i>	<i>F0-1</i>	<i>F1</i>	<i>F1-2</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F3-4</i>	<i>F4</i>
FibroTest®	0- 0,21	0,22- 0,27	0,28- 0,31	0,32- 0,48	0,49- 0,58	0,59- 0,72	0,73- 0,74	0,75- 1

Abkürzungen: F0= Keine Fibrose; F1= Portoportale Faservermehrung; F2= Portoportale Faservermehrung, inkomplette Septenbildung; F3=(In-)komplette Septen ohne Zirrhose; F4= Zirrhose

Die AUC des FibroTests[®] zum Nachweis einer signifikanten Fibrose (>F2 nach METAVIR) beträgt 0,85. Eine Leberzirrhose (F4) lässt sich anhand des FibroTests[®] mit einer Genauigkeit von 87% nachweisen [34, 182]. In Bezug auf die chronische Hepatitis C wurde der FibroTest[®] durch viele Metaanalysen validiert [30, 106, 239]. Akute oder stattgefundenen Hämolyse (u.a. erhöhtes Haptoglobin) und Infektionen (u.a. erhöhtes α 2-Makroglobulin) oder ein Gilbert-Meulengracht-Syndrom (u.a. erhöhtes indirektes Bilirubin) sind mögliche Störfaktoren, die die Aussagekraft des FibroTests[®] mindern [245].

e) Fibrosis-4

Fibrosis-4 (FIB-4) ist ein einfacher Kombinationsindex, der aus dem Patientenalter, der Thrombozytenzahl und den beiden Transaminasen ALT und AST gebildet wird [118]. Die Formel zur Berechnung des Scoring-Systems lautet:

$$FIB - 4 = (\text{Alter [in Jahren]} \times AST [U/l]) / ((\text{Thrombozyten [G/l]} \times (ALT [U/l]))^{1/2})$$

Abbildung 1.5: Formel zur Berechnung des FIB-4-Scores, modifiziert nach [246]

Die fortgeschrittene Leberfibrose (>F2 nach METAVIR) wird mit einem Wert von <1,45 und einem negativen prädiktiven Wert von >90% ausgeschlossen. Dies ist somit ein relativ sicheres Ausschlussverfahren, wohingegen ab dem oberen Cut-off von >3,25 der positive prädiktive Wert nur 65% entspricht [246].

f) Forns Index

Der Forns Index [89] bezog sich initial auf ein Patientenkollektiv mit der Diagnose einer chronischen Hepatitis C. Der Forns Index berücksichtigt die Thrombozytenzahl, die γ GT, das Cholesterin und das Patientenalter. Mit folgender Formel lässt er sich berechnen:

$$\begin{aligned} \text{Forns Index} = & 7,811 - 3,131 \times \ln(\text{Thrombozytenzahl [10}^9/\text{l]}) + 0,781 \times \ln(\gamma\text{GT [U/l]}) \\ & + 3,467 \times \ln(\text{Alter [in Jahren]}) - 0,014 \times (\text{Cholesterin [mg/dl]}) \end{aligned}$$

Abbildung 1.6: Formel zur Berechnung des Forns Index, modifiziert nach [245]

Anhand des unteren Cut-offs ($<4,2$) konnte eine signifikante Fibrose (F2-F4) mit einer Genauigkeit von 96% (negativer prädiktiver Wert) ausgeschlossen werden.

Eine Fibrose ($>F2$ nach METAVIR) wird ab einem oberen Cut-off von $>6,9$ mit einem positiven prädiktiven Wert von 79% diagnostiziert [89].

1.6.3.2.3 Direkte Fibrosetests

Die direkten Biomarker für eine hepatische Fibrose basieren auf Substanzen des fibrotischen Prozesses, welche im Serum zu finden sind. Diese entstehen aufgrund des Auf- und Abbaus von Bindegewebe, Kollagenfasern, Glykoproteinen und Proteoglykanen der Extrazellulärmatrix sowie matrixmodifizierenden und inhibierenden Enzymen.

Zu diesen Faktoren zählen die Hyaluronsäure, das N-terminale Prokollagen-III-Peptid, verschiedene Metalloproteasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) [175]. Aufgrund der eingeschränkten Spezifität und Sensitivität der einzelnen Fibrosemarker, wird die Kombination mehrerer Marker empfohlen. Es sind hierzu kommerzielle Testbatterien (Kombinationen von den Fibrosemarkern) erhältlich. Ein Nachteil dieser Fibrosemarker ist die Beeinflussung durch extrahepatische Faktoren wie eine Niereninsuffizienz oder systemische Entzündungen [245].

a) Hyaluronsäure

Die aus dem langkettigen und linearen Polysaccharid bestehende, für die extrazelluläre Matrix essentielle Hyaluronsäure wird von hepatischen Sternzellen produziert. Ihre normale Serumkonzentration ist gering. Bei einer Leberfibrose oder Zirrhose ist ein Anstieg der Hyaluronsäure im Serum zu beobachten [102].

Der AUC-Wert der Hyaluronsäure liegt zwischen 85-90%. Aus diesem Grund wird dieser vielversprechend für das Fibrorestaging eingesetzt. Während der PPV bei nur 61% liegt, weist der negative prädiktive Wert (NPV) einen Wert von 98-100% auf.

Dies qualifiziert die Hyaluronsäure als Ausschlussmarker nicht aber als Diagnosemarker für eine Fibrose [100, 191].

b) Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die MMPs gehören zu der Familie der extrazellulären Endopeptidasen, die den Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran durch die Spaltung von Proteinpeptidbindungen katalysieren [252]. Neben dem Gewebeumbau sind die MMPs auch für die Vermittlung wichtiger Funktionen verantwortlich. Zu diesen gehören Immunität, Leukozytenaktivierung, antimikrobielle Verteidigung, Chemokin-Verarbeitung oder Reparaturmechanismen und Zellmigration [94]. Da MMPs hauptsächlich in geschädigtem Gewebe aufgrund von entzündlichen Umbauprozessen exprimiert werden, ist die Aktivität der MMPs auf den extrazellulären Abbau und Umbau während der Fibrogenese der Leber zurückzuführen. Beim Menschen sind nur MMP-1 (Kollagenasen), MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) bekannt und in der extrazellulären Matrix lokalisiert [187, 219].

c) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)

Von den bisher bekannten vier Inhibitoren (TIMP 1-4), erweisen TIMP-1 gegen fast alle drei MMPs (MMP-1, -2 und -9) und TIMP-2, vor allem gegen MMP-2, eine inhibitorische Wirkung und schaffen ein Gleichgewicht von Auf- und Abbau der extrazellulären Matrixkomponenten [220]. Das Verhältnis von MMPs/TIMP-1 ist für die Diagnose der hepatischen Fibrose ein entscheidender Hinweis [187].

Neben der Beziehung zu MMPs beeinflussen die TIMPs auch biologische Aktivitäten wie die Zellmigration, Wachstums- und Differenzierungsphasen, Inhibition von Angiogenese und Apoptose [24, 218].

d) YKL-40

YKL-40 ist ein 40 kDa Chitin- und Heparin-bindendes Glykoprotein. Die Namensgebung basiert auf den ersten drei N-terminalen Aminosäuren Tyrosin (Y), Lysin (K) und Leucin (L) sowie dem Molekulargewicht [211]. Das Glykoprotein wird von einer Vielzahl von Zellen, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, sezerniert. Es induziert die Zellproliferation und -differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Zudem bewirkt es eine Aktivierung der Angiogenese, der Inflammation, des angeborenen Immunsystems sowie des Remodellings der extrazellulären Matrix [211, 253].

Nach Rath *et al.* besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von YKL-40 und dem hepatischen Fibrosestatus [209]. Das quantitative Vorliegen des Glykoproteins kann als starker Marker mit hoher diagnostischer Aussagekraft für eine Einteilung in ein frühes oder spätes Stadium der Leberfibrose/-zirrhose herangezogen werden. Es besitzt einen hohen, positiven prädiktiven Wert von 80% [187].

e) Prokollagen III-Amino-peptid (PIIINP)

Prokollagene sowie Peptide werden bei der Synthese von Kollagen in das Serum freigesetzt und als Maß für die Syntheseleistung herangezogen. Aufgrund der rezidivierenden Bindegewebsschäden bei der chronischen Leberfibrose steigt der Anteil von fibrillenbildenden Kollagen Typ III – ein wichtiger Bestandteil des elastischen und retikulären Bindegewebes – sowie die Konzentration des Syntheseabspaltproduktes PIIINP an. Letzteres ist im Serum nachzuweisen [100, 101]. Folglich korreliert die PIIINP-Konzentration mit dem Grad der Fibrose bei chronischen Lebererkrankungen und bietet sich als guter Verlaufspareter der fibrosierenden Hepatopathie an [187]. Durch die geringe Sensitivität (76-78%) und Spezifität (71-81%) von Prokollagen III-Amino-peptid ist die klinische Verwendbarkeit jedoch eingeschränkt [32, 101].

1.6.3.2.4 Bildgebende Diagnostik

Konventionelle bildgebende Verfahren wie Sonografie, MRT und CT sind zur Darstellung von morphologischen Merkmalen einer Lebererkrankung geeignet. Die pathomorphologische Beurteilung kann allerdings erst in fortgeschrittenen Stadien der Fibrose oder sogar Zirrhose mit Hinweisen auf eine portale Hypertension erfolgen [245]. Ein spezielles Verfahren zur Messung der Lebersteifigkeit, die sogenannte transiente Elastographie (TE), erfasst hingegen schon in frühen Stadien eine Leberbeteiligung [142].

a) Sonografie

Die Ultraschalldiagnostik oder Sonografie ist ein schnelles und kostengünstiges Diagnoseverfahren, welches eine Sensitivität von 82-88% bei Patienten mit chronischen Lebererkrankung aufweist [10]. Die Sensitivität zur sonografischen Erkennung der Zirrhose beträgt 87%, die Leberbiopsie erreicht hingegen nur 62% [233].

Die wichtigsten sonografischen Hinweise auf eine Leberfibrose im Endstadium (Zirrhose) sind morphologische Veränderungen der Leber und Anzeichen auf eine portale Hypertension (s.u.). Die eigentlich glatte Oberfläche der Leber erscheint bei einer Zirrhose knotig und wellig. Durch den aufgeweiteten Leberwinkel erscheint der kaudale Pol als plumpe Kontur. Das physiologisch homogene Parenchym ist bei der Zirrhose heterogen, was sich als Zunahme der Impedanz und damit in Form einer inhomogenen Echogenität im sonografischen Bild zeigt. Die Leber ist zudem in ihrer Form verändert. Es kann eine *Lobus caudatus*-Hypertrophie aufgrund von potentiell Toxin-belasteten enteralem Blut vorliegen. Dieses Toxin-belastete Blut wird bevorzugt im oberen Gastrointestinaltrakt durch die *V. mesenterica superior* aufgenommen und fließt durch den laminaren Zusammenfluss am Confluens der Pfortader vermehrt in den rechten Leberlappen. Im Verlauf einer fortschreitenden Lebererkrankung kann der linke Leberlappen, insbesondere der *Lobus caudatus* als repräsentatives Segment, kompensatorisch hypertrophieren [10, 126, 159].

Die Portalvenen sowie die zuführenden Gefäße *V.portae hepatis*, *V.lienalis* und die *V.mesenterica superior* sind messbar erweitert. Aszites, portokavale Anastomosen sowie eine Splenomegalie können sonografisch nachgewiesen werden [10, 116, 126].

Die Stärke der Aussagekraft der Leberultraschallsonografie ist abhängig von der Erfahrung des Untersuchers sowie der Qualität des Sonografiegerätes. Auch wenn die Genauigkeit der Sonografie >80% beträgt, ist dies nur auf das Endstadium der Leberfibrose zu beziehen. Beginnende fibrotische Prozesse sind kaum zu erfassen [10].

b) Transiente Elastographie (TE)

Der Vorgang der Leberfibrosierung erfolgt anhand der Strukturveränderungen durch die Aktivierung von hepatischen Sternzellen und der Bildung extrazellulärer Matrix. Letztere äußert sich in einer verringerten Elastizität und einem verändertem Blutfluss [73].

Die bislang bekannten und etablierten bildgebenden Verfahren erzeugen eine errechnete, visuelle Darstellung der Leber, bei der der Untersucher das Endstadium des Fibroseentstehungsvorganges feststellen kann. Hingegen wird bei dem relativ neuen Verfahren der transienten hepatischen Elastographie (TE) (Fibroscan™, Echosens, Paris), die veränderte Elastizität der Leber als Maß für die Leberfibrose herangezogen [91]. Die ersten klinischen Ergebnisse der transienten Elastographie erschienen 2002 [231].

Kontinuierliche und immer wiederkehrende Entzündungsprozesse der Leber gehen mit einer erhöhten Versteifung/Fibrosierung des Leberparenchyms einher, weswegen diese bei der TE eine hohe Scherwellen-Ausbreitungsgeschwindigkeit und damit einen hohen kPa-Messwert ergeben [34]. Diese Messmethode bietet sich hervorragend als Zirrhose-Diagnostikum (F4) an und ist den Biomarkern überlegen. Sie eignet sich hingegen nicht zur Einschätzung eines niedrigen Fibrosestadiums und der initialen Fibrose-Diagnose (F2) [73].

Im Gegensatz zu der histologischen Untersuchung der Leberbiopsie, welche eine Beurteilung von etwa 1/50000 des Lebergewebes ermöglicht, erfasst die TE etwa 1/500 der Leber [76]. Das Grundprinzip der TE wird in Kapitel 3.2.1 „Gerätefunktion und -prinzip des FibroScans 502®“ ausführlicher erklärt.

1.7 Lipocalin-2

Das 25 kDa schwere Lipocalin-2 (LCN2) ist ein aus 198 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, dessen genetische Kodierung auf dem Chromosomenlocus 3p11 zu finden ist [35]. Die Entdeckung gelang Hraba-Renevey *et al.* bereits 1989 in Simian-Virus-infizierten Nierenzellen von Mäusen [117]. Die Struktur von LCN2 besteht aus einem Signalpeptid mit 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende eines Glykoproteins, verbunden mit der Liganden-bindenden Lipocalin-Domäne. Diese Domäne besteht aus einem 8-strängigem β -Barrel und fünf im Kreis angeordnete β -Faltblätter, die eine fassförmige Tertiärstruktur mit anti-paralleler Schleifenrichtung bilden [35].

1993 beschrieben Kjeldsen *et al.* das humane Lipocalin-2 als neutrophiles Protein, welches kovalent an die Gelatinase neutrophiler Granulozyten gebunden ist [139]. Das Protease-resistente Polypeptid Lipocalin-2 besitzt, abhängig von seiner Funktion oder Expressionslokalität, viele Synonyme. Zu diesen zählen das Neutrophilen-Gelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL), Siderocalin, Uterocalin, 25 kDa- α 2-Mikroglobulin-verwandtes Protein und Onkogen 24p3.

Das LCN2 gehört zu einer großen Superfamilie an Transportproteinen, die lipophile Liganden mit geringem Molekulargewicht und spezifischen Zelloberflächenrezeptoren binden und den Transport zwischen Intra- und Extrazellularraum gewährleisten [9, 67]. Es spielt in multiplen biologischen Prozessen wie der Regulation der Wachstums-, Differenzierungs- und Apoptosefaktoren, dem angeborenen Immunsystem oder als früher Marker einer Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle [67, 236]. Zu den Liganden gehören Steroide, Lipopolysaccharide, Fettsäuren und Siderophore (Eisen-Chelatoren) [9, 87].

Durch zelluläre und perizelluläre Bindung von Eisen und LCN2 entstehen Siderophore-Eisenkomplexe. Aufgrund dieser Komplexbildung herrscht ein Mangel an freiem Eisen, welches für das Wachstum von Bakterien essentiell ist. Dieser Eisenmangel der Bakterien erhöht die Expression von proapoptotischem Protein BIM (*BCL2-interacting mediator of cell death*), welches eine Apoptose der Zelle induziert [66, 155].

Folglich besitzt das LCN2 einen bakteriostatischen Effekt und übernimmt eine wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems [257].

LCN2 wird von multiplen Faktoren stimuliert und aktiviert. Zu diesen Aktivatoren gehören hauptsächlich Lipopolysaccharide (LPS) und der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Interleukine IL-1 β , -6, -10, -17, Tumorstwachstums- und Nekrosefaktoren TGF- α und

TNF- α stimulieren die LCN2-Expression. Iatrogen bewirkt Vitamin-A-Säure (Retinoid-Säure) oder Dexamethason ebenfalls eine erhöhte LCN2-Expression [9].

Zwei Jahrzehnte nach der Entdeckung und weiterführenden Forschungen von LCN2 wurde eine erhöhte Expression bei kritischen Organzuständen detektiert. Zu diesen zählen Funktionseinschränkungen und Schäden von Nieren, Gehirn, Lunge, Herz, Prostata, Leber sowie des muskuloskelettalen Systems. Zudem sind weitere Faktoren wie erhöhtes Alter, generelle Entzündungsprozesse, chronische Herzerkrankungen, Tumore und tumorfördernde Substanzen für eine erhöhte LCN2-Konzentration im Serum verantwortlich [9, 87, 251].

Es konnte bereits die Wertigkeit von Lipocalin-2 als Marker für die Früherkennung einer akuten ischämischen Nierenschädigung nach kardiopulmonalem Bypass beobachtet werden [181]. Durch mehrere Studien wurde bestätigt, dass die Lipocalin-2-Werte im Serum und im Urin 2-24 h nach Schädigung des Nierenparenchyms sowie bei akutem oder chronischem Nierenversagen erhöht sind [112, 181, 260].

Neben der Niere wird Lipocalin-2 auch im Epithel, in den vaskulären Endothelzellen und von den infiltrierenden Neutrophilen der Atemwege produziert. Es lässt sich bei Patienten mit akuter bakterieller Infektion bei Asthma, Lungenemphysem oder COPD aber auch bei akutem Lungenversagen oder idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) in erhöhter Konzentration im Serum nachweisen [119, 276, 277]. Speziell bei CF-Patienten gilt LCN2 als Marker der akuten pulmonalen Exazerbation [127].

2012 führten Sultan *et al.* eine kontrollierte Fallstudie mit Fokus auf die Akut-Phase-Reaktion (APR) der Leber und der Ausschüttung von Lipocalin-2 nach intramuskulärer Injektion von 5 ml/kg Terpentin bei Ratten und Mäusen durch. Innerhalb von 48 h stieg die Serum-LCN2-Konzentration bis auf ein 200faches ($20,45 \pm 6,54$ ng/ml) der Ursprungskonzentration ($<0,1$ ng/ml) an. Bei der Kontrollgruppe (Injektion von Natriumchlorid) war hingegen kein erhöhter Wert zu messen. Es konnte zudem nach der Terpentin-Injektion ein starker Anstieg der LCN2-mRNA in der Rattenleber beobachtet werden. Die Genexpression erreichte nach 36 h einen Peak mit einer 8738fachen ($\pm 2103,7$) Erhöhung der LCN2-mRNA. Diese blieb bis zu 48 h signifikant erhöht. In den Rattennieren und anderen Organen war kein wesentlicher Anstieg der LCN2-mRNA zu messen [251]. Die Leber ist folglich als Hauptquelle für die LCN2-Produktion bei Akut-Phase-Reaktion anzusehen. Ob nun die LCN2-Produktion als verlässlicher und vor allem früher Messparameter bei einer CF-induzierten Leberbeteiligung anzusehen ist, wird Aufgabe der weiteren Forschung sein.

2 Fragestellung

Die frühzeitige Diagnose einer Leberbeteiligung bei CF kann zur verbesserten Prognose der Lebenszeit und -qualität der zumeist juvenilen Patienten führen.

Das Lipoaclin-2 (LCN2) erwies sich als verlässlicher Marker in der Diagnose von Nierenerkrankungen. Laut aktueller Forschung bietet sich das LCN2 auch als guter Marker für die Unterscheidung von Patienten mit gesunder und Patienten mit chronisch erkrankter Leber an [9].

Es war zu prüfen, ob das Protein LCN2 als Indikator für eine Leberbeteiligung bei CF, insbesondere bei pädiatrischen Patienten, angesehen werden kann.

Die transiente Elastographie hat sich als Funktionsdiagnostik bei verschiedenen Erkrankungen u.a. der Unterscheidung zwischen CFnoLD und CFLD sowie der Früherkennung der CFLD bewährt, weswegen sie als Vergleichsverfahren herangezogen wurde [92, 142].

In der hier vorliegenden Dissertation sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Können die Messwerte von LCN2 Hinweise auf eine Leberbeteiligung bei CF geben und können diese zwischen einer Leberbeteiligung (CFLD) und einer Nichtbeteiligung der Leber (CFnoLD) signifikant unterscheiden?
2. Liegt LCN2 in verschiedenen Ausprägungsstärken bei einer CF mit Leberbeteiligung vor? Ist diese Ausprägungsstärke von LCN2 bei CFLD abhängig von der Altersgruppe (CFLD_{päd} und CFLD_{erw})? Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den LCN2-Werten dieser beiden Kohorten?
3. Durch die transiente Elastographie können Risikopatienten für eine zukünftige Leberbeteiligung bei CF identifiziert werden. Korreliert diese nicht-invasive Diagnostik mit den Werten von LCN2?

3 Patienten, Untersuchungsmaterial und Methoden

3.1 Patienten

Für die vorliegende prospektive Studie wurden im Zeitraum von 2009 bis 2015 86 Patienten mit zystischer Fibrose, die in der Medizinischen Klinik II oder der Pädiatrie des Universitätsklinikums in Gießen betreut wurden, einbezogen.

Alle Patienten bzw. ihre gesetzlichen Vertreter (bei minderjährigen Patienten) erhielten noch vor Beginn der Studie schriftliche Informationen über das weitere Prozedere aller Untersuchungen. Mittels Unterschrift stimmten sie der Teilnahme und Zielsetzung dieser Studie zu.

Die durchgeführten Tests und Behandlungen entsprachen den Anforderungen der europäischen und US-amerikanischen CF-Richtlinien [88, 134].

Die vorliegende Studie wurde unter strenger Einhaltung der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (AZ 75/09) genehmigt (siehe Anhang 1).

Bei allen Patienten wurde während der kompletten Studie eine körperliche und sonografische Untersuchung, eine Blutserumentnahme, ein Lungenfunktionstest und eine transiente hepatische Elastographie, d.h. eine Messung der Lebersteifigkeit mit dem FibroScan®, durchgeführt.

Die 86 Patienten wurden anhand folgender Kriterien selektiert und in die der vorliegenden Dissertationsschrift zugrundeliegenden Studie integriert:

- positive CF-Testung
- zeitgleiche Untersuchungen (≤ 12 Monate Abweichung)
 - Blutentnahme
 - transiente hepatische Elastographie
 - Lungenfunktionstest
- Erreichen der transienten Elastographie-Messstandards
 - „Success“-Wert von $\geq 60\%$
 - Interquartilbereich (IQR) $\leq 30\%$

Das Patientenalter lag bei der Untersuchung zwischen 2 und 47 Jahren (Median 17 Jahre).

An der Studie nahmen 45 männliche und 41 weibliche Patienten teil.

Die Abbildung 3.1 zeigt, wie anhand des Patientenalters (Cut-off ≥ 18 Jahre bei Eintritt der Studie) und der CF-Leberbeteiligung (CFnoLD/CFLD) das gesamte Kollektiv in Untergruppen unterteilt wurde. Folglich lassen sich die 86 CF-Patienten in 38 (44,2%) erwachsene und 48 (55,8%) pädiatrische Patienten aufteilen.

Die CF-Patienten mit einer klinisch bereits diagnostizierten Leberbeteiligung bzw. die, die eine Lebersteifigkeit von $>6,3$ kPa an zwei aufeinander folgenden Messzeitpunkten besitzen, wurden entsprechend als CFLD markiert und als Referenz innerhalb der Studienpopulation herangezogen.

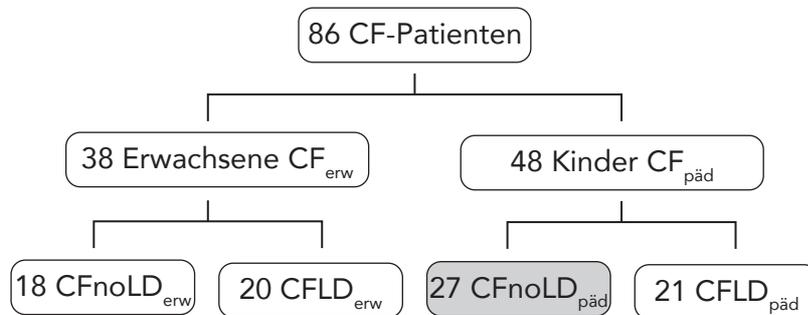


Abbildung 3.1: Gruppierung der Studienkohorte nach Alter (Cut-off ≥ 18 Jahre) und Leberbeteiligung (CFnoLD/CFLD).

Abkürzungen: CF = zystische Fibrose; CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

3.2 Transiente hepatische Elastographie (TE)

3.2.1 Gerätefunktion und -prinzip des FibroScans 502®

Die transiente hepatische Elastographie (TE) (FibroScan®, Echosens, 42, Rue Monge, 72005 Paris, Frankreich, 2002) ist ein nicht-invasives Messverfahren, das eine präzise, zuverlässige und reproduzierbare Beurteilung der Elastizität und Steifigkeit des normalen und des fibrotisch veränderten Leberparenchyms ermöglicht [72, 91].

In der Untersuchungssonde des FibroScans® ist ein Vibrationsgenerator integriert, der einen singulären, gesteuerten Vibrationsimpuls (mit einer Mittelfrequenz von 50 Hz) als elastische Transversalwelle über die Haut und das subkutane Fettgewebe des Patienten auf die Leber überträgt und diese in Schwingung versetzt. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit (proportional zu der Elastizität der Leber) wird als Reflexionsecho von einem niederfrequenten Ultraschallkopf (3,5 MHz), der sich auf dem Vibrationsgenerator befindet, wie folgt vermessen: Per *Transducer* werden die Echos in die numerische Einheit Kilo-Pascal (kPa) umgerechnet und als Messwert auf dem Bildschirm des Untersuchungsgerätes abgebildet [72, 231].

Kontinuierliche und immer wiederkehrende Entzündungsprozesse der Leber korrelieren mit einer erhöhten Fibrosierung bzw. einer Versteifung des Leberparenchyms. Daraus folgt eine Beschleunigung der Scherwellen-Ausbreitungsgeschwindigkeit, die wiederum als erhöhter kPa-Messwert registriert wird [34]. Dieser Zusammenhang ist mittels der Formel des Elastizitätsmoduls E rechnerisch nachweisbar:

$$V = \frac{\Delta z}{\Delta t}$$

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

Abbildung 3.2: Formel zur Bestimmung der Geschwindigkeit V und des Elastizitätsmoduls E , modifiziert nach [231]

Abkürzung: V = Geschwindigkeit (m/s); z = Messbereich (mm); t = Zeit (ms); E = Elastizitätsmodul;
 ρ = Dichte ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

Die Messsonde wird von dem Untersucher auf die Haut des Patienten in einem Interkostalraum auf Höhe des rechten Leberlappens platziert. Die Messungen werden mit dem Bedienungsknopf „Shot“ durchgeführt. Das Untersuchungsergebnis wird durch den Median aus mindestens zehn validen Messungen berechnet [135]. Laut Herstellerangabe

erreichen valide Messungen eine Erfolgsrate („*Success*“) von $\geq 60\%$ sowie einen Interquartilbereich (IQR) von $\leq 30\%$ [208].

Der Messbereich der TE liegt zwischen 2,5 und 75 kPa [33].

Wie in der Abbildung 3.3 dargestellt, wird bei einer Messsondengröße M (für Erwachsene) ab einer Messtiefe von 1,5-7,5 cm ein 3 cm³ großer Leberzylinder erfasst. Durch diesen vermessenen Bereich ist die Möglichkeit zur Beurteilung des Leberparenchyms um mindestens ein 100faches höher als bei dem bisherigen Goldstandard „Leberbiopsie“ [72, 91, 136].

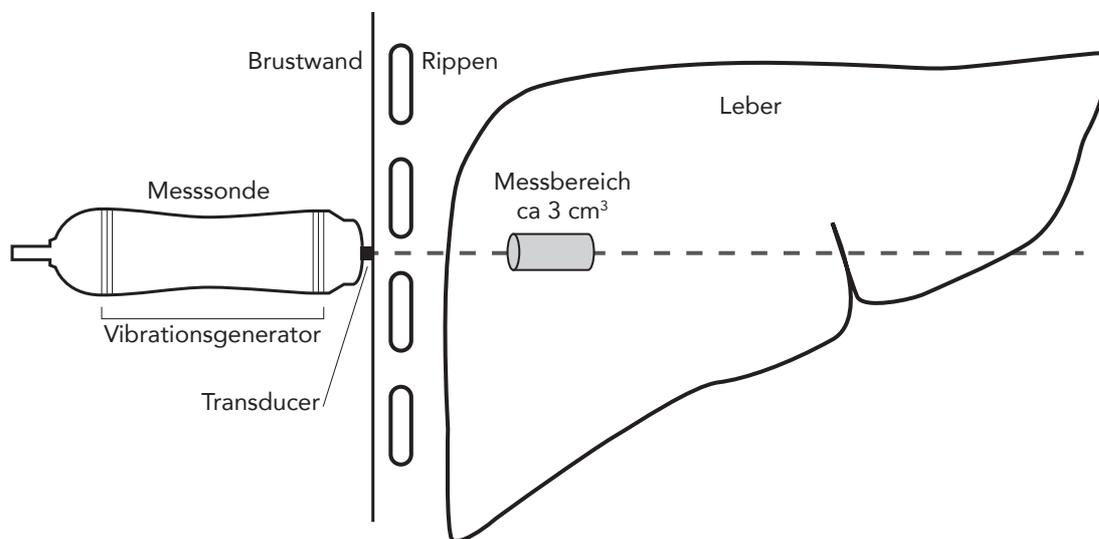


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Positionierung der FibroScan®-Messsonde während einer Messung am Patienten, modifiziert nach [71, 282]

3.2.2 Untersuchungsdurchführung

Während der Untersuchung befindet sich der Patient in Rückenlage mit maximaler Abduktion des rechten Armes auf einer Untersuchungsliege. Eine ruhige und gleichmäßige Atmung ohne Unterbrechung (Reden, Husten etc.) ist für ein valides Ergebnis erforderlich.

Ziel der Untersuchung ist die Erfassung des größten Querschnitts der Leber. Der Untersucher benetzt die Untersuchungssonde mit einem Ultraschallkoppel-Gel und setzt den Schallkopf im 9.-11. Interkostalraum der rechten Patientenseite in der mittleren Axillarlinie auf Höhe des Xiphoids auf [178].

Um Fehlmessungen durch Störungen von Lungengewebe, Knochen, Gallenblase oder großen Gefäßen zu vermeiden, ist in der TE-Sonde sowohl ein A-Modus (Amplitude) als auch ein TM-Mode (Time-Motion) installiert. Der A-Modus stellt die jeweiligen Grenzflächen durch Angaben der Tiefe und Reflexionsstärke entlang der Schallachse dar. Im TM-Mode wird eine Bildzeile der Ultraschallaufnahme über die Zeit aufgetragen. Somit entsteht ein Diagramm, in dem auf der Y-Achse der Bildstrahl mit der gemessenen Echogenität (Δz) und auf der X-Achse die Zeit (Δt) aufgetragen ist [72, 136, 201]. Dieses Diagramm ist schematisch in Abbildung 3.4 neben einer Fotografie des FibroScans® abgebildet.

Neben den Ultraschallbildern, die eine einwandfreie Messung ermöglichen, wird ein Elastogramm abgebildet, welches den Grad der Leberdeformation visualisiert. Für eine valide Messung, die die oben genannten Kriterien erfüllt, benötigt das Gerät weniger als 15 Sekunden. Die gesamte Untersuchung der Lebersteifigkeit mittels TE nimmt pro Patient also weniger als 15 Minuten in Anspruch [34, 231].

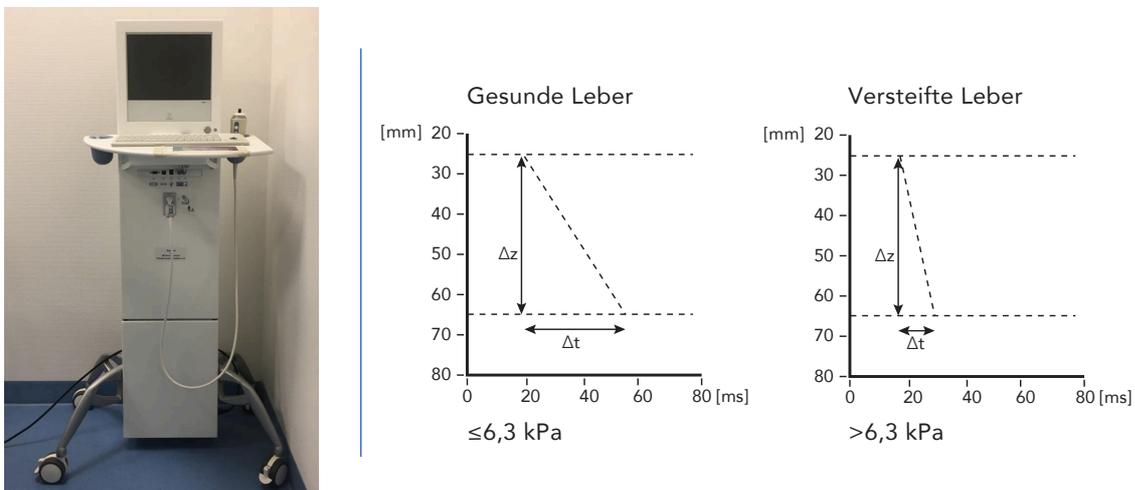


Abbildung 3.4: Abbildung des FibroScans® im Schwerpunkt Gastroenterologie des Gießener Universitätsklinikums mit gleichzeitiger Darstellung des Elastogramms bei gesunder und bei versteifter Leber, modifiziert nach [71, 125]

3.3 Laborgeräte und Materialien

3.3.1 Laborgeräte

Zur labortechnischen Untersuchung der Fibrosemarker wurden folgende Geräte benutzt:

Tabelle 3.1: Laborgeräte

<i>Gerät</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
<i>Eismaschine Scottsman AF100</i>	Fa. Hubbard Ice Systems, Suffolk/UK
<i>Wasseraufbereitungsanlage Millipore ELIX® Essential</i>	Fa. Merck Millipore, Billerica, USA
<i>Gefrierschrank (-80°C) Thermo Scientific™ HERAFreeze™HFU500TV63</i>	Fa. Fisher Scientific GmbH, Schwerte
<i>Kühlschrank Profi Line</i>	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
<i>Magnetrührer</i>	Fa. IKA-Werke, Staufen
<i>Pipetten Typ Research plus</i>	Fa. Eppendorf, Hamburg
<i>Pipetboy Comfort</i>	Fa. Integra Biosciences GmbH, Fernwald
<i>Multipette plus</i>	Fa. Eppendorf
<i>Schüttler Vibrax VXR Basic</i>	Fa. IKA-Werke, Staufen
<i>Stericup Filter Units SCGPT01RE</i>	Fa. Merck Millipore, Billerica, USA
<i>ELISA Reader Fusion™</i>	Fa. Packard BioScience, Meriden/ USA

Abkürzungen: Fa = Firma; ™ = Trademark, registrierte Warenleistungsmarke

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Zur labortechnischen Untersuchung der Fibrosemarker wurden folgende Verbrauchsmaterialien benutzt:

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien

<i>Materialien</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
<i>Pipettenspitzen</i>	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Reagiergefäß</i>	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Reaktionsgefäße (15ml, 50 ml)</i> <i>Greiner Bio-One™ CellStar™</i>	Fa. Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Abkürzungen: Fa = Firma;

3.3.3 Chemikalien und Reagenzien

Zur labortechnischen Untersuchung der Fibrosemarker wurden keine weiteren Chemikalien und Reagenzien benutzt (außer destilliertem Wasser).

3.3.4 Kommerzielle Labor-Kits

Zur labortechnischen Untersuchung der Fibrosemarker wurden folgende kommerziellen Labor-Kits benutzt:

Tabelle 3.3: Kommerzielle Labor-Kits

<i>Bezeichnung des Labor-Kits</i>	<i>Herstellungsfirma</i>
<i>Quantikine® ELISA Human Lipocalin-2/ NGAL</i>	Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA

Abkürzungen und Zeichen: Fa = Firma; NGAL = Neutrophilengelatatinase-assoziiertes Lipocalin;
® = registrierte Trade Mark, Warenleistungsmarke

3.4 Serumproben

3.4.1 Gewinnung und Lagerung der Serumproben

Alle teilnehmenden 86 CF-Patienten stimmten nach ausführlicher Aufklärung der Verwendung ihrer Daten schriftlich zu (siehe Anhang 2).

Nach standardisierter Venenpunktion und Blutentnahme wurde das Blut zehn Minuten bei 4°C und ca. 2700 rpm (*rounds per minute*) zentrifugiert (Centrifuge GS-6 KR; Fa. Beckman). Das gewonnene Serum wurde abpipettiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

3.4.2 Routinelaboruntersuchung und Bestimmung der Leberparameter

Die Routinelaboruntersuchung und die TE wurden vorzugsweise am selben Untersuchungstermin durchgeführt. Neben den Routineserumparametern wie Hämoglobin (g/l), Thrombozyten (G/l), Bilirubin (mg/dl) etc. wurden auch die für diese Studie wichtigen Leberparameter wie ALT (U/L), AST (U/L) und γ -GT (U/L) im Zentrallabor der Universitätsklinik Gießen (Prof. Dr. med. Harald Renz, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, Baldingerstraße, 35043 Marburg) bestimmt.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Prinzipien der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Als ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) wird ein immunologisches Verfahren zum quantitativen und qualitativen Nachweis von bestimmten Proteinen bezeichnet. Innerhalb des Verfahrens wird die zu untersuchende Probenlösung mit unbekannter Proteinkonzentration mit einer mitgelieferten Standardlösung (Testverdünnungsmittel) versetzt. Durch eine enzymatische Reaktion zwischen Lipocalin-2 und den Farbreagenzien (Wasserstoffperoxid und ein Chromogen aus Tetramethylbenzidin) kommt es zu einem Farbumschlag der Reaktionslösung, dessen Intensität von der Konzentration des Proteins abhängig ist. Der farbliche Verlauf der Reaktion in den einzelnen 96-Well-Mikrotiterplatten wird mittels der Messung der

optischen Dichte (per ELISA Reader SpectraMax 340 PC) festgehalten. Anhand des farblichen Verlaufes einer Probelösung bekannter Proteinkonzentration (Standard) lässt sich die Proteinkonzentration der vorliegenden Probe berechnen (Messsoftware: SoftMax Pro).

3.5.2 Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA dient der quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Bei diesem Verfahren binden zwei Antikörper an dem nachzuweisenden Antigen und bilden einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, welcher als Sandwich-Komplex bezeichnet wird. Diese Methode erfolgt wie bei dem beschriebenen ELISA (s.o.) auf einer Mikrotiterplatte, die mit Antikörpern gegen das nachzuweisende Antigen beschichtet ist. Einer der beiden benötigten Antikörper (Coat-Antikörper) haftet bereits mit seinem Fc-Fragment auf der Mikrotiterplatte. Nach der Probenzugabe wird das nachzuweisende Antigen an den freien Teil (Fab-Fragment) des haftenden Coat-Antikörpers gebunden. Die nicht oder unspezifisch gebundenen Antigene, welche den Überstand bilden, werden durch die Waschschriffe entfernt. Falsch positive Messergebnisse werden dadurch möglichst verhindert. Nach Zugabe eines Konjugats bindet ein weiterer spezifischer Antikörper (Detection-Antikörper) an den bereits entstandenen Antikörper-Antigen-Komplex, wodurch der Sandwich-Komplex entsteht. Anschließend erfolgt die Hinzugabe einer Substratlösung (eine zuvor vermischte Lösung aus den beiden Farbreagenzien s.o.), welche den Sandwich-Komplex farblich markiert. Diese Farbreaktion basiert auf der Produktbildung des chromogenen Substrats TMB (Tetramethylbenzidin) mit dem Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP), das an dem Fc-Fragment des Detection-Antikörpers gebundenen ist. Die Produktbildung ist anhand eines Farbumschlags nachweisbar. Nach Einhaltung der vom Hersteller vorgegebenen Inkubationszeit wird die ablaufende Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der optischen Dichte des Produkts erfolgt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Um die Antigenkonzentration in der nachzuweisenden Probe zu bestimmen, wird eine Standardkurve erstellt. Diese besteht aus der aufgetragenen Standardkonzentrationen (X-Achse) und der optischen Dichte (Y-Achse). Die Reaktionsschritte sind schematisch und zum besseren Verständnis in Abbildung 3.5 abgebildet.

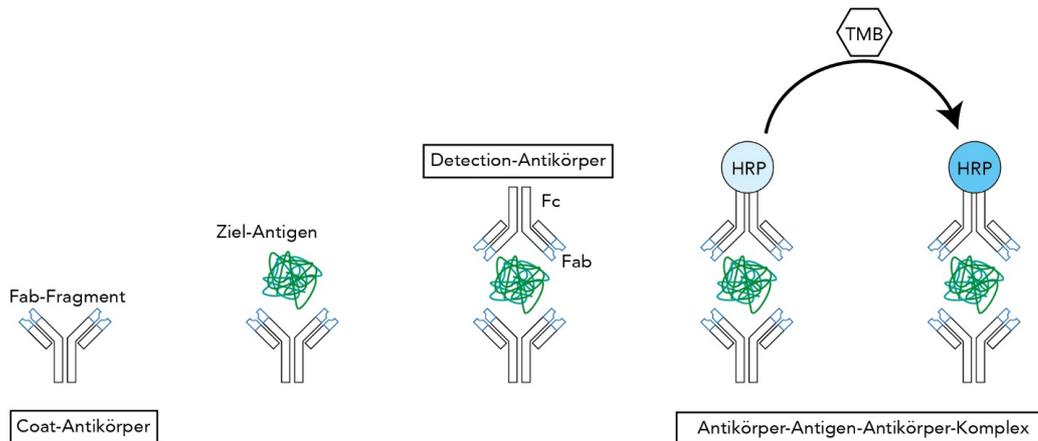


Abbildung 3.5: Schematisches Prinzip des Sandwich-ELISA, modifiziert nach [166]

Abkürzung: Fab = Antigen bindendes Fragment; Fc = Fragment Crystallisable; HRP = Horseradish-Peroxidase; TMB = Tetramethylbenzidin

3.5.3 Versuchsdurchführung des ELISA-Tests für Lipocalin-2

Die Bestimmung der Lipocalin-2-Konzentrationen in den eingefrorenen Serumproben der CF-Patienten erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen „Sandwich“-ELISA-Kit der Firma R&D Systems.

Für die Durchführung des Quantikine ELISA wurden alle zuvor bei -80°C aufbewahrten Blutserumproben mindestens 30 Minuten lang auf Raumtemperatur gebracht. Alle weiteren Reagenzien wie Waschpuffer, Kalibrator RD5-24 (1:5 verdünnt), Substratlösung und der Human Lipocalin-2 Standard wurden gemäß den Vorgaben der mitgelieferten Versuchsprotokolle der Firma Quantikine hergestellt. Analog zur Anleitung erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe mit einer Höchstkonzentration von 10 ng/ml. Durch einen vorangegangenen Testlauf mit dieser Standardverdünnungsreihe an drei ausgewählten Patienten (mit Erwartung von hohen, mittelstarken und niedrigen Werten), wurde eine Gesamtverdünnung von einem Verhältnis 1:20 (8 μl Probe:152 μl verdünnter Kalibrator) festgelegt.

Die mitgelieferte 96-Well-Mikrotiterplatten waren vom Hersteller mit monoklonalen Antikörpern gegen Lipocalin-2 beschichtet worden. Die einzelnen Wells (Einkerbungen in der Mikrotiterplatte) wurden mit 100 μl Probenverdünnungsmittel RD1-52 gefüllt. Die verdünnte Probe (1:20) wurde mit einem Volumen von 50 μl auf die Mikrotiterplatten

pipettiert. Alle weiteren Schritte sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen. Um etwaige Verunreinigungen oder Pipettierfehler auszugleichen, wurde jede Lipocalin-2-Messung doppelt durchgeführt und anschließend die Mittelwerte berechnet.

Tabelle 3.4: ELISA Versuchsprotokoll zur Bestimmung von Lipocalin-2

<i>ELISA Lipocalin-2</i>	
<i>Probenverdünnungsmittel RD1-52</i>	100 µl
<i>Probenvolumen (1:20 verdünnt)</i>	50 µl
<i>Inkubationszeit und -temperatur (Probe)</i>	120 Minuten bei 2-8°C
<i>Waschschritte (Waschung mit jeweils 400 µl Waschpuffer)</i>	4
<i>Humanes Lipocalin-2 Konjugat-Volumen</i>	200 µl
<i>Inkubationszeit und -temperatur (Detection-Antikörper)</i>	120 Minuten bei 2-8°C
<i>Waschschritte (Waschung mit jeweils 400 µl Waschpuffer)</i>	4
<i>Substratlösung (Farbreagenzien A und B)</i>	200 µl
<i>Inkubationszeit und -temperatur (Substrat)</i>	30 min. bei Raumtemperatur
<i>Stopplösung (Schwefelsäure)</i>	50 µl
<i>Wellenlänge</i>	450 nm

Abkürzungen: RD1-52 = Reagent Diluent (Reagenzverdünner)

3.6 Lungenfunktionstest

Ein Hauptmanifestationsort der zystischen Fibrose ist die Lunge. Als etablierten Indikator für die Lungenbeteiligung bei CF-Patienten wird die Lungenfunktionsmessung eingesetzt [210, 219, 225]. Diese Lungenfunktionsmessung per Spirometrie und Bodyplethysmographie gibt sowohl Aufschlüsse über die statischen und dynamischen Lungenfunktionsgrößen als auch konkrete Hinweise auf eine Ventilations-, Diffusions- oder Perfusionsstörung der Lunge [188]. Die Durchführung und Auswertung der Lungenfunktionsprüfung in der klinischen Routine wird als bekannt vorausgesetzt [55, 56].

3.7 Statistische Methoden und Auswertung

Die Datenakquise erfolgte mittels sorgfältiger Übertragung von den verwendeten klinischen Arbeitsplatzsystemen KAOS und Meona (AKAD, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen) in eine detaillierte Tabelle des Computerprogramms Microsoft Excel (2018). Die statistische Analyse sowie die graphische Darstellung der demografischen und klinischen Daten der Patienten konnte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Chicago, III) und Microsoft Excel (2016) durchgeführt und erstellt werden. Die Datenverarbeitung und Auswertung wurden von dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen unterstützt.

Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde zur Prüfung auf Normalverteilung der erhobenen Daten verwendet. Die erhobenen Daten erfüllen nicht die Kriterien für eine Normalverteilung (u.a. symmetrische, eingipflige Verteilung), weswegen zum Vergleich der Daten nichtparametrische Tests angewandt wurden. Der Kruskal-Wallis-Test eignete sich in diesem Fall zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden in der zentralen Tendenz der Messwerte zwischen den einzelnen Subgruppen. Die kategorialen Variablen sind als absolute und relative Zahlen (Prozentangaben) angegeben und wurden quantitativ mit dem Pearson Chi-Quadrat-Test verglichen [123, 265].

Der Zusammenhang der Ergebnisse wurde mittels bivarianter Korrelation mit einem zweiseitigen Signifikanztest nach Spearman bestimmt. Zur Analyse der Korrelationsstärke diente der Spearman'sche Korrelationskoeffizient (r). Dieser nimmt Werte von -1 (perfekter negativer Zusammenhang) über 0 (kein Zusammenhang) bis 1 (perfekter positiver Zusammenhang) ein. Ein negativer Korrelationskoeffizient beschreibt einen antiparallelen Zusammenhang: je größer Variable A, desto kleiner Variable B.

Bei einem positiven Korrelationskoeffizienten verhält es sich parallel: je größer Variable A, desto größer auch Variable B.

Die Betrachtung der Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten ist allerdings nur für die Interpretation der Beziehungsrichtung interessant. Zur Bewertung der Stärke des Korrelationskoeffizienten ist der Wert des Betrags ausschlaggebend. Aufgrund dessen werden die negativen Korrelationskoeffizienten mit Betragsstrichen (z.B. $r = |0,5|$) angegeben.

Die Interpretation der Beträge „ r “ ist in der nachfolgenden Tabelle (3.5) verdeutlicht.

Tabelle 3.5: Interpretation des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) in Anlehnung an Cohen [42]

<i>Bereich r</i>	<i>Zusammenhang</i>
$r = 1 $	perfekt
$ 0,7 < r < 0,99 $	sehr stark
$ 0,5 < r < 0,69 $	stark
$ 0,3 < r < 0,49 $	mittelstark
$ 0,2 < r < 0,29 $	schwach
$0 = r \leq 0,19 $	sehr schwach

Abkürzungen: r = Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r)

Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05^*$ (signifikant) und $p \leq 0,001^{**}$ (hochsignifikant) festgelegt.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte u.a. mit Hilfe von Box-Whisker-Plot-Diagrammen (kurz Box-Plot-Diagrammen). Die Box veranschaulicht die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilenabstand (Q_{0,75}-Q_{0,25}). Der Median ist als schwarzer Balken markiert. Das untere und das obere Quartil begrenzen die Box. Die Whisker zeigen das Maximum und Minimum der Datenverteilung an und entsprechen somit der gesamten Spannweite des Box-Whisker-Plot-Diagrammes. Extremere Ausreißer werden mit Kreisen außerhalb des Whiskers gekennzeichnet.

Die diagnostische Genauigkeit und Effizienz des Proteins Lipocalin-2, der TE sowie der ausgewählten Fibrosemarker und Blutparameter erfolgte mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven [107]. Die ROC-Kurve ermöglicht eine graphische Darstellung der Spezifität entlang der Abszisse (100-0%) sowie der Sensitivität entlang der Ordinate (0-100%). Anhand der höchsten Summe der Wertepaare (Sensitivität und Spezifität) der jeweiligen Messergebnisse wird der optimale Grenzwert ermittelt und festgelegt. Mittels der berechneten Fläche unter der ROC-Kurve (AUC = area under the curve) kann die Präzision der jeweiligen Messung beurteilt werden. Die Werte nahe der Diagonale des Diagramms sprechen für eine Zufallswahrscheinlichkeit, d.h. die Untersuchungsparameter sind für die Diagnose obsolet. Optimale Wert nahe 1 zeigen hohe diagnostische Genauigkeiten an. Die Parameter liegen mit einer bestimmten

Wahrscheinlichkeit in dem Konfidenzintervall (KI) der Grundgesamtheit und werden mit den AUC-Werten angegeben.

Der positive prädiktive Wert (PPV) gibt an, wie viele Patienten bei positiver Testdiagnose tatsächlich krank sind. Der negative prädiktive Wert (NPV) hingegen zeigt auf, wie viele Patienten bei negativem Testergebnis sicher gesund sind. Beide Quotienten geben Aussagekraft über die Testverfahren.

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Daten der CF-Patientenkohorte

Die untersuchte CF-Patientenkohorte ($n = 86$) bestand aus 45 (52,3%) männlichen und 41 (47,7%) weiblichen Patienten. Anhand des Eintrittsalters ließ sich die Kohorte mit einem Grenzwert von ≥ 18 Jahren in unterschiedliche Subgruppen einteilen.

38 (44,2%) Patienten wiesen bei Studieneintritt ein Alter von ≥ 18 Jahren auf und bildeten die CF-Erwachsenenkohorte (CF_{erw}) mit 22 (57,9%) männlichen und 16 (42,1%) weiblichen Patienten. Mit einem Eintrittsalter von < 18 Jahren erreichten die pädiatrischen CF-Patienten ($CF_{\text{päd}}$) eine Kohortenstärke von $n = 48$ (55,8%) mit 23 (47,9%) männlichen und 25 (52,1%) weiblichen pädiatrischen Patienten.

Anhand der Differenzierung zwischen den Patienten ohne und mit Leberbeteiligung ($CF_{\text{noLD}}/CFLD$) konnte festgestellt werden, dass 21 Kinder (43,7%) der $CF_{\text{päd}}$ bereits eine Leberbeteiligung bei Eintritt der Studie aufwiesen ($CFLD_{\text{päd}}$). 27 Kinder (56,3%) erfüllten hingegen nicht die CFLD-Kriterien und bildeten somit zunächst die Zielgruppe CF ohne Leberbeteiligung ($CF_{\text{noLD}_{\text{päd}}}$). 20 Erwachsene (52,6%) wurden mit einer Leberbeteiligung diagnostiziert ($CFLD_{\text{erw}}$). 18 Erwachsene (47,4%) gehörten per definitionem der CF-Kohorte ohne Leberbeteiligung an ($CF_{\text{noLD}_{\text{erw}}}$).

In der Tabelle 4.1 a und b werden die demographischen sowie klinischen Daten dieser Patienten übersichtlich dargestellt.

4.2 Ergebnisse und Merkmalsunterschiede der CF_{noLD} - und der CFLD-Gruppe im Altersvergleich

Zu dem Zeitpunkt der Studie betrug das mediane Alter der gesamten CF_{noLD} -Gruppe (45 Patienten) 16 Jahre (Bereich 2-47 Jahre). Die CFLD-Gruppe (41 Patienten) wies ein medianes Alter von 17 Jahren (Bereich 5-45 Jahre) auf. Unter dieser Betrachtung lag kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,119$), weswegen sich die beiden Subgruppen zum Vergleich eigneten.

Anhand eines Box-Plot-Diagramms in Abbildung 4.1 sind u.a. die Medianwerte sowie die Bereiche dargestellt. Es wird deutlich, dass eine Leberbeteiligung sowohl bei Patienten im Erwachsenenalter als auch bei pädiatrischen Patienten auftrat.

Die CFnoLD_{erw}-Gruppe besaß ein medianes Alter von 29 Jahren, welches keinen signifikanten Unterschied zu dem Alter der CFLD_{erw}-Gruppe (Median 30,5 Jahre) aufwies ($p = 0,55$).

Aus den Berechnungen des medianen Alters der CF_{päd}-Kohort ging hervor, dass die Altersdifferenz zwischen CFLD_{päd} (Median 14 Jahre) und CFnoLD_{päd} (Median 9 Jahre) mit nominal 5 Jahren relativ groß, aber nicht signifikant unterschiedlich war ($p = 0,099$).

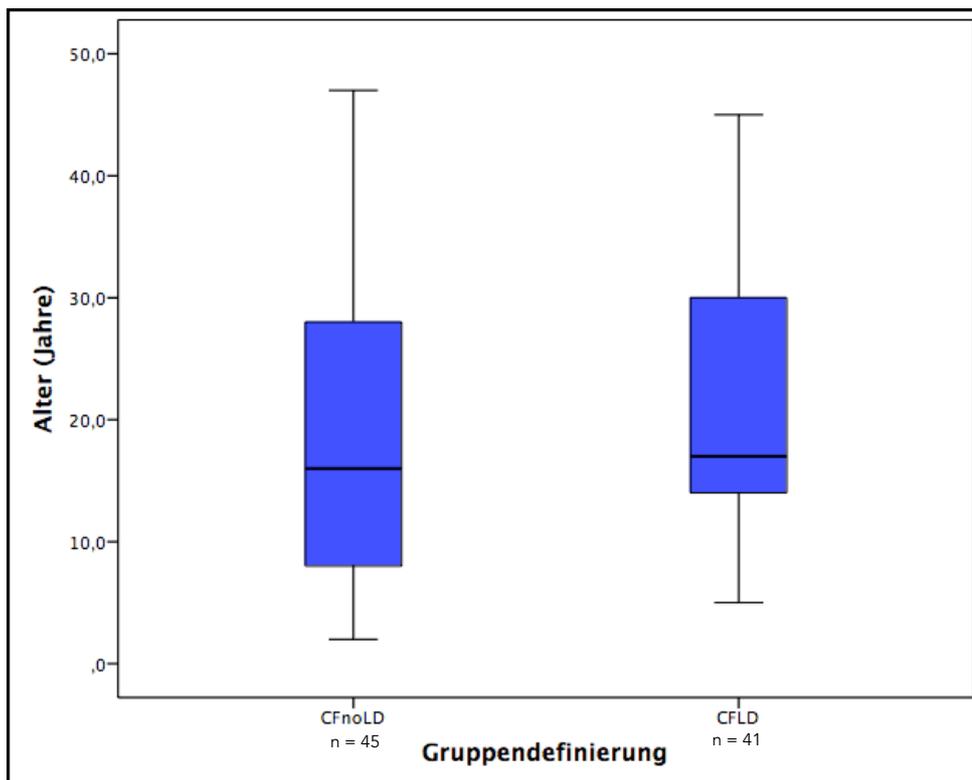


Abbildung 4.1: Box-Plot-Darstellung der Altersverteilung aller eingeschlossenen Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86)

Das mediane Alter zwischen den CFnoLD (n = 45) und CFLD-Kohorten (n = 41) unterscheidet sich nicht signifikant.

Abkürzungen: CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

4.3 Klinische Daten der CF-Patientenkohorte

Die Tabellen 4.1.a und 4.1.b fassen neben den demographischen auch die klinischen Daten der CF-Patientenkohorte zusammen. Innerhalb der Altersgruppen wiesen die BMI-Werte keine signifikanten Unterschiede auf ($p(\text{CF}_{\text{erw}}) = 0,41$, $p(\text{CF}_{\text{päd}}) = 0,055$).

Auffällig waren die signifikanten Unterschiede für die Lipocalin-2-Konzentrationen und die TE-Ergebnisse, auf welche in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

Die leberbezogenen Fibrosemarker zeigten jeweils deutliche Unterschiede zwischen den CFnoLD- und CFLD-Gruppen. Ein eindeutiger Trend zu erhöhten Messwerten bei Leberbeteiligung war in beiden Altersgruppen festzustellen.

Innerhalb der jeweiligen Altersgruppe (CF_{erw} und $\text{CF}_{\text{päd}}$) waren die Mediane der Transaminasen ALT und AST in der CFnoLD-Kohorte niedriger (ALT <22 U/l; AST <23 U/l) im Vergleich zu der CFLD-Patientengruppe (ALT >27 U/l; AST >24 U/l). Es lag jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Transaminasen der $\text{CFnoLD}_{\text{erw}}$ gegenüber den CFLD_{erw} vor ($p(\text{ALT}) = 0,059$; $p(\text{AST}) = 0,224$).

Die $\text{CF}_{\text{päd}}$ -Kohorte hingegen wies signifikante Unterschiede in den Transaminasen zwischen den $\text{CFnoLD}_{\text{päd}}$ - gegenüber den $\text{CFLD}_{\text{päd}}$ -Patienten auf ($p(\text{ALT}) = 0,042^*$; $p(\text{AST}) = 0,011^*$).

Die Fibrose-Scores APRI und FIB-4 zeigten ein ähnliches Bild bei Kindern und Erwachsenen: Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen beider Fibrose-Scores bei $\text{CFnoLD}_{\text{erw}}$ und CFLD_{erw} vor ($p(\text{APRI}) = 0,177$; $p(\text{FIB-4}) = 0,072$). Allerdings waren signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede zwischen den Medianen der Fibrose-Scores der $\text{CFnoLD}_{\text{päd}}$ und $\text{CFLD}_{\text{päd}}$ zu beobachten ($p(\text{APRI}) = 0,005^*$; $p(\text{FIB-4}) = 0,001^{**}$).

In der Gesamtkohorte waren erniedrigte Thrombozytenkonzentrationen nach Eintritt der Leberbeteiligung zu beobachten. Diese Werte wiesen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den CFnoLD- und CFLD-Gruppen auf ($p > 0,06$).

Innerhalb der jeweiligen Altersgruppe gab es keinen Unterschied des Entzündungsmarkers CRP zwischen der CFnoLD- und der CFLD-Kohorte (CRP-Median ($\text{CF}_{\text{päd}}$) = 0,5 U/l; CRP-Median (CF_{erw}) = 5,9 U/l).

Die Lungenfunktionsparameter der CFLD-Patienten waren im Vergleich zu den CFnoLD-Patienten erniedrigt, ohne dass ein signifikanter Unterschied vorlag.

Tabelle 4.1.a: Eigenschaften, Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten

Mittelwert (Median) ± Standardabweichung, der Bereich und der Signifikanzwert zwischen den jeweiligen CFnoLD- und CFLD-Kohorten sind dargestellt.

Demographische und klinische Daten	Erwachsene		Kinder	
<i>n</i> /%	38 (44,2%)		48 (55,8%)	
Männlich (n/%)	22 (57,9%)		23 (47,9%)	
Weiblich (n/%)	16 (42,1%)		25 (52,1%)	
	CFnoLD_{erw}	CFLD_{erw}	CFnoLD_{päd}	CFLD_{päd}
	n = 18	n = 20	n = 27	n = 21
Alter (Jahre)	30,444 (29)	32 (30,5)	10,63 (9)	12,667 (14)
	± 7,957	± 7,218	± 4,473	± 3,12
<i>Bereich</i>	18-47	18-45	2-18	5-17
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,548		p = 0,099	
BMI (kg/m²)	21,26 (21,23)	20,31 (20,3)	16,61 (16,42)	18,14 (17,6)
	± 2,88	± 1,96	± 2,65	± 2,75
<i>Bereich</i>	16,83-27,44	17,71-24,16	12,49-25,28	13,6-24,35
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,405		p = 0,055	
Lipocalin-2 (ng/ml)	241,518 (226,57)	237,07	101,32	230,33
	± 103,367	(168,84)	(84,81)	(169,83)
		± 187,41	± 102,14	± 165,95
<i>Bereich</i>	83,55-475, 67	73,43-766,81	25,28-510,09	86,98-689,61
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,242		p = 0,0001**	
TE-Lebersteifigkeit (kPa)	4,2 (4,15)	12,73 (8,65)	4,46 (4,3)	8,38 (6,7)
	± 0,971	± 15,502	± 0,935	± 5,41
<i>Bereich</i>	2,2-6,1	2,7-75	2,8-6,2	3,5-24,8
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,0001**		p = 0,001**	
ALT (U/l)	23,889 (21)	31,45 (28)	23,926 (22)	42,143 (27)
	± 10,215	± 14,81	± 7,696	± 41,942
<i>Bereich</i>	12-50	13-79	10-44	17-208
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,059		p = 0,042*	
AST (U/l)	21,167 (20,5)	28,55 (24)	23,593 (23)	34,429 (27)
	± 6,474	± 19,069	± 6,375	± 18,1
<i>Bereich</i>	13-36	13-98	13-37	18-84
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,224		p = 0,011*	

Tabelle 4.1.b: Eigenschaften, Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten
Mittelwert (Median) \pm Standardabweichung, der Bereich und der Signifikanzwert zwischen den jeweiligen CFnoLD- und CFLD-Kohorten sind dargestellt.

APRI	0,192 (0,185)	0,816 (0,227)	0,205 (0,18)	0,296 (0,26)
	$\pm 0,075$	$\pm 1,66$	$\pm 0,147$	$\pm 0,173$
Bereich	0,087-0,38	0,08-7,353	0,11-0,91	0,14-0,73
Signifikanzwert	p = 0,177		p = 0,005*	
FIB-4	0,49 (0,437)	1,858 (0,575)	0,154 (0,16)	0,243 (0,229)
	$\pm 10,447$	$\pm 3,85$	$\pm 0,066$	$\pm 0,102$
Bereich	0,19-1,19	0,19-17,044	0,04-0,3	0,08-0,45
Signifikanzwert	p = 0,072		p = 0,001**	
Thrombozyten (G/l)	294,056 (288,5)	240,6 (249)	329,889 (323)	304, 524 (289)
	$\pm 76,596$	$\pm 119,098$	$\pm 60,538$	$\pm 66,952$
Bereich	120-486	17-399	222-464	204-475
Signifikanzwert	p = 0,219		p = 0,063	
CRP (mg/l)	9,374 (5,9)	8,695 (5,9)	2,115 (0,5)	3,147 (0,5)
	$\pm 10,447$	$\pm 9,895$	$\pm 5,88$	$\pm 6,41$
Bereich	0,1-39,4	0,1-31,1	0,1-29,5	0,1-26,4
Signifikanzwert	p = 0,629		p = 0,158	
FEV1 (%)	72,528 (68)	58,305 (56,2)	93,407 (93,407)	87,619 (90)
	$\pm 21,225$	$\pm 23,343$	$\pm 19,651$	$\pm 20,549$
Bereich	38,9-118	21,2-106	51-138	42-117
Signifikanzwert	p = 0,072		p = 0,46	
VC (%)	87,856 (89,3)	79,135 (74,95)	96,593 (95)	91,382 (91)
	$\pm 13,94$	$\pm 21,486$	$\pm 16,32$	$\pm 13,297$
Bereich	18-47	40,3-119	68-138	63-107
Signifikanzwert	p = 0,214		p = 0,382	

Abkürzungen: CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung; erw = erwachsene Patienten; päd = pädiatrische Patienten; n = Anzahl; SD = Standardabweichung; BMI = Body-Mass-Index; TE = Transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index; CRP = C-reaktives Protein; FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität; VC = Vitalkapazität;

* = signifikant; ** = hochsignifikant

Die Ergebnisse zeigen, dass die leberbezogenen Laborwerte, Fibrosemarker und -scores der CFLD_{päd}-Kohorte signifikante Unterschiede zwischen CFLD und CFnoLD aufweisen. Im Gegensatz dazu weist die CF_{erw}-Kohorte nur in der TE-Messung signifikante Unterschiede auf.

4.3.1 Ergebnisvergleich der Messung von Lipocalin-2

Der Median der gesamten Lipocalin-2-Messungen bei Kindern und Erwachsenen betrug 154,1 ng/ml (Bereich 25,28-766,81 ng/ml) mit einer Standardabweichung von 153,71 ng/ml und einem Standardfehler von 16,58 ng/ml.

Separiert in CFnoLD- und CFLD-Patienten unterschieden sich die medianen LCN2-Werte mit einer deutlichen Signifikanz von $p = 0,005^*$.

In der CFnoLD-Kohorte ließ sich ein LCN2-Median von 118,88 ng/ml berechnen (Bereich 25,28-510,09 ng/ml). Der Median der CFLD-Kohorte betrug 169,52 ng/ml (Bereich 73,43-766,81 ng/ml). Demzufolge lagen die LCN2-Werte der CFLD-Patienten sowohl im Median als auch absolut erhöht vor.

Diese Ergebnisse sind als Box-Plot-Diagramm in Abbildung 4.2 veranschaulicht.

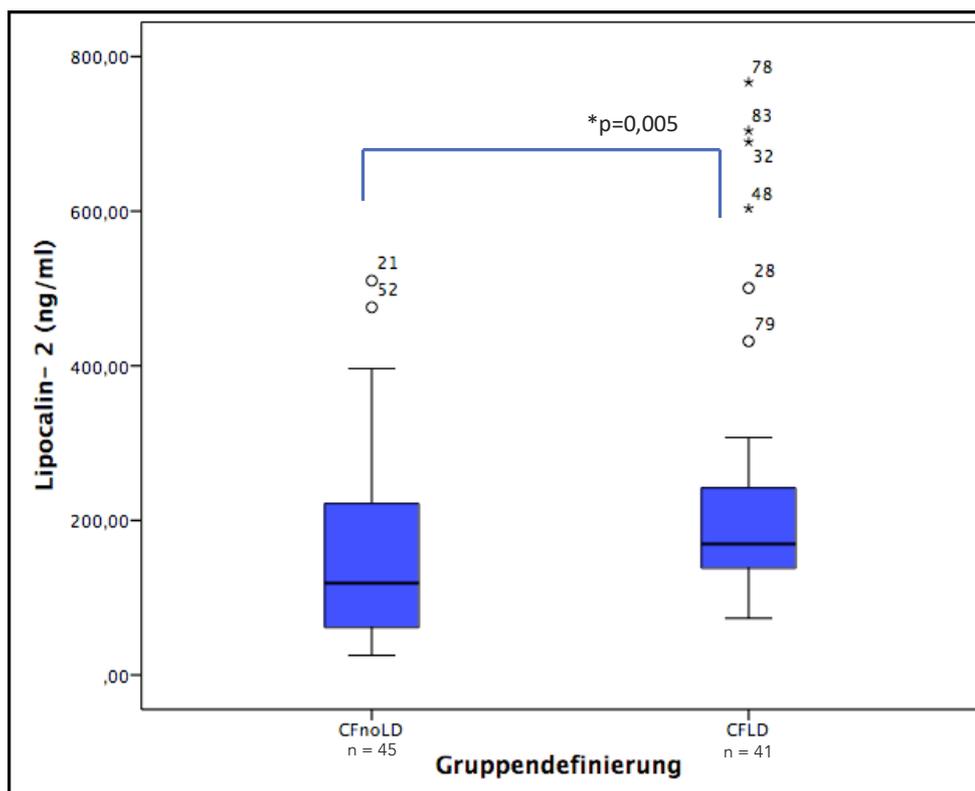


Abbildung 4.2: Box-Plot-Darstellung der Lipocalin-2-Werteverteilung aller eingeschlossenen CF-Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86)

Die Mediane und auch die Abweichungen der Lipocalin-2-Messung der Patienten ohne (n = 45) und mit (n = 41) Leberbeteiligung unterscheiden sich mit einer deutlichen Signifikanz.

Abkürzungen: CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

4.3.2 Ergebnisvergleich der transienten Elastographie (TE)

Die Messung der TE zeigte zwischen den beiden Gruppen der CFnoLD (Median 4,3 kPa (Bereich 2,2-6,2 kPa)) und der CFLD-Kohorte (Median 6,9 kPa (Bereich 2,7-75 kPa)) einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001^{**}$). Dies ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Teile dieser Arbeit wurden bereits für eine Publikation verwendet, in der eine frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei CF_{päd} durch die Messung des durchschnittlichen jährlichen Anstieg der Lebersteifigkeit ermittelt werden konnte.

Die hier festgestellten signifikanten Unterschiede in den TE-Werten zwischen CFnoLD und CFLD wurden publiziert in [140, 142].

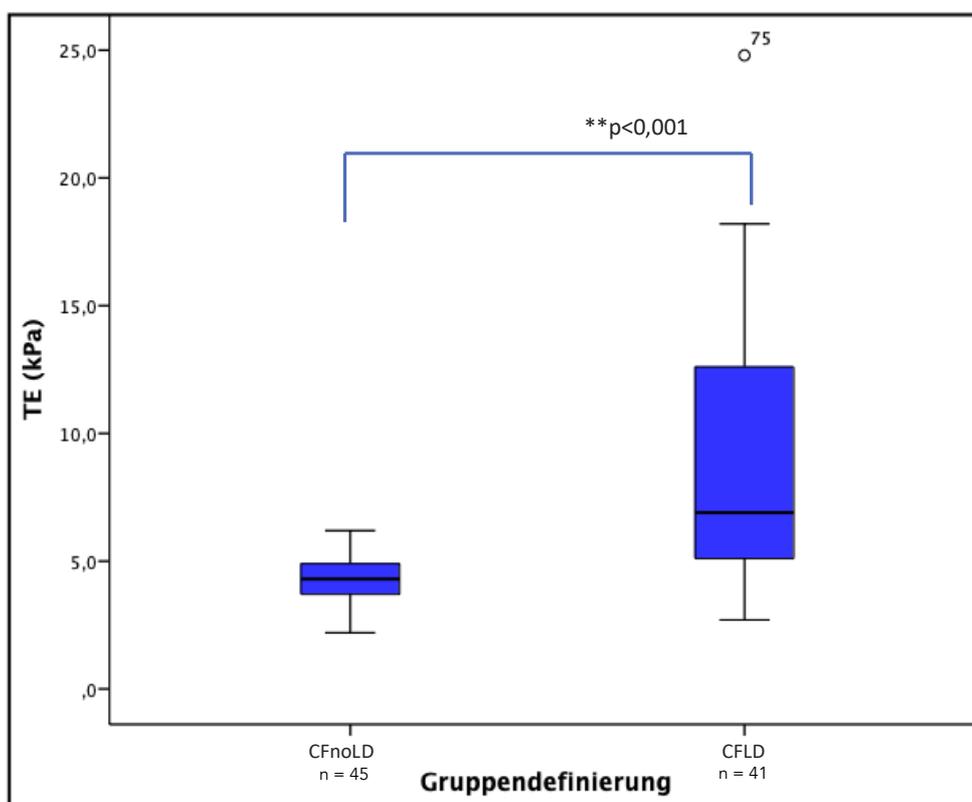


Abbildung 4.3: Box-Plot-Darstellung der Werte aus der transienten hepatischen Elastographie-Untersuchung aller eingeschlossenen CF-Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86)

Ein hochsignifikanter Unterschied der kPa-Werte für die Lebersteifigkeit (bzw. Elastizität) zwischen den Patienten ohne (n = 45) und mit (n = 41) Leberbeteiligung wird hier deutlich.

Abkürzungen: TE = Transiente Elastographie; kPa = Kilopascal; CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

4.4 Analyse der pädiatrischen CF-Patientenkohorte

4.4.1 Ergebnisse der Lipocalin-2-Messung

In der pädiatrischen Kohorte (Cut-off <18 Jahre) ließ sich ein hochsignifikanter ($p = 0,0001^{**}$) Unterschied zwischen den Untergruppen CFnoLD_{päd} und CFLD_{päd} in Hinsicht auf die Lipocalin-2-Proteinkonzentration feststellen.

Die Abbildung 4.4 zeigt neben den Untergruppen der pädiatrischen Patienten (blau) die erwachsenen Patienten (hellblau).

Die Messung der LCN2-Konzentration ergab einen Median von 84,81 ng/ml (Bereich 25,28-510,09 ng/ml) für die CFnoLD_{päd}-Kohorte und einen Median von 169,83 ng/ml (Bereich 86,98-689,61 ng/ml) für die CFLD_{päd}-Kohorte.

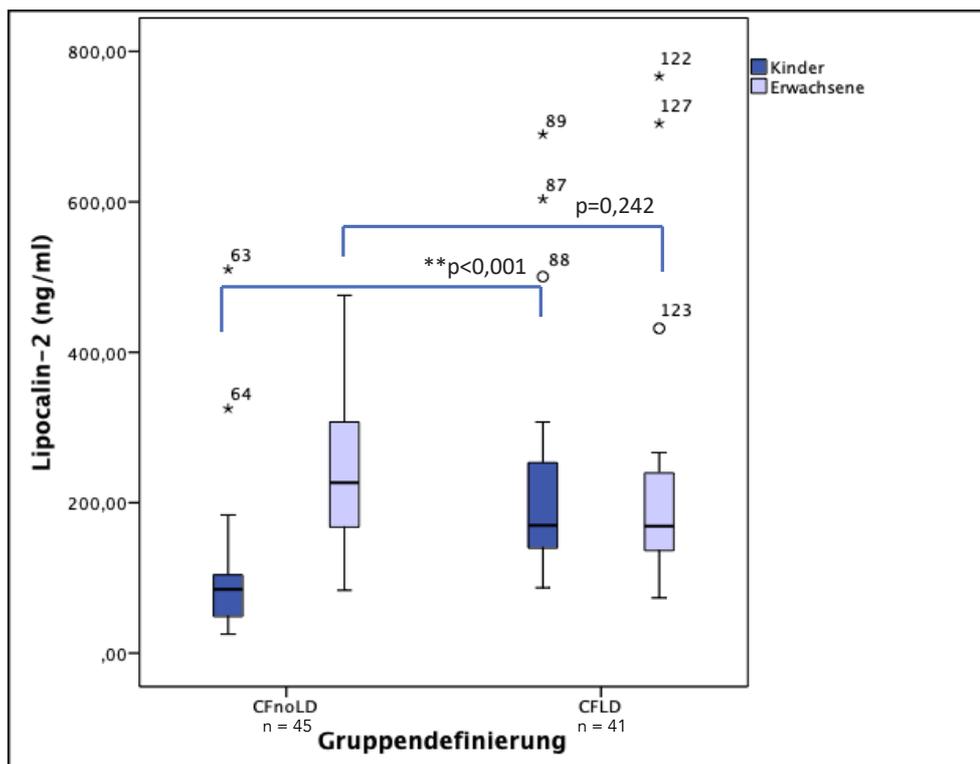


Abbildung 4.4: Altersseparation: Box-Plot-Darstellung der Lipocalin-2-Werteverteilung aller eingeschlossenen CF-Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86)

Zwischen den pädiatrischen Patienten ohne (n = 27) und mit (n = 21) Leberbeteiligung (dunkelblau) ist ein hochsignifikanter Unterschied der Lipocalin-2-Ergebnisse zu sehen. Die erwachsenen Patienten (hellblau) weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Lipocalin-2-Werten der CFnoLD- (n = 18) und CFLD-Kohorte (n = 20) auf.

Abkürzungen: CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

4.4.2 Ergebnisse der transienten Elastographie (TE)

Aus den TE-Ergebnissen zur Messung der Lebersteifigkeit ließen sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen CFnoLD_{päd} (Median 4,3 kPa (Bereich 2,8-6,2 kPa)) und CFLD_{päd} (Median 6,7 kPa (Bereich 3,5-24,8 kPa)) mit $p < 0,001^{**}$ berechnen. Dies ist in Abbildung 4.5 verdeutlicht.

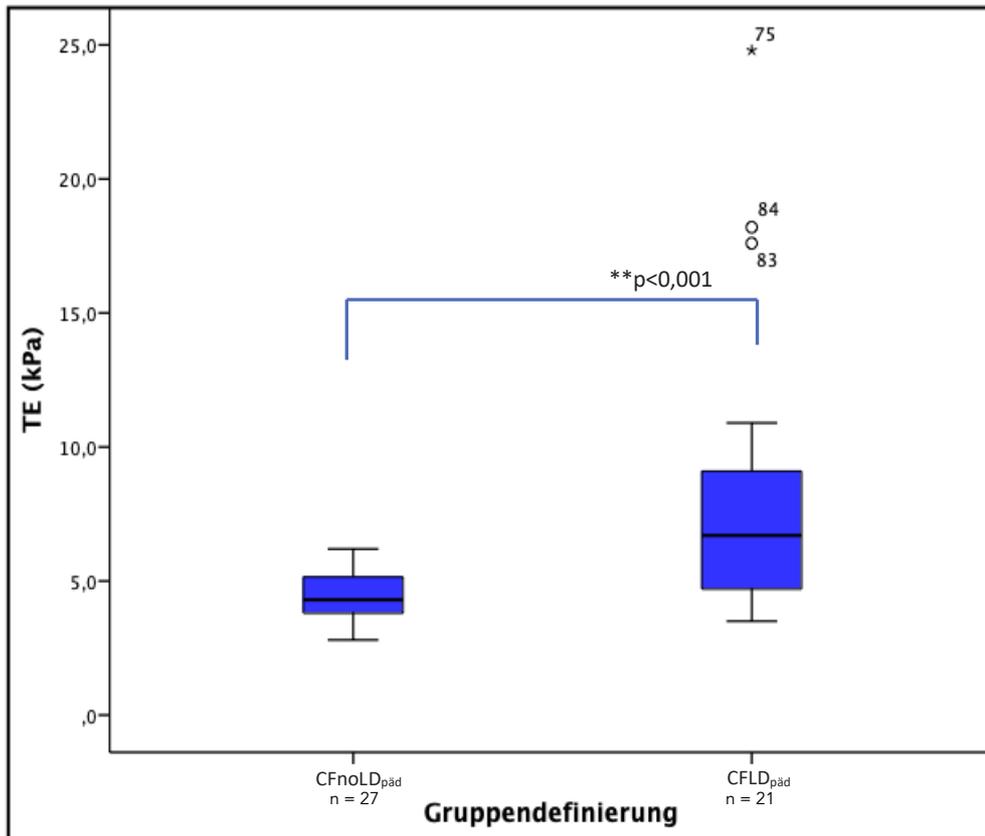


Abbildung 4.5: Box-Plot-Darstellung der transienten Elastographie-Werte aller eingeschlossenen pädiatrischen CF-Patienten unterteilt in CFnoLD_{päd}/CFLD_{päd} (n = 48)

Die Ergebnisse der TE-Messungen bei den pädiatrischen Patienten erreichen hochsignifikante Unterschiede zwischen den CFnoLD- (n = 27) und CFLD-Patienten (n = 21).

Abkürzungen: TE = Transiente Elastographie; kPa = Kilopascal; CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

4.4.3 ROC-Analyse: Messgenauigkeit von Lipocalin-2, TE und Fibrosemarkern

In der ROC-Analyse werden die Genauigkeiten der Messmethoden (Sensitivität und Spezifität) bzw. hier die Unterscheidungsfähigkeit zwischen CFnoLD und CFLD der einzelnen Marker in den jeweiligen Altersgruppen berechnet und grafisch dargestellt.

In der Abbildung 4.6 sind die ROC-Analysen für Lipocalin-2, TE, ALT, AST, APRI und FIB-4 bei den pädiatrischen Patienten abgebildet. Die jeweiligen AUC-Werte sowie Konfidenzintervalle (KI) sind in der Tabelle 4.2 aufgeführt.

Eine AUC von 86,9% (KI 76,3-97,6%) konnte anhand der Lipocalin-2-Konzentrationen für die Unterscheidung der CFnoLD_{päd}-Kohorte (LCN2-Median 84,81 ng/ml) von der CFLD_{päd}-Kohorte (LCN2-Median 169,83 ng/ml) ermittelt werden. Aus dieser Berechnung geht hervor, dass LCN2 unter den verwendeten Parametern die höchste Passung in Bezug auf die Vorhersage einer CFLD besaß.

Die Unterschiede der TE-Werte (CFnoLD_{päd}-Median 4,3 kPa; CFLD_{päd}-Median 6,7 kPa) erreichten eine AUC-Fläche von 79,4% (KI 66-92,7%).

Die AUC-Berechnung für die FIB-4-Messungen (CFnoLD_{päd}-Median 0,16; CFLD_{päd}-Median 0,229) ergaben 77,2% (KI 63,7-90,8%).

Aus den Messergebnissen des APRI-Scores (CFnoLD_{päd}-Median 0,18; CFLD_{päd}-Median 0,26) ging ein AUC-Wert von 73,8% (KI 59,2-88,4%) hervor.

Die Messgenauigkeit der Transaminase AST (CFnoLD_{päd}-Median 23 U/l; CFLD_{päd}-Median 27 U/l) betrug lediglich 71,4% (KI 59,2-88,4%).

Den geringsten AUC-Wert ermittelten wir für ALT (CFnoLD_{päd}-Median 22 U/l; CFLD_{päd}-Median 27 U/l) mit 67,2% (KI 51,4-83%).

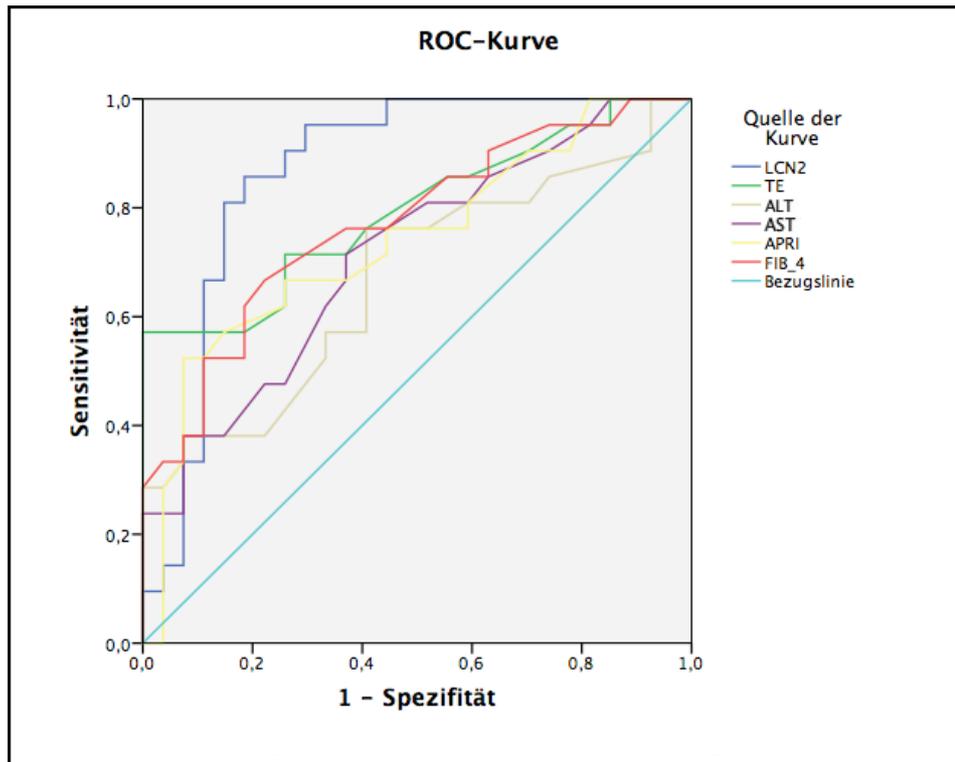


Abbildung 4.6: Darstellung der Genauigkeit der CFLD-Messmethoden anhand der ROC-Analyse bei pädiatrischen CF-Patienten (n = 48)

Die Lipocalin-2-Messwerte (blau) erreichen die höchste Passgenauigkeit zur Ermittlung einer CFLD, gefolgt von den TE-Ergebnissen (grün). Mit geringeren Genauigkeiten sind die Fibrosescores FIB-4 (rot) und APRI (gelb) mit CFLD assoziiert. AST (lila) und ALT (braun) weisen niedrigere aber weiterhin signifikante Messgenauigkeiten auf. Die winkelhalbierende Bezugslinie (türkis) stellt die Zufallsbasis dar.

Abkürzungen: LCN2 = Lipocalin-2; TE = transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index

Tabelle 4.2: Vergleich der Messmethoden zur Ermittlung einer CFLD berechnet anhand der ROC-Analysen bei pädiatrischen CF-Patienten

	<i>Lipocalin-2</i>	<i>TE</i>	<i>ALT</i>	<i>AST</i>	<i>APRI</i>	<i>FIB-4</i>
<i>AUC (%)</i>	86,9	79,4	67,2	71,4	73,8	77,2
<i>Konfidenzintervall (%)</i>	76,3-97,6	66-92,7	51,4-83	56,8-86,1	59,2-88,4	63,7-90,8

Abkürzungen: ROC-Kurve = Receiver-Operating-Characteristic-Kurve; AUC = Area-under-Curve; TE = Transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index;

4.5 Analyse der erwachsenen CF-Patientenkohorte

4.5.1 Ergebnisse der Lipocalin-2-Messung

Abbildung 4.4 (Altersseparation) zeigt ein Box-Plot-Diagramm, in dem die Lipocalin-2-Werte der pädiatrischen den erwachsenen Patienten gegenübergestellt sind.

Der LCN2-Median der CFnoLD_{erw}-Patienten betrug 226,57 ng/ml (Bereich 83,55-475,67 ng/ml). Die CFLD_{erw}-Patienten erreichten einen LCN2-Median von 168,84 ng/ml (Bereich 73,43-766,81 ng/ml).

Es bestehen damit keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,242$) zwischen den LCN2-Konzentrationen im Serum erwachsener CFLD- und CFnoLD-Patienten.

4.5.2 Ergebnisse der transienten Elastographie (TE)

Die Messung der Lebersteifigkeit mittels TE ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p = 0,0001^{**}$) zwischen der CFnoLD_{erw}-Kohorte (Median 4,15 kPa (Bereich 2,2-6,1 kPa) und der CFLD_{erw}-Kohorte (Median 8,65 kPa (Bereich 2,7-75 kPa)).

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 veranschaulicht.

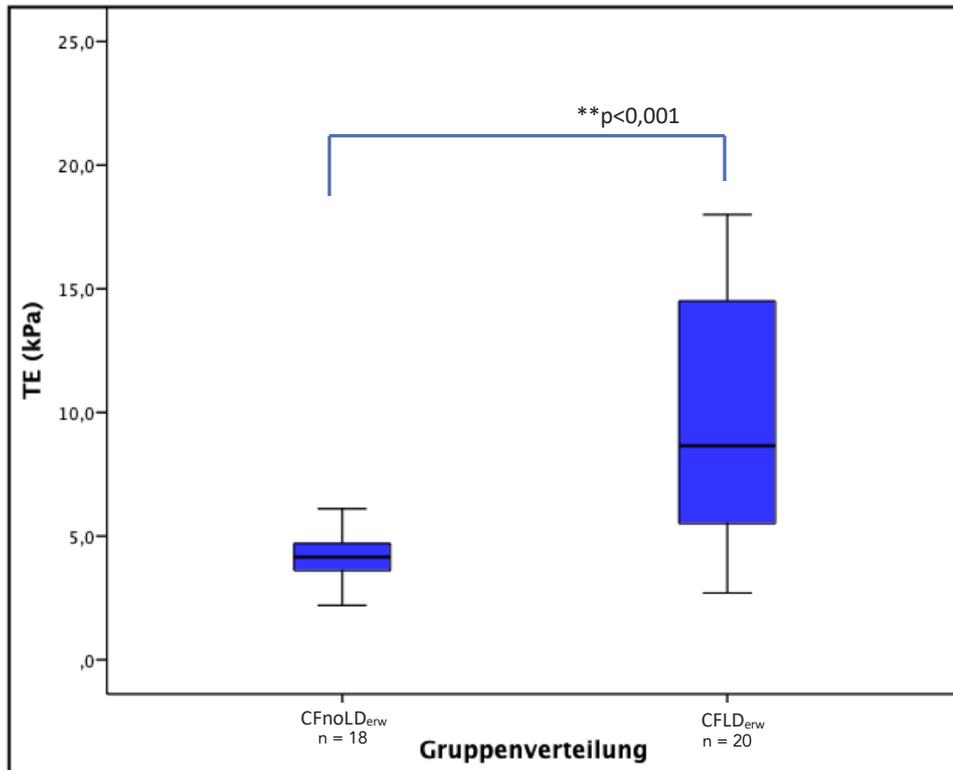


Abbildung 4.7: Box-Plot-Darstellung der transienten hepatischen Elastographie-Werte aller eingeschlossenen erwachsenen Patienten unterteilt in CFnoLD_{erw}/CFLD_{erw} (n = 38)

Die Messung per transienter Elastographie erreicht sehr hohe signifikante Unterschiede zwischen den erwachsenen Patienten ohne (n = 18) und mit (n = 20) Leberbeteiligung.

Abkürzungen: TE = Transiente Elastographie; kPa = Kilopascal; CFnoLD = zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung; CFLD = zystische Fibrose mit Leberbeteiligung

4.5.3 ROC-Analyse: Messgenauigkeit von Lipocalin-2, TE und Fibrosemarkern

In der Abbildung 4.8 sind die ROC-Analysen von verschiedenen Methoden zur CFLD Diagnostik im Vergleich bei erwachsenen Patienten (CF_{erw}) abgebildet.

Hier erreicht Lipocalin-2 (CFnoLD_{erw}-Median 226,57 ng/ml; CFLD_{erw}-Median 168,84 ng/ml) lediglich eine AUC von 38,9% (KI 20,4-57,3%).

Die beste AUC-Berechnung erreichen die Werte der TE-Messung (86,1% (KI 73,7-98,5%)) für CFnoLD_{erw}-Median 4,15 kPa und CFLD_{erw}-Median 8,56 kPa.

Die Messgenauigkeit von ALT (CFnoLD_{erw}-Median 21 U/l; CFLD_{erw}-Median 28 U/l) beträgt 67,9% (KI 50,4-85,4%).

Die AUC von AST (CFnoLD_{erw}-Median 20,5 U/l; CFLD_{erw}-Median 24 U/l) erreicht 61,5% (KI 43,2-79,9%).

Die APRI-Bestimmung (CFnoLD_{erw}-Median 0,185; CFLD_{erw}-Median 0,227) erreicht eine 64,9%ige AUC-Fläche (KI 47,2-82,5%).

Aus den FIB-4-Messungen (CFnoLD_{erw}-Median 0,437; CFLD_{erw}-Median 0,575) lässt sich eine AUC von 67,1% (KI 48,9-85,3%) berechnen.

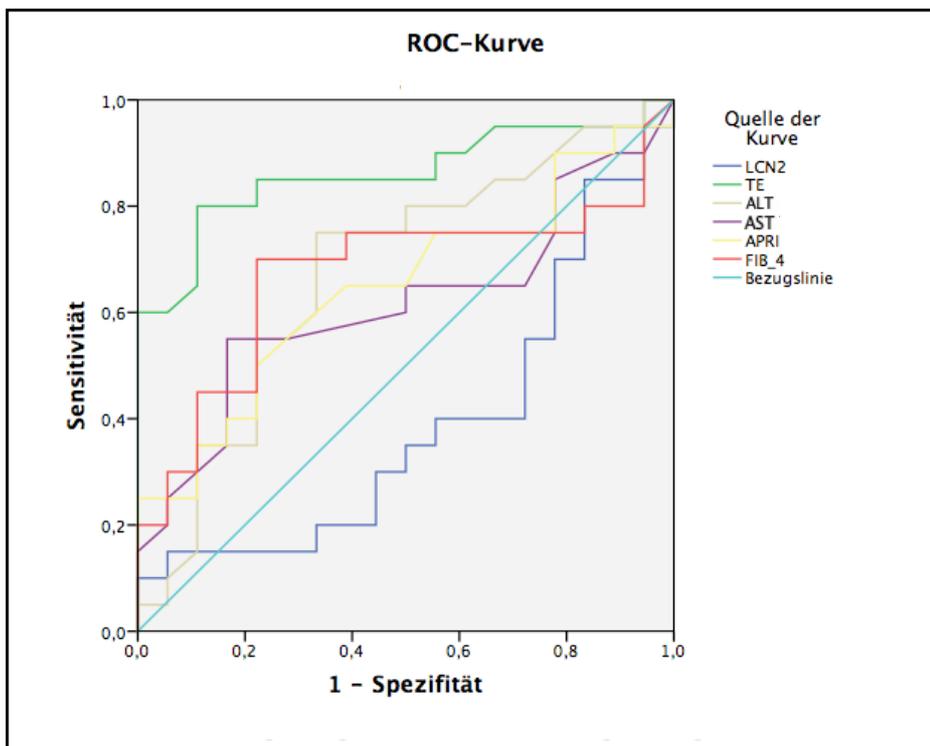


Abbildung 4.8: Darstellung der Genauigkeit der CFLD-Messmethoden anhand der ROC-Analyse bei erwachsenen Patienten (n = 38)

Die TE-Ergebnisse (grün) erreichen die höchste Messgenauigkeit. Mit großem Abstand folgen in absteigender Reihenfolge ALT (hellbraun), FIB-4 (rot), APRI (gelb), AST (lila) und Lipocalin-2 (blau) mit einer sehr niedrigen Messgenauigkeit ohne Signifikanz nahe der hellblauen Bezugslinie (Zufallsbasis).

Abkürzungen: LCN2 = Lipocalin-2; TE = Transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index

Tabelle 4.3: Vergleich der Messmethoden berechnet anhand der ROC-Analysen bei erwachsenen Patienten

	<i>Lipocalin-2</i>	<i>TE</i>	<i>ALT</i>	<i>AST</i>	<i>APRI</i>	<i>FIB-4</i>
<i>AUC (%)</i>	38,9	86,1	67,9	61,5	64,9	67,1
<i>Konfidenzintervall (%)</i>	20,4-57,3	73,7-98,5	50,4-85,4	43,2-79,9	47,2-82,5	48,9-85,3

Abkürzungen: ROC-Kurve = Receiver-Operating-Characteristic-Kurve; AUC = Area-under-ROC; TE = Transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index;

4.6 Korrelationen von Lipocalin-2 mit den Vergleichsparametern

Die Korrelationen von Lipocalin-2 mit den ausgewählten Vergleichsparametern sind in der Tabelle 4.4 dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten sind dabei anhand der Tabelle 3.5 zu bewerten.

Auffällig erschienen die mittelstarken Korrelationen von Lipocalin-2 zu den Messergebnissen der TE ($r = 0,428$) und zu den Fibrosemarkern ALT, AST sowie dem Fibrosescore APRI ($r > 0,3$) in der CF_{päd}-Patientenkohorte.

Im Kontrast dazu waren die Korrelationskoeffizienten von Lipocalin-2 zu den erwähnten Parametern der CF_{erw}-Patientenkohorte als schwach zu bewerten ($r < 0,243$).

Die Korrelation zwischen LCN2 und den Thrombozyten sowie FIB-4 ist wiederum mittelstark ($r = 0,36$).

Auf die einzelnen Signifikanzen und Vergleiche zwischen Lipocalin-2 und den ausgewählten Vergleichsparametern wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

Tabelle 4.4: Korrelationskoeffizienten nach Spearman von Lipocalin-2 mit Werten der TE, Labor- und Lungenfunktionsparametern der einbezogenen CF-Patienten

		<i>TE</i>	<i>APRI</i>	<i>FIB-4</i>	<i>ALT</i>	<i>AST</i>	<i>Thr.</i>	<i>CRP</i>	<i>FEV1</i>	<i>VC</i>
<i>CF_{päd}</i>	r	0,428	0,347	0,210	0,332	0,431	0,029	0,089	0,33	0,269
	p	0,002*	0,016*	0,152	0,021	0,002*	0,847	0,549	0,022*	0,064
<i>CF_{noLD}</i>	r	0,282	0,16	0,089	0,134	0,367	0,296	0,09	0,344	0,072
	p	0,155	0,425	0,661	0,505	0,06	0,134	0,654	0,079	0,721
<i>CFLD</i>	r	0,023	0,034	0,125	0,284	0,051	0,042	0,294	0,45	0,562
	p	0,92	0,882	0,59	0,213	0,827	0,858	0,196	0,41	0,008*
<i>CF_{erw}</i>	r	0,017	0,163	0,243	0,152	0,057	0,360	0,155	0,163	0,366
	p	0,919	0,328	0,142	0,361	0,735	0,026*	0,354	0,329	0,024*
<i>CF_{noLD}</i>	r	0,032	0,092	0,125	0,135	0,113	0,009	-0,057	0,032	0,236
	p	0,9	0,717	0,621	0,592	0,654	0,971	0,823	0,9	0,345
<i>CFLD</i>	r	0,138	0,161	0,259	0,241	-0,039	0,438	0,224	0,313	0,46
	p	0,563	0,497	0,269	0,306	0,87	0,054	0,342	0,179	0,041
<i>Gesamt</i>	r	0,219	0,112	0,345	0,211	0,123	0,014	0,334	0,452	0,414
	p	0,043*	0,305	0,001**	0,051	0,259	0,901	0,002*	0,000**	0,002

Abkürzungen: r = Korrelationskoeffizient nach Spearman; p = Signifikanz; TE= Transiente Elastographie; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; Thr. = Thrombozyten; CRP = C-reaktives Protein; FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität; VC = Vitalkapazität; * = signifikant; ** = hochsignifikant

4.6.1 Zusammenhang von Lipocalin-2 und der TE

Die Überprüfung auf einen Zusammenhang oder eine Wechselwirkung zwischen Lipocalin-2 und der TE ergab in der Gesamtkohorte nur einen schwachen Korrelationskoeffizienten ($r = 0,219$).

Die Tabelle 4.4 zeigt eine eindeutige Beziehung zwischen Lipocalin-2 und der TE der $CF_{päd}$ -Gesamtkohorte mit $r = 0,428$ und $p = 0,002^*$.

Wird diese $CF_{päd}$ -Kohorte nach Leberbeteiligung unterteilt, war in der $CF_{noLD}_{päd}$ -Kohorte ein schwacher Bezug zwischen Lipocalin-2 und TE zu finden ($r = 0,282$).

Dagegen lag keine Assoziation dieser Parameter in der $CFLD_{päd}$ vor ($r = |0,023|$).

CF_{erw}-Patienten zeigte keine Korrelation zwischen Lipocalin-2 und der transienten Elastographie auf ($r = |0,017|$). Auch nach Unterteilung in CFnoLD_{erw} und CFLD_{erw} blieb der Korrelationskoeffizient schwach ($r < 0,2$).

4.6.2 Zusammenhang von Lipocalin-2 und den Serumparametern

Die Korrelationen nach Spearman für die Einordnung des Zusammenhangs von Lipocalin-2 und den Blutparametern wurden ebenfalls in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Der Korrelationskoeffizient „r“ für die Korrelation Lipocalin-2 mit dem Fibrosescore APRI ergab in der gesamten pädiatrischen Patientenkohorte einen mittelstarken Wert ($r = 0,347$).

Der Fibrosescore FIB-4 erreichte einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,21$. Der Korrelationskoeffizient von ALT mit Lipocalin-2 beträgt $r = 0,332$. AST erreicht einen Wert von $r = 0,431$. Alle genannten Werte zeigen nur einen mittelstarken Zusammenhang an.

Die Verbindungen von LCN2 zu der Thrombozytenzahl ($r = |0,029|$) sowie zu dem Entzündungsparameter CRP ($r = 0,089$) waren als zusammenhangslos zu bewerten.

Durch Separierung der CF_{päd}-Kohorte in CFLD_{päd} und CFnoLD_{päd} werden die Korrelationen deutlicher. Bei der leberspezifischen ALT zeigte sich ein stärkerer Zusammenhang mit LCN2 in der CFLD_{päd}-Kohorte ($r = 0,284$) im Vergleich zu der CFnoLD_{päd}-Kohorte ($r = 0,134$).

Die AST und die Anzahl der Thrombozyten zeigten wiederum deutlichere Bezüge zu Lipocalin-2 in der CFnoLD_{päd}-Kohorte ($r(\text{AST}) = 0,367$ und $r(\text{Thr.}) = 0,296$).

Es lagen nur sehr schwache Verbindungen von Lipocalin-2 zu AST sowie zu der Thrombozytenzahl in der CFLD_{päd}-Kohorte vor ($r < 0,1$).

In beiden Kohorten waren nur sehr schwachen Verknüpfungen von Lipocalin-2 zu APRI und FIB-4 zu berechnen ($r < 0,2$).

Die Korrelationskoeffizienten zwischen Lipocalin-2 und den Blutparametern sowie den Quotienten der CF_{erw}-Patienten zeigten sehr schwache Assoziationen ($r(\text{ALT}) = 0,152$; $r(\text{AST}) = 0,057$; $r(\text{APRI}) = |0,163|$; $r(\text{FIB-4}) = |0,243|$).

Schwache bis mittelstarke Zusammenhänge zeigten die Korrelationen von Lipocalin-2 mit der Thrombozytenzahl ($r = 0,36$), mit FIB-4 ($r = |0,243|$) und mit CRP ($r = 0,155$).

Nach Separierung von CFnoLD_{erw} und CFLD_{erw} wurden die Beziehungen von Lipocalin-2 zu den Serumfibrinogenmarkern deutlicher.

Schwache bis mittelstarke Verbindungen konnten in der CFLD_{erw}-Kohorte von Lipocalin-2 und ALT ($r = 0,241$), FIB-4 ($r = |0,259|$), den Thrombozyten ($r = 0,438$) und dem CRP ($r = 0,224$) festgestellt werden. Die weiteren Serumparameter der CFLD_{erw}-Kohorte und auch der CFnoLD_{erw}-Kohorte zeigten sehr schwache Kohärenzen ($r < 0,2$).

4.6.3 Zusammenhang von Lipocalin-2 und den Lungenparametern

Neben den Korrelationen von Lipocalin-2 mit den Blutparametern und den TE-Ergebnissen zeigt die Tabelle 4.4 die Korrelation mit den Lungenparametern FEV1 und VC. Diese Zusammenhänge sind in der Gesamtkohorte stark ($r > 0,4$).

Unter Berücksichtigung der Unterteilung nach Alter (CF_{erw} und CF_{päd}) waren die starken Korrelationen von Lipocalin-2 und FEV1 den CF_{päd}-Patienten zuzuordnen ($r > 0,33$), während die CF_{erw} weniger starke Zusammenhänge aufwiesen ($r = |0,163|$). Die VC wiederum korreliert in beiden Kohorten gut mit LCN2 ($r_{päd} = |0,269|$; $r_{erw} = |0,366|$)

Die CFLD-Patienten erreichten die stärksten Korrelationen von Lipocalin-2 mit den Lungenparametern ($r > 0,3$).

Der Zusammenhang von Lipocalin-2 und der Vitalkapazität in der CFnoLD_{päd}-Kohorte war nur sehr schwach ($r(VC) = |0,0272|$), hingegen in der CFLD_{päd} mit einem starken Zusammenhang ($r(VC) = |0,562|$) zu beobachten.

Die Lungenparameter der erwachsenen Patienten korrelierten schwach bis mittelstark mit Lipocalin-2 ($r(FEV1) = |0,163|$ und $r(VC) = |0,366|$).

Bei den CF_{erw}-Patienten war ein deutlicher Bezug zu der Lungenbeteiligung nur in der CFLD_{erw}-Kohorte zu erkennen ($r(FEV1) = |0,313|$ und $r(VC) = |0,46|$).

Die CFnoLD_{erw}-Kohorte erreichte nur schwache Korrelationen ($r(FEV1) = |0,077|$ und $r(VC) = |0,236|$).

4.7 Separierte Korrelation unter Ausschluss der Lungenbeteiligten

Um einen möglichen Störfaktor aus den Korrelationsrechnungen zu entfernen, müssen die Patienten mit einer eingeschränkten Lungenfunktion von den lungengesunden Patienten separiert werden. Eine Lungenfunktion oberhalb des Grenzwertes (Einsekunden-Kapazität (FEV1) von $\geq 70\%$ und einer Vitalkapazität (VC) von $\geq 80\%$) gilt als lungengesund.

In der Tabelle 4.5 ist die Gesamtkohorte anhand dieses Grenzwertes aufgeteilt in die lungengesunden ($n = 55$ (CF^{+lung})) und die lungenerkrankten Patienten ($n = 31$ (CF^{-lung})).

Tabelle 4.5: Korrelationskoeffizienten nach Spearman von Lipocalin-2 mit Ergebnissen der TE, Labor-, Lungenfunktionsparametern und Alter der einbezogenen CF-Patienten.

Unterteilung in Lungengesunde (FEV1 $\geq 70\%$ und VC $\geq 80\%$) und Lungenbeteiligte (FEV1 $< 70\%$ und VC $< 80\%$)

		<i>TE</i>	<i>APRI</i>	<i>FIB-4</i>	<i>ALT</i>	<i>AST</i>	<i>Thr.</i>	<i>CRP</i>	<i>FEV1</i>	<i>VC</i>	<i>age</i>
Gesamt	r	0,219	0,112	0,345	0,211	0,123	0,014	0,334	0,452	0,414	0,349
<i>n</i> = 86	p	0,043*	0,305	0,001**	0,051	0,259	0,901	0,002*	0,000**	0,000**	0,001**
+lung	r	0,296	0,261	0,301	0,217	0,242	0,124	0,196	0,43	0,307	0,243
<i>n</i> = 55	p	0,028*	0,055	0,026	0,112	0,074	0,368	0,152	0,001**	0,023*	0,074
-lung	r	0,156	0,099	0,057	0,304	0,164	0,126	0,199	0,122	0,241	0,032
<i>n</i> = 31	p	0,403	0,595	0,761	0,096	0,377	0,5	0,284	0,513	0,191	0,864

Abkürzungen: r = Korrelationskoeffizient nach Spearman; p = Signifikanz; +lung = lungengesund; -lung = lungenbeteiligt; TE = Transiente Elastographie; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; Thr. = Thrombozyten; CRP = C-reaktives Protein; FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität; VC = Vitalkapazität; age = Alter; * = signifikant; ** = hochsignifikant

Nach Ausschluss der Störfaktoren (CF^{-lung}) sind in den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 4.6-4.9) nur die 55 CF^{+lung}-Patienten mit einer FEV1 von $\geq 70\%$ und einer VC von $\geq 80\%$ aufgeführt und in einzelne Untergruppen eingeteilt.

Die 55 CF^{+lung}-Patienten zeigten eine mittelstarke Korrelation von Lipocalin-2 zur TE-Messung ($r = 0,296$) sowie zu den Fibrosescores APRI ($r = 0,261$), FIB-4 ($r = 0,301$), ALT ($r = 0,217$) und AST ($r = 0,242$).

Demzufolge war eine Beziehung von Lipocalin-2 zu der Leberbeteiligung auch nach dem Ausschluss der CF-Patienten mit Lungenbeteiligung deutlich.

Der Tabelle 4.6 sind die Korrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen Lipocalin-2 und den weiteren Parametern der $CF_{\text{päd}^{+\text{lung}}}$ -Patienten zu entnehmen.

Bei 23 lungengesunden Kindern konnte keine Leberbeteiligung nachgewiesen werden ($CF_{\text{noLD}_{\text{päd}^{+\text{lung}}}}$). 15 pädiatrische Patienten bildeten die direkte Vergleichsgruppe mit einer diagnostizierten Leberbeteiligung ($CFLD_{\text{päd}^{+\text{lung}}}$).

Die $CF_{\text{noLD}_{\text{päd}^{+\text{lung}}}}$ -Kohorte erreichte eine mittelstarke Korrelation von Lipocalin-2 zu TE ($r = 0,315$) und zu AST ($r = 0,433$). Sie wies eine schwache Korrelation von LCN2 zu den Quotienten APRI ($r = 0,252$) und FIB-4 ($r = |0,12|$) auf.

Die $CFLD_{\text{päd}^{+\text{lung}}}$ -Kohorte erreicht eine unerwartet abgeschwächte Korrelation von Lipocalin-2 zu allen Leberparametern. Eine Ausnahme nahm der Fibrosescore FIB-4 ($r = |0,451|$) ein.

Tabelle 4.6: Pädiatrische Patienten mit einer Lungenfunktion von $FEV1 \geq 70\%$ und $VC \geq 80\%$ (lungengesund ($CF_{\text{päd}^{+\text{lung}}}$)).

Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Spearman von Lipocalin-2 mit Ergebnissen der TE, Alter Labor- und Lungenfunktionsparametern. Unterteilung in zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung (CF_{noLD}) und zystische Fibrose mit Leberbeteiligung ($CFLD$)

$CF_{\text{päd}^{+\text{lung}}}$		TE	APRI	FIB-4	ALT	AST	Thr.	CRP	FEV1	VC	age
CFnoLD	r	0,315	0,252	0,12	0,117	0,433	0,284	0,155	0,419	0,161	0,09
	p	0,143	0,245	0,585	0,595	0,039*	0,189	0,479	0,047*	0,462	0,682
CFLD	r	0,184	0,157	0,451	0,135	0,101	0,049	0,008	0,062	0,292	0,411
	p	0,479	0,547	0,069	0,696	0,7	0,852	0,977	0,815	0,255	0,102

Abkürzungen: r = Korrelationskoeffizient nach Spearman; p = Signifikanz; TE = Transiente Elastographie; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; Thr. = Thrombozyten; CRP = C-reaktives Protein; FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität; VC = Vitalkapazität; age = Alter; * = signifikant

In der Tabelle 4.7 sind die Korrelationsergebnisse der 15 CF_{erw}^{+lung}-Patienten (8 CFnoLD_{erw}^{+lung} und 7 CFLD_{erw}^{+lung}) aufgeführt.

Diese zeigten schwach bis mittelstarke Korrelationen ($r > 0,2$) der CFnoLD_{erw}^{+lung}-Patienten für Lipocalin-2 mit den weiteren getesteten Parametern an. Eine Ausnahme bilden der FIB-4-Score und die AST ($r < 0,2$). Die CFLD_{erw}^{+lung}-Gruppe erzielte ähnlich gute Korrelationen ($r > 0,18$). Wiederum waren schwache Korrelationen von Lipocalin-2 mit APRI, FIB-4 und den Thrombozyten ($r < 0,1$) zu beobachten.

Tabelle 4.7: Erwachsene Patienten mit einer Lungenfunktion von FEV1 \geq 70% und VC \geq 80% (lungengesund)

Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Spearman von Lipocalin-2 mit Ergebnissen der TE, Alter, Labor- und Lungenfunktionsparametern. Unterteilung in zystische Fibrose ohne Leberbeteiligung (CFnoLD) und zystische Fibrose mit Leberbeteiligung (CFLD)

CF _{erw} ^{+lung}		TE	APRI	FIB-4	ALT	AST	Thr.	CRP	FEV1	VC	age
CFnoLD	r	0,252	0,262	0,19	0,238	0,144	0,357	0,429	0,667	0,595	0,048
	p	0,548	0,531	0,651	0,57	0,734	0,385	0,289	0,071	0,12	0,911
CFLD	r	0,286	0,09	0,036	0,571	0,288	0,071	0,18	0,5	0,571	0,179
	p	0,535	0,848	0,939	0,18	0,531	0,879	0,969	0,253	0,18	0,702

Abkürzungen: r = Korrelationskoeffizient nach Spearman; p = Signifikanz; TE = Transiente Elastographie; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; Thr. = Thrombozyten; CRP = C-reaktives Protein; FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität; VC = Vitalkapazität; age = Alter

Zur besseren Bewertung und Interpretation der Korrelationen von Lipocalin-2 und den jeweiligen Parametern sind die demographischen und klinischen Daten der 55 lungengesunden Patienten (CF^{+lung}) in der Tabelle 4.8.a und b übersichtlich dargestellt.

Tabelle 4.8.a: Eigenschaften, Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten mit einer Lungenfunktion von FEV1 \geq 70% und VC \geq 80% (lungengesund).

Mittelwert (Median) \pm Standardabweichung, der Bereich und der Signifikanzwert zwischen den jeweiligen CFnoLD- und CFLD-Kohorten sind dargestellt.

<i>Demographische und klinische Daten</i>	<i>Erwachsene</i>		<i>Kinder</i>	
<i>n/%</i>	15 (27,27%)		40 (72,73%)	
	CFnoLD_{erw}^{+lung}	CFLD_{päd}^{+lung}	CFnoLD_{päd}^{+lung}	CFLD_{päd}^{+lung}
	n = 8	n = 7	n = 23	n = 17
Alter (Jahre)	32,25 (32,5)	29,143 (28)	10,435 (9)	11,941 (12)
	\pm 9,954	\pm 7,033	\pm 4,591	\pm 2,926
<i>Bereich</i>	19-47	18-38	2-18	5-15
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,487		p = 0,259	
Lipocalin-2 (ng/ml)	244,362 (226,57)	170,34 (147,52)	105,87 (85,9)	184,385 (160,73)
	\pm 128,972	\pm 48,674	\pm 110,21	\pm 119,788
<i>Bereich</i>	83,55-475, 67	121,7-242	25,28-510,09	86,98-603,48
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,247		p = 0,0001**	
TE-Lebersteifigkeit (kPa)	4,225 (3,95)	18,957 (10)	4,387 (4,3)	8,929 (6,9)
	\pm 0,91	\pm 25,116	\pm 0,951	\pm 5,899
<i>Bereich</i>	3,3-6,1	4,8-75	2,8-6,2	3,5-24,8
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,003*		p = 0,0001**	
ALT (U/l)	29,75 (29,5)	28,714 (30)	23,435 (22)	33,706 (26)
	\pm 12,635	\pm 10,242	\pm 6,528	\pm 19,156
<i>Bereich</i>	14-50	17-43	10-39	17-85
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,817		p = 0,135	
AST (U/l)	24,875 (23)	24,571 (17)	23, 826 (22)	31,765 (27)
	\pm 7,846	\pm 12,998	\pm 6,4	\pm 14,29
<i>Bereich</i>	13-36	15-50	14-37	19-78
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,602		p = 0,025*	
APRI	0,243 (0,235)	1,762 (0,2)	0,211 (0,18)	0,275 (0,26)
	\pm 0,075	\pm 2,643	\pm 0,159	\pm 0,144
<i>Bereich</i>	0,159-0,38	0,13-7,353	0,11-0,91	0,14-0,73
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,772		p = 0,01*	
FIB-4	0,603 (0,526)	4,029 (0,56)	0,153 (0,16)	0,233 (0,229)
	\pm 0,2867	\pm 6,175	\pm 0,067	\pm 0,098
<i>Bereich</i>	0,345-1,19	0,24-17,044	0,04-0,3	0,08-0,45
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,487		p = 0,007*	

Tabelle 4.8.b: Eigenschaften, Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten mit einer Lungenfunktion von FEV1 \geq 70% und VC \geq 80% (lungengesund).

Mittelwert (Median) \pm Standardabweichung, der Bereich und der Signifikanzwert zwischen den jeweiligen CFnoLD- und CFLD-Kohorten sind dargestellt.

<i>Demographische und klinische Daten</i>	<i>Erwachsene</i>		<i>Kinder</i>	
Thrombozyten (G/l)	263,75 (267) \pm 70,214	145,286 (207) \pm 113,053	330,261 (323) \pm 59,865	300,471 (300) \pm 59,101
<i>Bereich</i>	120-358	17-297	222-464	204-406
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,028*		p = 0,067	
CRP (mg/l)	5,6 (5,65) \pm 4,3	4,114 (1,9) \pm 5,093	1,135 (0,5) \pm 5,88	1,407 (0,5) \pm 2,478
<i>Bereich</i>	0,1-11,1	0,1-13,2	0,1-9,4	0,1-9,5
<i>Signifikanzwert</i>	p = 0,416		p = 0,329	

Abkürzungen: n = Anzahl; SD = Standardabweichung; BMI = Body-Mass-Index; TE = Transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index; CRP = C-reaktives Protein; FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität; VC = Vitalkapazität; * = signifikant;

4.8 Korrelationen der Laborparameter und Messergebnisse zu ihren Grenzwerten

Die Tabelle 4.9 stellt in Anlehnung an die Tabelle 4.8.a und b die Verhältnisse der Laborparameter und der Messergebnisse gegenüber ihren Grenzwerten in Prozent dar. Die Prozentangaben dienen zur besseren Übersicht sowie zur Orientierung und zum Vergleich des Anstiegsverhalten der Laborparameter und Messergebnisse bei CFnoLD und CFLD.

Yoshikawa *et al.* publizierten 2017 einen Lipocalin-2-Grenzwert für eine verbesserte Überlebensrate von \leq 119 ng/ml [279]. Dieser Grenzwert wurde in unserer Arbeit zur Bewertung der Lipocalin-2-Werte berücksichtigt. Als CFLD-Diagnose-Cut-off wurde der TE-Wert von Rath *et al.* übernommen (6,3 kPa) [207]. Die Cut-offs für eine CFLD-Diagnose von APRI und für FIB-4 liegen nach Leung *et al.* bei APRI $>$ 0,462 U/l und FIB-4 $>$ 0,358 U/l [160].

Aus der Tabelle 4.9 besonders hervorzuheben sind die Messergebnisse von Lipocalin-2. Diese Werte sind bei CF-Patienten mit Leberbeteiligung oberhalb des Grenzwertes (Anstieg um 123,97% bei CFLD_{erw}^{+lung} und um 135,07% bei CFLD_{päd}^{+lung}). Aber auch die CFnoLD_{erw}^{+lung}-Kohorte zeigte einen LCN2-Median (226,57 ng/ml) mit einem erhöhten

Wert von 190,39% des Grenzwertes. Der LCN2-Median der CFnoLD_{päd}^{+lung}-Kohorte zeigte als Einziger einen Normwert von 85,9 ng/ml (72,18% des Grenzwertes) an.

Die Messergebnisse der transienten hepatischen Elastographie erreichten nur bei Eintritt der Leberbeteiligung erhöhte Werte von 10 kPa bei CFLD_{erw}^{+lung} und 6,9 kPa bei CFLD_{päd}^{+lung}.

Die Leberparameter (ALT und AST) und der aus ihnen gebildete Fibrosescore APRI zeigten in allen Kohorten normwertige Ergebnisse. FIB-4 war in der CF_{erw}^{+lung}-Kohorte isoliert erhöht nachweisbar (ca. 150% des Grenzwertes).

Tabelle 4.9: Korrelationen der Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten mit einer Lungenfunktion von FEV1 \geq 70% und VC \geq 80% (lungengesund).

Laborparameter sowie Messergebnisse sind als Median und ihre Abweichung in % angegeben. Fett markiert sind Werte, welche einen Anstieg über 100% aufweisen.

<i>Parameter</i>	<i>Grenzwert</i>	<i>CFnoLD_{erw}^{+lung}</i>	<i>CFLD_{erw}^{+lung}</i>	<i>CFnoLD_{päd}^{+lung}</i>	<i>CFLD_{päd}^{+lung}</i>
LCN2 (ng/ml)	119	226,57 (190,39%)	147,52 (123,97%)	85,9 (72,18%)	160,73 (135,07%)
<i>TE (kPa)</i>	6,3	3,95 (62,7%)	10 (158,73%)	4,3 (68,25%)	6,9 (109,52%)
<i>ALT (U/l)</i>	35	29,5 (84,29%)	30 (85,71%)	22 (62,86%)	26 (74,29%)
<i>AST (U/l)</i>	35	23 (65,71%)	17 (48,57%)	22 (62,86%)	27 (77,14%)
<i>APRI</i>	0,462	0,235 (50,87%)	0,2 (43,29%)	0,18 (38,96%)	0,26 (56,28%)
<i>FIB-4</i>	0,358	0,526 (146,93%)	0,56 (156,42%)	0,16 (44,69%)	0,229 (63,97%)

Abkürzungen: LCN2 = Lipocalin-2; TE = Transiente Elastographie; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartate-Aminotransferase; APRI = Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index; FIB-4 = Fibrosis-4 Index

5 Diskussion

Die Leberbeteiligung bei CF (CFLD) ist eine häufige Komplikation der autosomal-rezessiven Erberkrankung zystische Fibrose, welche bereits bei 5-10% der pädiatrischen Patienten in der ersten Lebensdekade auftritt und darüber hinaus als die dritthäufigste Todesursache bei CF verzeichnet ist.

Es besteht eine 4,5%ige Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Leberzirrhose innerhalb eines medianen Zeitraums von fünf Jahren ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung der Leberbeteiligung [50, 142].

Eine frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei CF kann die Prognose bezüglich Lebenszeit und Lebensqualität durch eine sofortige Therapieeinleitung u.a. mit Ursodesoxycholsäure noch vor Symptomeintritt der zumeist jugendlichen Patienten deutlich verbessern [14, 62].

Trotz der aktuellen Möglichkeiten mit neu etablierten, im Vergleich zu dem Goldstandard der Leberbiopsie nicht-invasiven, diagnostischen Serumparametern und bildgebenden Verfahren, weisen diese modernen Screeningmethoden zur Diagnose der Leberbeteiligung bei CF schwerwiegende Limitationen auf. Sie ermöglichen nur eingeschränkte Prognosemöglichkeiten einer zukünftig eintretenden Leberbeteiligung. Daher erscheinen neue diagnostische Tools umso wichtiger [50, 62]. Ein entsprechender Test auf CFLD sollte schnell, einfach und nicht-invasiv sein. Aufgrund der genannten Aspekte überprüft die vorliegende Arbeit, ob der Blutparameter Lipocalin-2 als neuer Indikator für eine CFLD angesehen werden kann.

Das bereits vor einigen Jahren identifizierte Lipocalin-2 wird von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (sog. Fresszellen) gebildet und wirkt als Schutzfaktor, indem es bakterielle Siderophore bindet. Das Apoptose-induzierende Protein Lipocalin-2 hat sich bereits als verlässlicher Marker in der Diagnostik von Nierenerkrankungen erwiesen. Durch seine starke Korrelation mit dem Auftreten hepatischer Schäden wie Steatose, Hepatitis, andere akute und chronische Lebererkrankungen bzw. -versagen erlangte das Lipocalin-2 immer mehr Aufmerksamkeit in der aktuellen Forschung zur Leberdiagnostik bei CF [9].

Die TE bewährt sich als Funktionsdiagnostik bei verschiedenen Erkrankungen u.a. auch in der Unterscheidung zwischen CFnoLD und CFLD sowie bei der Früherkennung der CFLD. Teile dieser Arbeit wurden bereits für die Publikation der frühzeitigen Diagnosestellung der Leberbeteiligung bei CF_{päd} durch den Anstieg der jährlichen

Lebersteifigkeit (gemessen in kPa) verwendet [140–142]. Aufgrund der CFLD-Diagnostik mittels TE wurde diese neben den etablierten Serum-Fibrosescores APRI und FIB-4 sowie den Leberparametern AST und ALT als Vergleich herangezogen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich Lipocalin-2 aufgrund seiner signifikanten Unterscheidungsfähigkeit zwischen CFnoLD und CFLD im pädiatrischen Alter als innovatives, schnelles und nicht-invasives Mittel zu Unterstützung der CLFD-Diagnose bei pädiatrischen Patienten eignet. Die Ergebnisse von Lipocalin-2 weisen eine sehr hohe Messgenauigkeit auf. Es konnte eine Korrelation von Lipocalin-2 mit den Werten der transienten hepatischen Elastographie nachgewiesen werden, welche bereits zur Unterstützung der CFLD-Diagnose eingesetzt wird.

5.1 Vergleich und kritische Hinterfragung der angewandten Methodik und des Patientenkollektivs

5.1.1 Kohortenstärke und ihre Vergleichbarkeit (Ziel- und Kontrollgruppen)

In die vorliegende Studie wurden 86 CF-Patienten einbezogen und anhand ihres Alters sowie anhand einer Leber- und Lungenbeteiligung in Untergruppen unterteilt.

Es liegen vergleichbare Arbeiten vor, die sich ebenfalls mit der Thematik der signifikanten Erhöhung von Lipocalin-2 bei Lebererkrankungen beschäftigten.

2013 konnten Borkham-Kamphorst *et al.* ein Kollektiv von 192 Patienten mit chronischer Lebererkrankung (variable Ätiologie sowie variabler klinischer Schweregrad) untersuchen [19].

Roth *et al.* bezogen sich auf ein Patientenkollektiv von nur 22 Patienten mit dem Selektionskriterium des akuten und chronischen Leberversagens [226].

Ariza *et al.* hingegen untersuchten 716 Patienten mit verifizierter Leberzirrhose [7]. Die genannten Studien bezogen sich demnach auf Kollektive mit bereits etablierter Leberbeteiligung.

Viele Grundlagenstudien stützen sich zum Nachweis der Beziehung von LCN2 zu Lebererkrankungen auf Tierversuche [18, 251].

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals ein CF-Patientenkollektiv, welches zwischen pädiatrischen und erwachsenen sowie zwischen leber- und lungenbeteiligten Patienten

unterscheidet. Unsere Studie basiert daher auf Ergebnissen, welche aus dem Vergleich von Ziel- und Kontrollgruppen hervorgehen.

5.1.2 Limitationen der Screeningmethoden für eine CFLD-Diagnostik

Die Diagnose einer CF-Leberbeteiligung ist die Grundlage der Unterteilung des Patientenkollektivs in die Ziel- und Kontrollgruppen (CFnoLD/CFLD). Die Unterscheidung zwischen beiden Gruppen erfolgte in dieser Arbeit anhand der Debray-Kriterien sowie der per TE gemessenen Lebersteifigkeit (CFLD-Diagnose-Cut-off von $>6,3$ kPa) [62, 207].

Derzeitige Screeningmethoden für eine CFLD umfassen Serummarker und -scores, Sonografie, CT und die kosten- und zeitintensive MRT. Die entscheidenden Limitationen der bislang zur Verfügung stehenden Screeningmethoden zum Nachweis einer Leberbeteiligung bei CF betreffen in erster Linie die geringe Sensitivität und Spezifität der klinischen Untersuchung. Weitere Limitationen der Screeningmethoden sind die Strahlenexposition (z.B. beim CT), hohe Kosten (z.B. beim MRT), eine Invasivität und damit einhergehende Risiken sowie Stichprobenfehler bei dem noch bestehenden Goldstandard, der Leberbiopsie [50, 62, 254].

5.1.2.1 Kosteneffizienz und Diagnosegenauigkeit der transienten hepatischen Elastographie

Die nicht-invasive transiente hepatische Elastographie, welche eine hohe diagnostische Genauigkeit für die Erkennung einer CFLD besitzt, ist noch nicht durch prospektive Multicenter-Studien als klares und leitliniengerechtes CFLD-Diagnostikum anerkannt [142]. Einen großen Anteil an der fehlenden Durchsetzung der transienten Elastographie nimmt trotz ihrer vermehrten Verbreitung wahrscheinlich die eingeschränkte Verfügbarkeit abseits der Spezial-Einrichtungen wie universitärer Kliniken und hepatologischer Zentren ein [132].

In einer Analyse von Thavorn *et al.* wurde die Effizienz des teuren TE-Gerätes der Leberbiopsie gegenübergestellt und eine bis zu 20fache Kosteneinsparung herausgearbeitet. In ihrer Analyse (in der *Calgary Health Region* (Kanada)) bezogen sie sich zum einen auf die Kosteneffizienz der Diagnostik bei 3627 Patienten mit Hepatitis

B oder Hepatitis C, mit nicht-alkoholischer (NAFLD) oder alkoholischer Fettlebererkrankung (AFLD). Neben der Kosteneffizienz wurden auch die diagnostische Richtigkeit herausgearbeitet. Die Kosteneinsparung der TE gegenüber der Leberbiopsie beträgt im Durchschnitt 225,64 CAD pro Patient. Abhängig von der jeweiligen Lebererkrankung (HBV, HCV, NAFLD, AFLD) führte die TE zu einer Kostenreduktion von 993,31 bis zu 2431,59 CAD. Nachteilig für die TE war allerdings die bis zu 23%ige Diagnoseungenauigkeit der Lebererkrankungen [254].

2009 untersuchten Witters *et al.* die TE zur frühen Erkennung der Leberbeteiligung anhand eines Kollektivs von 66 Patienten. Sie zeigten eine signifikant ($p < 0,02^*$) erhöhte Lebersteifigkeit bei Patienten sowohl mit einer klinischen (Mittelwert TE-Messung 11,2 kPa), einer durch Serumparameter (Mittelwert TE-Messung 7,4 kPa) als auch durch Ultraschall festgestellten CFLD (Mittelwert TE-Messung 8,2 kPa) [273].

Breton *et al.* berichteten von 72 pädiatrischen Patienten mit einer potentiellen hepatischen Fibrose. Eingeschlossen in das Studienkonzept wurden 28 Patienten mit einer Virushepatitis, 20 CF-Patienten, 16 Patienten mit einer Cholestase, fünf Patienten mit einer Autoimmunhepatitis und drei Patienten mit einer Leberfibrose unklarer Ätiologie. Es zeigten sich gute Übereinstimmungen der TE-Messung mit den histologischen Befunden. Jedoch konnten nur bei neun Patienten mit einer portalen Hypertension signifikant erhöhte Werte gegenüber denen ohne PHT festgestellt werden (26,5 kPa vs. 6,4 kPa, $p < 0,01^*$) [23].

Friedrich-Rust *et al.* bestätigten die TE als Diagnostikum der Leberbeteiligung bei 106 Patienten mit CF, von denen 17% per TE als CFLD-Patienten diagnostiziert wurden (63%ige diagnostische Genauigkeit). Im Vergleich zogen sie – analog zur vorliegenden Arbeit – die Debray-Kriterien heran, wobei 23% des Kollektivs als CFLD diagnostiziert wurden [62, 92].

Karlas *et al.* veröffentlichten ähnliche Ergebnisse bei 55 erwachsenen Patienten mit CF, welche über ein Follow-up von 22,5 Monaten untersucht wurden. Zu Beginn zeigten die CF-Patienten ohne Leberbeteiligung einen medianen Lebersteifigkeitswert von 3,8 kPa an (nach Follow-up 4,3 kPa). Im Gegensatz dazu wiesen die CF-Patienten mit Leberbeteiligung einen Wert von 5,3 kPa (nach Follow-up 4,9 kPa) auf [130].

2013 etablierte Rath *et al.* aus unserer Arbeitsgruppe anhand von Untergruppen des Kollektivs dieser vorliegenden Arbeit mit 45 CF-Patienten einen Cut-off zur CFLD-Diagnose von 6,3 kPa, welcher eine hohe diagnostische Genauigkeit (AUC 90,6%) besitzt. Die Spezifität zum Nachweis einer Leberbeteiligung betrug 100% [207].

In Anlehnung an diesen Cut-off, konnte 2017 ein 5-Jahres Follow-up mit 36 pädiatrischen und 16 erwachsenen Patienten veröffentlicht werden. Innerhalb dieses Follow-ups entwickelten 9 der 36 pädiatrischen CFnoLD-Patienten nach 4-5 Jahren kontinuierlicher Messung einen Anstieg der Lebersteifigkeit von $\Delta TE > 0.38$ kPa/a, sodass diese am Ende des Untersuchungszeitraums oberhalb des Diagnose-Cut-offs von 6,3 kPa lagen. Der jährliche Steigungswert von $\Delta TE > 0.38$ kPa/a wurde als optimaler Cut-off zur Diagnose der Entwicklung einer zukünftigen Leberbeteiligung angesehen [140–142]. Diese Diagnosemöglichkeit der CFLD-Entwicklung bedingt jedoch eine mehrfache TE Messung über einen Zeitraum von > 1 Jahr.

Die Ergebnisse der TE der vorliegenden Studie zeigten Unterschiede zwischen CFnoLD und CFLD. Diese Unterscheidungsmöglichkeit der TE stimmt mit der angegebenen aktuellen Literatur bezüglich der CFLD-Diagnosestärke überein.

Der CFLD-Diagnose-Cut-off von 6,3 kPa (etabliert von Rath *et al.*) wurde auch in dieser Arbeit angewandt und seine diagnostische Aussagekraft zur Beurteilung der Leber bestätigt [207].

Die Messgenauigkeit der TE, ermittelt anhand einer ROC-Analyse, stellte sich mit einer Fläche unter der Kurve (AUC) von 79,4% bei den pädiatrischen Patienten als hervorragend dar. Der AUC-Wert der CF_{erw}-Patienten erreichte einen Wert von 86,1%. Diese genannten AUC-Werte weisen eine höhere Messgenauigkeit als die publizierten Ergebnisse z.B. von Sadler *et al.* (2015) auf. Die Arbeitsgruppe um Sadler berechnete anhand eines Kollektivs von 127 erwachsenen Patienten signifikante Unterschiede ($p = 0,0001^{**}$) in der TE-Messung zwischen CF-Patienten ohne (Median 3,9 kPa) und CF-Patienten mit einer Leberbeteiligung (Median 6,4 kPa) mit einer AUC von 78% [229]. Aufgrund der sehr guten Ergebnisse und der Vergleichbarkeit zur angeführten Literatur bot sich die TE als Goldstandard der CFLD Diagnostik zum Vergleich der Ergebnisse u.a. des zu untersuchenden Proteins Lipocalin-2 an.

5.1.2.2 Beurteilbarkeit der Leberbeteiligung mittels etablierter Laborparameter

Weitere gut etablierte Messungen zur Beurteilung der Leberschäden sind die indirekten Fibrosetests wie der APRI- und FIB-4-Score, die Transaminasen AST und ALT sowie die Bestimmung der Thrombozytenzahl. Auch direkte Fibrosetests gelten als gute Marker für einen fibrotischen Leberschaden.

a) Aussagekraft der Thrombozytenzahl

Die Thrombozytenbestimmung ist ein Bestandteil des APRI- und FIB-4-Scores. Eine Thrombozytopenie ist mit der Progredienz der Leberfibrose bzw. -zirrhose und dem dadurch zunehmenden Portaldruck vergesellschaftet. Dies ist auf die verminderte Thrombopoetinsynthese der Hepatozyten und auf den erhöhten Abbau der Thrombozyten in der Milz (splenomegales Pooling) zurückzuführen [234, 245]. Sowohl bei den erwachsenen als auch bei den pädiatrischen Patienten war eine Abnahme der Thrombozytenzahl in der CFLD-Patientenkohorte gegenüber den CFnoLD-Patienten zu beobachten (Tabelle 4.1.a und b).

2005 veröffentlichten Lackner *et al.*, dass eine Thrombozytenzahl von ≥ 150 G/L eine Leberzirrhose in knapp 80% ausschließt. Es ist allerdings anzumerken, dass neben der Leberbeteiligung viele weitere mögliche Erkrankungen zu einer Thrombozytopenie führen können. Zu diesen zählen z.B. Störungen der Produktion durch Medikamente, Malignome oder ein erhöhter peripherer Umsatz bei z.B. Sepsis oder Autoimmunerkrankungen [37, 151]. Die Thrombozytenzahl besitzt folglich eine zu geringe Spezifität und damit eine ungenügende Aussagekraft in Bezug auf eine CFLD.

b) Aussagekraft der Fibrosemarker und -scores

Der De-Ritis-Quotient (Aspartat-Aminotransferase (AST)/Alanin-Aminotransferase (ALT)-Ratio (AAR)) findet seine Verwendung in der Leberbeurteilung bei chronisch viraler Hepatitis oder NASH/ASH.

In der Studie von Lackner *et al.* 2005 wurde für diesen eine Messgenauigkeit für die Vorhersage der Fibrose bei HCV von 57-73% berechnet. Im Kontrast dazu ließ sich eine AUC für den APRI-Score von 80-90% berechnen [20, 151].

Aufgrund dieser Überlegenheit wurde in der vorliegenden Dissertation nur der APRI-Score als Vergleichsparameter herangezogen.

2015 bestätigten Leung *et al.* die gute Vorhersagekraft der Leberbeteiligung bei CF anhand des APRI-Scores. Sie publizierten die erste Leberbiopsie validierte, retrospektive Studie, in der sie 67 CFLD-Kinder mit der Kontrollgruppe (104 im Alter und Geschlecht übereinstimmender Kinder ohne CFLD) verglichen. Wie bei der vorliegenden Studie nutzten Leung *et al.* zur initialen CFLD-Diagnose die Debray-Kriterien [62].

Der APRI-Wert zeigte eine komplette Übereinstimmung mit dem histologischen Staging in 37% der Fälle. In beiden Messungen erreichten 73% der Fälle den gleichen Fibrosegrad. Ein 75%iger AUC-Wert des APRI-Scores konnte für die Vorhersage der Leberbeteiligung ermittelt werden. In fortgeschrittenen Fibrosefällen (METAVIR F3-F4) lag der AUC-Wert bei 81% [160].

In der vorliegenden Arbeit erreichte die Messgenauigkeit für APRI bei den pädiatrischen Patienten einen vergleichbaren AUC-Wert von 73,8%. APRI zeigte also auch in unserer Studie einen guten und genauen diagnostischen Vorhersagewert, war aber dennoch dem TE-AUC-Wert (79,4%) unterlegen.

Die Fibrosescores APRI und FIB-4 umfassen in ihrer Berechnung Parameter aus der Routinelaboruntersuchung (AST, ALT, Thrombozytenzahl und das Alter). Im Unterschied zur TE-Messung oder auch der Lipocalin-2-Bestimmung sind keine weiteren Messungen erforderlich [118].

In der Studie von Leung *et al.* erreichte FIB-4 eine Messgenauigkeit zur Diagnose der Leberbeteiligung von nur 60%. Sie beschrieben eine stärkere Korrelation zwischen FIB-4 und der portalen Hypertension (PHT) von 90%. Aus diesem Grund ist der FIB-4-Score als nicht-invasiver PHT-Marker geeigneter. Leung *et al.* erklären ihre Ergebnisse aufgrund der berücksichtigten Zeitkomponente (Alter in Jahren), welche bei der Formel mit einbezogen wird und für die Entwicklung der PHT eine entscheidende Rolle spielen kann [160].

Aufgrund der Übereinstimmung einiger Variablen der Fibrosescores, zeigte neben dem APRI-Score auch der FIB-4-Score Wechselbeziehungen zu der CFLD-Diagnose. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchung erreicht FIB-4 eine Messgenauigkeit von 77,2% bei Kindern und von 67,1% bei Erwachsenen. Daher wurde FIB-4 auch als Vergleich zu Lipocalin-2 herangezogen.

Die Transaminasen (AST und ALT) sind Bestandteile beider Fibrosescores, welche sich aufgrund ihrer Beziehung zur Leber als Vergleich zu Lipocalin-2 eignen.

Die ALT zeigt im Gegensatz zur AST die höchste Aktivität innerhalb der Hepatozyten und ist leberspezifisch.

Die AST ist sowohl in den Hepatozyten als auch in den Herz- und Muskelzellen zu finden. In den Hepatozyten ist die AST zu 20% zytoplasmatisch und zu 80% mitochondrial verortet. Aus diesem Grund steigt bei einem Leberzellschaden die leberspezifische ALT und auch die AST deutlich an [192, 195, 245]. Demnach bedeutet ein Konzentrationsanstieg der Transaminasen einen hepatozytären Zellschaden, welcher durch eine frühere Diagnostik der Leberbeteiligung bei CFLD verhindert werden könnte und sollte.

Die AST, ALT aber auch die aus ihnen gebildeten Scores FIB-4 und APRI sind also wichtige Vergleichsmarker. Die jeweilige Aussagekraft als Frühparameter ist jedoch aufgrund des genannten Anstiegs erst nach manifestem Zellschaden gering.

Weitere indirekte Fibrosetests wie der FibroTest[®] und der Forns Index sind vorwiegend zur Diagnose einer Leberzirrhose (meist im Kontext zur chronischen Hepatitis C) geeignet. Sie boten sich dementsprechend nicht als Vergleichsparameter für die Validierung von Lipocalin-2 beim Eintritt der Leberbeteiligung bei CF an [30, 89, 106, 182, 239].

2017 veröffentlichten Harris *et al.* einen Review über den Vergleich von nicht-invasiven Biomarkern zu Diagnose und generellen Beurteilungen der Leberbeteiligung bei Risikopatienten. Sie führten an, dass nur die TE und der FibroTest[®] mit dem histologischen Bild übereinstimmen und verglichen werden könnten [108].

c) Aussagekraft der direkten Fibrosetests

Die direkten Fibrosetests Hyaluronsäure, das N-terminale Prokollagen-III-Peptid, verschiedene Metalloproteasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) gelten als gute Marker für einen fibrotischen Leberschaden, da sie aufgrund des Auf- und Abbaus bei Leberbeteiligung vermehrt im Serum anfallen. Wegen ihrer teilweise geringen Sensitivität und Spezifität für die Diagnose der Leberbeteiligung bei CF sowie der partiell eingeschränkten Eignung bei differenzierteren Krankheitsbildern (Hepatitis B, C, Zirrhose etc.) sind unbedingt bessere Marker zu finden [100, 208]. Zudem werden sie nicht wie AST und ALT als Routineparameter im Standardlabor schnell und kostengünstig bestimmt.

In Anbetracht der genannten Kriterien eigneten sich die direkten Fibrosetests aufgrund ihrer zu geringen Aussagekraft nicht zum Vergleich mit Lipocalin-2 [245].

5.1.2.3 Beurteilbarkeit der Leberbeteiligung mittels der Bestimmung von Lipocalin-2-mRNA und Lipocalin-2-Induktoren/-Regulatoren

Vorangegangene Studien haben neben der Lipocalin-2-Messung auch die LCN2-mRNA-Bestimmung zur besseren Beobachtung und Bewertung der LCN2-Produktion genutzt [251]. Die mRNA-Bestimmung ist heutzutage in fast jedem molekularbiologischen Labor möglich. Neben der optimalen mRNA-Extraktion verbunden mit ihrer Qualitätskontrolle, ist eine RT-PCR-Methode zur quantitativen Bestimmung der mRNA sowie eine sinnvolle Quantifizierungsstrategie Voraussetzung für eine genaue mRNA-Bestimmung. Die Bestimmung ist folglich mit einem gewissen Aufwand, Kosten, Komplexität sowie umfassenden Kenntnissen der technischen Aspekte verbunden [90, 199].

Angesichts der genannten Faktoren eignet sich die aufwändigere und fehleranfällige Bestimmung der mRNA nicht für eine routinemäßige Untersuchung der CF-Patienten.

Zur weiteren Bewertung der Lipocalin-2-Produktion und Sekretion bietet sich die Bestimmung der Lipocalin-2-Induktoren/-Regulatoren an. Beobachtet wurden Zusammenhänge der Lipocalin-2-Produktion mit entzündlichen Zytokinen und Chemokinen wie IL-1 β , -6, -10, -17, TNF- α , TGF- α , NF κ B und MCP-1 etc. Diese werden im Wesentlichen als Regulatoren/Aktivatoren für die Lipocalin-2 verstanden, sind aber auch integraler Bestandteil des spezifischen und unspezifischen Immunsystems. Sie sind bei zahlreichen Immunantworten zur Bekämpfung von Pathogenen oder chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen wie z. B. Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa vorhanden. Aufgrund des breitgefächerten Auftretens der Zytokine und Chemokine sind diese als unspezifisch zu bewerten und für eine CFLD-Diagnose ungeeignet. [9, 18, 84, 251].

In Folge der erwähnten Vor- und Nachteile unterschiedlicher Fibrosemarker, bezog sich die vorliegende Arbeit für den Vergleich der diagnostischen Stärke von Lipocalin-2 auf die TE, APRI, FIB-4, ALT, AST und die Thrombozytenzahl.

5.2 Lipocalin-2 als Biomarker zur Früherkennung der Leberbeteiligung in der Akute-Phase-Reaktion

Die vorliegende Arbeit umfasst ein Patientenkollektiv von insgesamt 86 CF-Patienten mit 48 (55,8%) Kindern (21 CFLD_{päd} und 27 CFnoLD_{päd}) sowie 38 (44,2%) Erwachsenen (20 CFLD_{erw} und 18 CFnoLD_{erw}), welche einem Vergleich von Blutserumparametern, Ergebnissen der TE und Werten der Lungenfunktionstests unterzogen wurden.

Die Werte der Lipocalin-2-Messungen ergaben einen signifikanten Unterschied ($p = 0,005^*$) zwischen CFLD (169,52 ng/ml) und CFnoLD (118,88 ng/ml).

Diese Unterscheidungsfähigkeit zwischen gesunder und pathologischer Leber durch Lipocalin-2 wurde bereits bei Borkham *et al.* und Sultan *et al.* in Tier- und auch in Humanexperimenten festgestellt und durch die vorliegende Arbeit bei CF Patienten bestätigt bzw. ausgebaut.

2011 stellten Borkham *et al.* eine signifikante, schnelle und anhaltende Expression und Sekretion von Lipocalin-2 in Sternzellen bei Sprague Dawley®-Ratten mit deutlichem Anstieg fest. Hierzu wurden Versuchsmodelle mit akuten und mit chronischen Leberschäden verwendet. Durch eine passagere (akut) und durch eine vollständige (chronisch) Gallengang-Ligatur oder eine Terpentin-Injektion von 1 ml/kg intraperitoneal wurden diese Leberschäden induziert. Die so künstlich erzeugte Fibrogenese zeigte in beiden Versuchsmodellen (akut und chronisch) eine deutliche Korrelation zu den Lipocalin-2-Serumwerten. In der Vergleichsgruppe (gesunde Leber) wurden nur marginale Lipocalin-2-Konzentrationen gemessen. Allerdings stellten die Autoren auch eine erniedrigte LCN2-Expression in Myelofibroblasten im Rahmen des Umbauvorgangs der Leberfibrose fest. Dies deutet darauf hin, dass LCN2 bei der Initiierung, nicht aber bei der Aufrechterhaltung der Fibrogenese erhöht vorliegt. Die LCN2-Messung dient daher zur Feststellung und zur Verlaufsbeobachtung akuter Leberschäden, nicht aber zur Beurteilung eines Fibrosegrades bzw. der Fibrose im fortgeschrittenen/chronischen Stadium [18].

Sultan *et al.* konnten 2012 in einer ähnlichen Fallstudie mit Mäusen und Ratten nach einer Terpentin-Injektion von 5 ml/kg i.m. eine 200fache ($20,45 \pm 6,54$ ng/ml) Serum-LCN2-Konzentration der Ursprungskonzentration ($<0,1$ ng/ml) sowie eine LCN2-Gen-Expression-Steigerung nach 36 Stunden auf ein 8738,2faches ($\pm 2103,7$) feststellen.

Im Gegensatz dazu sind die Steigerungen der LCN2-Gen-Expression von Niere, Herz, Gehirn, Milz und Lunge kaum zu beobachten (Anstieg um $<6,38$ fach $\pm 2,28$). Parallel zu

den erhöhten Gen-Expressionen in der Leber zeigten die Akut-Phase-Proteine wie alpha-2-Makroglobulin (alpha2m), Hämoxygenase (Ho-1) und Serum Amyloid A (SAA) kaum Erhöhungen (1-47fach). Demnach ist stark zu vermuten, dass die Leber die Hauptquelle für die Serum-LCN2 ist. Die Serum-LCN2 Expression scheint noch sensibler auf Organschäden zu reagieren als andere etablierte Proteine der Akut-Phase-Reaktion (APR) [251].

In Anlehnung an ihre Studie von 2011 untersuchten Borkham-Kamphorst *et al.* erneut 2013 bei toxinbelasteten Mäusen, ob LCN2 einen hepatoprotektiven Einfluss besitzt. Die hepatische Auswirkung der Toxine (CCl₄, Concanavalin A und Lipopolysaccharide) bzw. der mechanischen Schädigung (Gallengangsligatur, BDL = *bile duct ligation*) auf eine Wildtyp-Kohorte verglichen sie mit der Auswirkung der gleichen Toxine und Schädigungen auf eine LCN2-Defizit-Kohorte. Im Vergleich zum Wildtyp mit normaler LCN2-Expression, zeigte die LCN2-Defizit-Kohorte schwerere Leberschäden bei akuten Einzeldosen der Toxine. Diese Leberschäden konnten durch erhöhte Aminotransferasen und Erhöhungen von Entzündungsmediatoren, bzw. einen höheren Fibrosegrad bei chronischer Belastung festgestellt werden. Hingegen konnte man bei Mäusen, welche durch die BDL eine langsam progrediente Cholestase entwickelten, keinen Unterschied in den Aminotransferasen und Entzündungsmediatoren zwischen dem Wild- und dem LCN2-Defizit-Typ nachweisen. Die BDL-Mäuse zeigten insgesamt geringere Entzündungsreaktionen im Vergleich zu den chemischen Toxinen. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass eine akut eintretende Entzündung durch kurzfristige Belastung zu einer schnellen LCN2-Expression führt. Den Ergebnissen und Beobachtungen von Borkham-Kamphorst *et al.* zur Folge besitzt Lipocalin-2 eine hepatoprotektive Wirkung [19].

In derselben Studie zeigten Borkham-Kamphorst *et al.* bei 192 Patienten mit chronischer Leberbeteiligung jeglicher Ätiologie einen, im Gegensatz zu der Kontrollgruppe von 91 gesunden Patienten, signifikant höheren LCN2-Wert (67,45 ng/ml vs. 57,9 ng/ml; $p = 0,0127^*$). Die Beurteilung des Nutzwerts zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Stadien chronischer Lebererkrankungen ergab keine signifikant variierenden LCN2-Spiegel bei Patienten ohne Leberzirrhose gegenüber Patienten mit Leberzirrhose. Dies weist folglich daraufhin, dass die Höhe des LCN2-Werts nicht die einzelnen Fibroestadien widerspiegelt und sich demnach nicht für eine Stadieneinteilung eignet.

Es liegen jedoch positive Korrelationen von LCN2 mit Entzündungswerten und Akut-Phase-Proteinen (z.B. CRP, Ferritin, Zytokine wie TNF- α und IL-6) als deutliche Hinweise für einen Zusammenhang von LCN2-Erhöhungen bei Entzündungen vor, die rezidivierend bei chronischen Lebererkrankungen auftreten.

Laut Borkham-Kamphorst *et al.* konnte allerdings keine Korrelation von LCN2 mit AST oder ALT beobachtet werden, was die Theorie stützt, dass LCN2 eine Akut-Phase-Reaktion anzeigt und keinen Verlaufsparemeter für Fibrosen und Stadieneinteilung darstellt [19].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der angeführten Literatur ein guter und signifikanter Zusammenhang von LCN2 zu akuten Leberschäden beschrieben wird. Weiterhin besitzt LCN2 eine akute hepatoprotektive Wirkung, was die Theorie von LCN2 als Protein der APR bestärkt.

Diese Beobachtungen lassen sich auf die vorliegende Studie übertragen und die Ergebnisse entsprechend interpretieren. Auch hier kann durch die Lipocalin-2-Messergebnisse zwischen CFnoLD und CFLD signifikant unterschieden werden ($p = 0,005^*$).

Aufgeteilt in pädiatrische und erwachsene Patienten (Cut-off ≥ 18 Jahre), wurde deutlich, dass Lipocalin-2 zwischen CFnoLD und CFLD nur im Alter von < 18 Jahren ($p < 0,0001^{**}$) Unterschiede aufweist (CFnoLD_{päd}-Median 84,81 ng/ml vs. CFLD_{päd}-Median 169,83 ng/ml).

Die Werte der erwachsenen Patienten erreichten hingegen keine Signifikanz und sind somit für die weiteren Untersuchungen nicht aussagekräftig (CFnoLD_{erw}-Median 226,57 vs. CFLD_{erw}-Median 168,84; $p = 0,242$).

Eine Erklärung für die nicht eindeutigen Ergebnisse bzw. den Abfall der LCN2-Werte bei erwachsenen Patienten, lieferte bereits 1996 Garay-Rojas *et al.*: bei der Untersuchung der LCN2-Konzentration anhand einer Northern Blot-Analyse der mRNA in Mäusen im Altersverlauf, konnte eine Abnahme von LCN2 mit steigendem Alter und damit verbundener Altersatrophie der Zellen, besonders in der Leber und Niere, festgestellt werden [93].

Eine Erhöhung von LCN2 kann aber auch bei vielen pathologischen Organkonditionen wie Nierenfunktionsstörung, Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems, Hirnverletzungen, Kardiomyopathien, Lungenentzündungen sowie verschiedene Tumore vorliegen [9].

Je älter der Körper, desto geringer die generelle LCN2-Produktion, aber auch desto höher die Wahrscheinlichkeit pathologischer Organzustände (auch symptomlos). Diese zwei Aspekte können sich gegenseitig beeinflussen und im weitesten Sinne aufheben, sodass es zu einem unklaren Ergebnis kommt, welches als Störfaktor der Diagnose der Leberbeteiligung zu zählen ist. Auch in unserer Studie können die gemachten Überlegungen als eine Erklärung der inhomogenen LCN2-Ergebnisse bei CF_{erw} herangezogen werden.

Die Theorie der LCN2-Expressionserhöhung bei akuten und auch chronischen Pathologien der Leber bestätigten Sultan *et al.*, Borkham-Kamphorst *et al.* sowie Roth *et al.* Roth *et al.* konnten 8 Patienten mit ACLF (akut-auf-chronisches Leberversagen) und ALF (akutes Leberversagen) mit 14 Patienten mit stabilem chronischen Leberversagen (CHF) vergleichen und signifikant voneinander abgrenzen ($p < 0,05^*$). Sie beschrieben eine Hochregulierung der Lipocalin-2-Expression in den Epithelzellen und Hepatozyten bei Stressreaktionen der Leber. Diese Überexpression von LCN2 kann die Zellen vor oxidativem Stress schützen und wirkt somit hepatoprotektiv [1, 226].

Asimakopoulou *et al.* bezeichneten das Lipocalin-2 als „*help-me*“-Signal bei akuten Organschäden und beschrieben es als verlässlichen Biomarker für eine Hepatitis. Weiterhin diente das Lipocalin-2 als ein Parameter für überschießende Entzündungsreaktionen der Leber [8]. Die Genese der Leberbeteiligung/Fibrose bei CF ist ein schleichender und andauernder Prozess. Bei pädiatrischen Patienten ist ihre Entwicklung jedoch ein schnelles ggf. akut eintretendes Geschehen.

Die Hypothese, dass sich Lipocalin-2 als frühzeitiger Biomarker zur Indikation der Leberbeteiligung eignet, ist aufgrund der angeführten Literatur und den vorgestellten eindeutigen Ergebnissen der vorliegenden ELISA-Messungen für Lipocalin-2 berechtigt. Zur weiteren Beurteilung des Nutzwerts von Lipocalin-2 als Diagnostikum der CFLD, sind etablierte Biomarker als Vergleich heranzuziehen.

5.3 Einfluss der Lungenbeteiligung auf Lipocalin-2

Im Zuge der weiteren Unterscheidung zwischen CFnoLD und CFLD der jeweiligen Altersgruppen waren neben schwachen bis mittelstarken Korrelationen von LCN2 zu den Leberparametern teilweise starke Korrelationen zu den Lungenparametern FEV1 und VC zu beobachten.

Es ist bekannt und auch in dieser Arbeit berücksichtigt, dass Lipocalin-2 in vielen weiteren Organen in kritischen Situationen als Stressfaktor freigesetzt wird [9]. Neben Nierenschäden, ZNS-Störungen und Kardiomyopathien ist LCN2 in den vaskulären Endothelzellen und infiltrierenden Neutrophilen des Lungenepithels vertreten. Bei akuter bakterieller Infektion von Asthma-, Lungenemphysem- oder COPD-Patienten aber auch bei akutem Lungenversagen oder idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) ist LCN2 in erhöhter Konzentration im Serum nachzuweisen [119, 276, 277].

Kalousek *et al.* beschrieben 2006 Lipocalin-2 als sensitiven Marker für eine renale Ischämie sowie bei Patienten mit CF als einen Marker für pulmonale Exazerbation [127]. Auf die pulmonale Exazerbation waren Eichler *et al.* 1999 durch ihre Studie mit 42 CF- und 25 Kontrollpatienten im medianen Alter von ca. 14 Jahren näher eingegangen. Die CF-Kohorte wurde anhand der Lungenfunktionsmessungen mit einer Trenngröße von FEV1 70% in die lungengesunde Kontrollgruppe (FEV1 \geq 70%) und in Patienten mit einer pulmonalen Exazerbation (FEV1 <70%) unterteilt. Zudem wurde unterschieden zwischen Patienten mit und ohne Infektion von *Pseudomonas aeruginosa* und mit und ohne Kombination von *Staphylococcus aureus* und/oder *Haemophilus influenzae*.

Der mediane LCN2-Wert von 200,5 ng/ml war bei den CF-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe (Lipocalin-2-Median 57,7 ng/ml) signifikant erhöht ($p < 0,0001^{**}$). Eine weitere signifikante Erhöhung von Lipocalin-2 auf 321 ng/ml zeigten die CF-Patienten mit einer akuten pulmonalen Exazerbation (FEV1 <70%) [75].

Bei 58 COPD-Patienten konnten Wang *et al.* 2014 starke Zusammenhänge von Lipocalin-2 mit COPD-Tests (COPD Assessment Tests (CAT) mit $r = |0,534|$ und modifizierten Medical British Research Council (mMRC) mit $r = |0,301|$) nachweisen. 29 Patienten dienten als Kontrollgruppe. Eine Lungenbeteiligung war offensichtlich ein Störfaktor der Lipocalin-2 Messung bei CF, weswegen nur Lungengesunde in die Zielgruppe aufgenommen wurden [263].

Auch Guglani *et al.* und Kangelaris *et al.* zeigten in ihren Studien, dass ein deutlicher Anstieg von Lipocalin-2 bei weiteren Formen der pulmonalen Beteiligung wie ARDS mit

Sepsis (Acute respiratory distress syndrome) oder bei einer pulmonalen Infektion von *Mycobakterium tuberculosis* nachzuweisen war. [103, 129].

2009 veröffentlichten Flume *et al.* Leitlinien für die pulmonale zystische Fibrose mit dem Ziel die Lebensqualität und -zeit der betroffenen Patienten zu verbessern und zu verlängern. Diese Arbeitsgruppe teilte die CF-Lungenerkrankung in Abhängigkeit von FEV1 in Stadien ein, bei denen FEV1 <70% moderat und <40% schwer beeinträchtigt waren [88]. Auch Rath *et al.* sowie Ranu *et al.* verwandten zur Unterteilung ihrer Kohorten die genannten Grenzwerte der Lungenfunktionsdiagnostik [206, 207].

Aufgrund der angeführten Studien wurden auch unserer Zielgruppen nach den Lungenfunktions-Kriterien eingeteilt. Lungengesund wurde definiert als FEV1 \geq 70% und VC \geq 80%.

5.4 Diagnostische Bedeutung von Lipocalin-2

Die 55 lungengesunden CF-Patienten zeigten lediglich eine schwache bis mittelstarke ($r > 0,2$) Korrelation von Lipocalin-2 mit TE sowie mit den Leberparametern APRI, FIB-4, ALT und AST. Daraus wird deutlich, dass die beschriebenen guten Korrelationen von Lipocalin-2 zu den Leberparametern in der gesamten Kohorte nicht ausschließlich auf die Beeinflussung und Verfälschung der begleiteten Lungenbeteiligung zurückzuführen sind, sondern ein Bezug von Lipocalin-2 zur Lebererkrankung vorliegt (Tabelle 4.5).

Ariza *et al.* belegten bei 716 Patienten, dass sich LCN2 als ein prognostischer Marker für eine Leberzirrhose (ein chronisches Geschehen) aber auch für das ACLF (ein akutes Geschehen bei chronischem Leberversagen) eignet [206, 207].

Die veröffentlichten Studien über Lipocalin-2 differenzierten nicht – wie in der vorliegenden Studie – zwischen lungengesunden und lungenkranken Patienten.

Unter den 55 Patienten der vorliegenden Studie mit einer guten Lungenfunktion (FEV1 \geq 70% und VC \geq 80%) bildeten die pädiatrischen Patienten die Zielgruppe, da Lipocalin-2 nur in dieser Patientenkohorte initial zwischen CFLD_{päd} und CFnoLD_{päd} hochsignifikant unterschied.

5.5 Bedeutung von Lipocalin-2 als diagnostischer Marker in der Zielgruppe $CF_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$

Nach Ausgliederung der pädiatrischen Patienten mit Lungenbeteiligung ($CF_{\text{päd}}^{-\text{lung}}$) konnte die Bedeutung von Lipocalin-2 mit Fokus auf die Leberkondition (ohne den Störfaktor Lunge) der Zielgruppe $CF_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$ analysiert und diskutiert werden.

Das im Median um 3 Jahre erhöhte Alter der $CFLD_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$ -Patienten gegenüber den $CF_{\text{noLD}_{\text{päd}}^{+\text{lung}}}$ -Patienten korreliert mittelstark mit dem fast doppelt erhöhten Medianwerten der LCN2-Messung bei $CFLD_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$. Dies weist auf eine Progredienz des pathologischen Zustands der Leber (also die $CFLD$) mit zunehmendem Alter und auf den LCN2-Anstieg bei Vorliegen einer $CFLD$ hin.

Die Notwendigkeit einer möglichst frühen $CFLD$ -Diagnostik besonders in jungem Alter wird damit erneut unterstreichen.

Infolge dieser Verschlechterung der Leberkondition war eine bessere Korrelation zwischen den erhöhten Lipocalin-2-Werten und den Vergleichsparametern bei der direkten Vergleichsgruppe $CFLD_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$ zu erwarten. Allerdings war nur eine abgeschwächte Korrelation ($r < 0,2$) der gesamten Leberparameter der $CFLD_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$ zu beobachten. Eine Ausnahme stellte der FIB-4-Score ($r = |0,451|$) dar.

Diese Ergebnisse konnten nicht mit Literaturdaten oder den bisherigen Studien verglichen werden. Eine Erklärung für die fehlenden Vergleichsstudien ist, dass bislang offensichtlich keine CF -Studie bei pädiatrischen Patienten unter Ausschluss der Lungenbeteiligten die Lipocalin-2-Messung mit der Leberbeteiligung in Beziehung setzte. Die Gruppe der lungengesunden CF -Patienten mit Leberbeteiligung ist darüber hinaus sehr klein.

Die schlechten Korrelationen von Lipocalin-2 und den Leberparametern sind allerdings hinweisend auf unterschiedliche Ausprägungsstärken der $CFLD$. LCN2 weist in Relation größere Anstiege auf und damit eine schwächere Korrelation zu den nur leicht ansteigenden, etablierten Leberparametern und Messverfahren (wie TE, APRI, FIB-4, ALT, AST).

In Anlehnung an die Studie von Chakraborty *et al.* und deren etablierten Normwert von 72 ng/ml befand sich der Lipocalin-2-Medianwert der $CF_{\text{noLD}_{\text{päd}}^{+\text{lung}}}$ -Kohorte im Normalbereich. Auch ist dieser unterhalb des Grenzwerts für eine von Yoshikawa *et al.* veröffentlichte verbesserte Überlebensrate bei einem Lipocalin-2-Wert von ≤ 119 ng/ml [35, 279].

In dieser CFnoLD_{päd}^{+lung}-Gruppe befanden sich alle Leberparameter und die TE-Messungen ebenfalls im Normbereich (siehe Tabelle 4.8.a und b und 4.9) und zeigten folglich teilweise mittelstarke Korrelationen zueinander.

Die der Tabelle 4.8.a, b und 4.9 zu entnehmenden Ergebnisse der 17 CFLD_{päd}^{+lung}-Patienten verbunden mit ihren unerwartet schwachen Korrelationen zwischen Lipocalin-2 und den Leberparametern und der TE, könnten wie folgt erklärt werden: Lipocalin-2 erreichte in dieser Kohorte einen deutlichen Anstieg, welcher weit oberhalb des Grenzwertes von Chakraborty *et al.* und auch von Yoshikawa *et al.* lag. Exemplarisch wies die TE erhöhte Werte auf, welche jedoch nur knapp oberhalb des Grenzwertes von 6,3 kPa (Rath *et al.*) lagen. Die Diskrepanz zu den Grenzwerten von Yoshikawa *et al.* (35,07% über dem Grenzwert) und von Rath *et al.* (9,52% über dem Grenzwert) könnte die Begründung der schwachen Korrelation von Lipocalin-2 und TE sein. Demnach erreichte Lipocalin-2 in der CFLD_{päd}^{+lung}-Kohorte bereits höhere Werte noch bevor die durch TE gemessene Lebersteifigkeit zunahm.

Im direkten Vergleich zu der CFLD_{päd}^{+lung}-Kohorte, wies die CFLD_{erw}^{+lung}-Kohorte in beiden Werten (TE und Lipocalin-2) deutliche Erhöhungen auf, weswegen die stärkere Korrelation zwischen Lipocalin-2 und der TE-Messung der CFLD_{erw}^{+lung}-Kohorte gegenüber der CFLD_{päd}^{+lung}-Kohorte nachvollziehbar ist.

Die AUC-Berechnungen der pädiatrischen Patienten von den Vergleichsparametern APRI, FIB-4, AST und ALT ergaben trotz ihrer hohen und signifikanten diagnostischen Genauigkeit niedrigere AUC-Werte als von der TE und dem Lipocalin-2-Protein. Ähnliche AUC-Ergebnisse von den Vergleichsparametern und der TE sind in der aktuellen Literatur zu finden. Die TE und das Lipocalin-2 sind demnach den etablierten Verfahren bei der CFLD-Diagnose überlegen [160, 163].

Nach Leung *et al.* lagen die Medianwerte der Fibrosescores (APRI und für FIB-4) der CFnoLD_{päd}^{+lung}-Kohorte weit unterhalb der Cut-offs für eine CFLD-Diagnose [160]. Die Fibrosescores wurden mit den normwertig gemessenen AST, ALT und Thrombozyten berechnet. Die Korrelationen von den normwertigen Lipocalin-2- zu den normwertigen APRI- und AST-Werten waren aufgrund der physiologischen Zustände bei den CFnoLD_{päd}^{+lung}-Patienten (gesund) wie zu erwarten schwach bis mittelstark. Sehr schwache Zusammenhänge mit Lipocalin-2 zeigte jedoch der FIB-4-Score. Diese schlechte Korrelation lässt sich auf die einzelnen Komponenten von FIB-4 zurückführen, welche durch ihre jeweiligen Korrelationen (teilweise positiv, teilweise negativ) den Wert von FIB-4 gegensätzlich beeinflussen. Aufgrund dieser teilweise schwankenden

Korrelationen der FIB-4-Komponenten, ist der FIB-4-Score nicht als verlässlicher und gut nachvollziehbarer Verlaufspareter für die CFLD_{päd}-Diagnose geeignet.

In der CFLD_{päd}^{+lung}-Kohorte waren nur sehr schwache Korrelationen von LCN2 mit den Thrombozyten, APRI, ALT und AST ($r < 0,2$) hingegen mittelstarke Korrelationen von LCN2 zu FIB-4 zu berechnen. Diese schwachen Korrelationen sind durch die in Tabelle 4.8.a, b und 4.9 aufgelisteten nur gering angestiegenen Leberparameter gegenüber den erheblich, auf knapp das Doppelte erhöhte LCN2-Konzentrationen nachzuvollziehen. Diese Beobachtung weist erneut auf LCN2 als sensibleren Marker zur Diagnose der Leberbeteiligung hin.

Im Kontext der schlechten Korrelationen von Lipocalin-2 mit ALT, AST und der Thrombozyten der CFLD_{päd}^{+lung}-Patienten ist erneut auf die Studie von Borkham-Kamphorst *et al.* von 2013 zu verweisen, in der ebenfalls eine schwache bis keine Korrelation von LCN2 zu „leberbezogenen Enzymen als Indikator für hepatozelluläre Zellschäden“ [19] wie ALT, AST und direkter Fibrosemarker festzustellen war. Sie beschrieben LCN2 in Bezug auf die akute Leberbeteiligung als guten und zuverlässigen Indikator. Sie verwiesen aber auch auf den protektiven Effekt bei akuter Leberverletzung, welcher als Indikator der Akuten-Phase-Reaktion zu interpretieren sei [19]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass LCN2 in akuten Prozessen in messbarer Erhöhung vorliegt und somit ein sensibler Marker eines eintretenden Leberschadens ist.

5.6 Beantwortung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragen

1. Kann Lipocalin-2 Hinweise auf eine Leberbeteiligung bei CF geben und zwischen einer Leberbeteiligung (CFLD) und einer Nichtbeteiligung der Leber (CFnoLD) unterscheiden?

- Lipocalin-2 kann Hinweise auf eine Leberbeteiligung bei CF geben und unterscheidet signifikant zwischen CFLD- und CFnoLD-Patienten ($p = 0,005^*$)

2. Liegt Lipocalin-2 in verschiedenen Ausprägungsstärken bei einer CF mit Leberbeteiligung vor? Ist diese Ausprägungsstärke von Lipocalin-2 bei CFLD abhängig von der Altersgruppe (CFLD_{päd} und CFLD_{erw})? Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Lipocalin-2-Werten dieser beiden Kohorten?

- Lipocalin-2 liegt in verschiedenen Ausprägungsstärken vor (CFnoLD-Median: 118,88 ng/ml und CFLD-Median: 169,52 ng/ml).

Die Ausprägungsstärke ist nicht abhängig von der Altersgruppe.

Die CFLD_{päd}-Patienten (LCN2-Median 169,83 ng/ml) unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,958$) von den CFLD_{erw}-Patienten (LCN2-Median 168,84 ng/ml).

CFLD kann in jedem Alter eintreten und eine Lipocalin-2-Erhöhung hervorrufen.

3. Durch die transiente Elastographie (TE) können Risikopatienten für eine zukünftige Leberbeteiligung bei CF identifiziert werden. Korreliert diese nicht-invasive Diagnostik mit den Werten von Lipocalin-2?

- Die Ergebnisse der transienten Elastographie korrelieren schwach bis mittelstark mit den Ergebnissen der Lipocalin-2-Werte (Korrelationskoeffizient $r(\text{CFLD}_{\text{päd}}^{+\text{lung}}) = 0,184$; $r(\text{CFLD}_{\text{erw}}^{+\text{lung}}) = 0,286$).

Lipocalin-2 ist als unterstützendes Diagnostikum zur Leberbeteiligung bei CF anzusehen.

5.7 Kritische Betrachtung der eigenen Untersuchung

Die vorliegende Arbeit umfasst Untersuchungen an selektierten Patientenkollektiven. Dies hat gegenüber den Tierexperimenten wie sie in Vergleichsstudien von Sultan *et al.* oder Borkham-Kamphorst *et al.* vorgestellt wurden den Vorteil, dass die Ergebnisse direkte Verwendung in der Humanmedizin finden und nicht nur hypothetisch von Tierversuchen auf menschliche Gegebenheiten übertragen werden müssen [18, 19, 251]. Die Patienten sind aufgrund ihrer klinisch bestätigten Diagnose bzw. dem Diagnoseverdacht Teil dieser Studie. Nachteilig ist jedoch die Fallzahl und damit die Kohortenstärke der CF-Patienten, was dazu führt, dass nur ein relativ kleines Patientenkollektiv vorliegt. Dies ist damit zu erklären, dass die Studie an humanen Kohorten durch die Fallzahlen, Anbindung der Patienten an die jeweilige Klinik sowie Einwilligung für die Teilnahme der Studie und dazu das regelmäßige Erscheinen der Patienten sowie das Erfüllen der eingangs erläuterten Einschlusskriterien gekoppelt ist. Tierexperimente besitzen eine höhere Homogenität gegenüber Humanexperimenten, weswegen bereits mit einer kleinen Kohorte eindeutige und signifikante Ergebnisse erzielt werden können. Zudem können die Kohorten bei einem Tierexperiment z.B. durch die beschriebene Terpentin-Injektion iatrogen in Ziel- und Kontrollgruppe unterteilt werden.

Das dieser Studie zugrunde liegende Patientenkollektiv ist trotz der stellenweise diskontinuierlichen Messungen oder lückenhaften Dokumentationen der Messergebnisse durch die multiplen Untersucher nach wie vor eine der größten CF-Kohorten Deutschlands und Europas. Die Daten basieren auf einer Single-Center-Studie. Die Kohorte von $n = 86$ ist für die Validierung der Ergebnisse und Aufteilung in Subgruppen zu klein. Wegen des Störfaktors der Lungenbeteiligung ergeben sich eine noch geringere Zahl an passgenauen Patienten in der Zielgruppe ($n = 55$).

Neben der diskontinuierlichen Messung durch Nicht-Erscheinen der Patienten sowie lückenhafter Dokumentation der Untersuchungsergebnisse sind auch methodische Limitationen möglich. Zu diesen gehören Laborfehler (Messfehler der Serumparameter), Eichungsunterschiede, Gerätefehler, Intra- und Interobserver-Variabilität bei der TE, den sonografischen Untersuchungen oder der Lungenfunktionsdiagnostik und eigenes Versagen und Ungenauigkeit bei der Laborarbeit (Standardfehler der Lipocalin-2-Messung von 16,58 ng/ml). Abhilfe könnte hier nur eine Multi-Center-Studie bringen, mit einem statistisch aussagekräftigen Untersuchungsprotokoll.

6 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wird die therapeutische Konsequenz einer frühzeitigen Diagnose der Leberbeteiligung bei CF bestätigt.

Eine Korrelation zwischen den CFnoLD- und CFLD-Patienten und den jeweiligen Lipocalin-2-Werten ist bei den pädiatrischen Patienten eindeutig gegeben.

Dennoch bleibt weiter zu klären, ob das Lipocalin-2-Protein eher ein Protein der Akut-Phase-Reaktion ist und daher nur bei neu und akut eintretenden Leberschäden erhöht vorliegt. Darauf weist die alleinige Unterscheidung zwischen der CFnoLD und der CFLD im pädiatrischen Alter der Patienten hin. Um dies zu klären und um die Bedeutung von Lipocalin-2 bei CF in Hinblick auf den Eintritt der Leberbeteiligung und die Ergebnisse und Feststellungen dieser Arbeit zu bestätigen und zu etablieren, ist eine Ausdehnung dieser Studie durch eine Multi-Center-Studie unumgänglich.

Zudem ist ein Diagnose-Cut-off der Leberbeteiligung für Lipocalin-2 erforderlich, der die Einordnung der einzelnen Ergebnisse erlaubt. Parallel dazu sollten Kenntnisse über das Anstiegsverhalten von Lipocalin-2 bei einem akuten Leberschaden als auch bei den einzelnen Fibrosestadien erlangt werden.

Desweiteren ist die Unterteilung innerhalb des CFLD-Patientenkollektivs die Leberbeteiligung in hoch akut, akut und minder akut angezeigt, um die einzelnen Ausprägungsstärken von Lipocalin-2 einordnen zu können.

Da die CF und der mögliche Eintritt der Leberbeteiligung ein schleichender Prozess ist, dennoch über 30% der Patienten bereits in ihrer ersten Lebensdekade eine Leberbeteiligung entwickeln, ist es von besonderer Bedeutung, eine Verlaufsmessung durchzuführen, um eine mögliche Leberbeteiligung frühzeitig voraussagen zu können. Letzteres sollte anhand eines erweiterten, multizentrischen Patientenkollektivs getestet werden.

7 Zusammenfassung

Die zystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung in Deutschland mit einer aktuellen Inzidenz von 1:3300-4800 und einem jährlichen Zuwachs von ca. 300 Neugeborenen.

Die Leberbeteiligung besitzt die dritthöchste Mortalitätsrate bei zystischer Fibrose (CFLD) und je nach Studie eine kumulative Inzidenz von 2-68%. Über ein Drittel der Patienten entwickeln bereits in ihrer ersten Lebensdekade eine Leberbeteiligung in Form einer fortgeschrittenen Fibrose. Aufgrund der genannten Umstände ist eine frühzeitige Diagnose der CFLD entscheidend für die Verbesserung der Prognose und damit Lebensqualität sowie die Verlängerung der Lebenszeit. Da die Prävention einer Leberbeteiligung in erster Linie auf die pädiatrischen Patienten abzielt, sollte diese Diagnostik insbesondere durch ein schnelles, nicht-invasives und präzises Screening auch außerhalb von Spezialeinrichtungen in der täglichen Praxis ermöglicht werden. Die aktuellen Screeningmethoden weisen erhebliche Limitationen auf und ermöglichen nur eingeschränkte Vorhersagen einer zukünftig eintretenden Leberbeteiligung. Die Limitationen betreffen in erster Linie die geringe Sensitivität sowie Spezifität der klinischen Untersuchung, der Serummarker (Leberenzyme, Fibrose-Tests und -scores), des Ultraschalls und auch des zeit- und kostenintensiven MRTs, der Exposition durch Strahlung beim CT und eine Invasivität sowie Stichprobenfehler bei dem bisherigen Goldstandard Leberbiopsie.

In der vorliegenden Dissertation wurde Lipocalin-2, ein Apoptose-induzierendes Trägerprotein, welches bereits als Biomarker einiger Nierenerkrankungen etabliert ist und bei anderen chronischen Leberschädigungen in erhöhter Konzentration vorliegt, auf die Erkennung einer Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose unter besonderer Berücksichtigung pädiatrischer Patienten analysiert.

Zum Vergleich mit Lipocalin-2-Werten im Serum wurden die diagnostischen Werte der transienten Elastographie, einer sonografischen Gewebesteifigkeitsmessung, sowie die Serum Fibrosescores AST, ALT, der APRI-Score und FIB-4 herangezogen.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen:

- Die Messergebnisse der TE entsprechen der aktuellen Literatur. Eine erhöhte Lebersteifigkeit von $>6,3$ kPa diagnostiziert eine CFLD. Werte unterhalb des Cut-offs sind einer CFnoLD zuzuordnen.
 - Lipocalin-2 weist signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Leberbeteiligung bei CF auf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen pädiatrischen und erwachsenen Patienten detektiert werden.
 - Eine Korrelation der TE-Werte mit Lipocalin-2 als diagnostischer Hinweis für eine Leberbeteiligung wurde nachgewiesen.
- Multicenter-Studien zur endgültigen Etablierung dieser Diagnostika bei CF sind notwendig.

Aus den Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Lipocalin-2 eine zunehmend bedeutende Rolle in der Leberdiagnostik bei pädiatrischen CF-Patienten spielt und die Lipocalin-2-Messung als unterstützende Maßnahme zur Routinediagnostik hinzugezogen werden sollte.

Es bleibt zu klären, ob Lipocalin-2 ein Parameter der Akut-Phase-Reaktion ist und folglich nur bei akuten Schüben der CFLD erhöht vorliegt.

Weiterhin ist ein klar definierter Schwellenwert für die Lipocalin-2-Messung erforderlich. Auch fehlen genaue Kenntnisse über das Anstiegsverhalten von Lipocalin-2 bei einem akuten Leberschaden aber auch bei den einzelnen Fibrorestadien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass Lipocalin-2 sensibler bei einem Leberzellschaden reagiert als etablierte Leberparameter/Fibrose-Scores und die transiente hepatische Elastographie (TE).

8 Summary

Cystic fibrosis (CF) is the most common multisystem autosomal recessive metabolic disorder in Germany with a current incidence of 1:3300-4800 and an annual growth of approximal 300 newborns.

Cystic fibrosis with liver disease (CFLD) has the third-highest mortality rate in CF. Depending on the study, it has a cumulative incidence of 2-68%. More than a third of the patients develop CFLD in form of an advanced fibrosis in their first decade of life.

Due to the above-mentioned circumstances, early diagnosis of the CFLD is decisive for improving the prognosis and thus the quality of life as well as extending the lifespan. Since the prevention of liver disease is primarily aimed in pediatric patients, this diagnosis should in particular enable rapid, non-invasive and precise screening even beyond of special facilities in daily practice. The current screening methods have considerable limitations and only allow limited predictions of future liver involvement. Primarily, the limitations concern the low sensitivity and specificity of the clinical examination, the serum markers (liver enzymes, fibrosis tests and scores), ultrasound and also the time- and cost-intensive MRI, the exposure to radiation during CT and invasiveness and sampling errors in the previous gold standard liver biopsy.

Lipocalin-2, an apoptosis-inducing carrier protein, is already established as a biomarker of some kidney diseases and is also present in increased concentration in the case of liver damage.

Focus of this presented dissertation is on the analysis of lipocalin-2 for the detection of liver involvement in cystic fibrosis, particularly in pediatric patients.

For comparison the lipocalin-2 values in the serum, the diagnostic values of transient elastography, a sonographic tissue stiffness measurement, and the serum fibrosis markers AST, ALT, the APRI score and FIB-4 were used.

The results of the dissertation demonstrate:

- The measurement results of the TE correspond to the current literature.
An increased liver stiffness of >6.3 kPa diagnoses CFLD.
Values below the cut-off are assigned to CFnoLD.
- Lipocalin-2 shows significant differences between patients with and without liver involvement in CF.
Conversely, there are no significant differences between pediatric and adult patients.
- A correlation of TE with lipocalin-2 as diagnostic evidence for liver involvement has been demonstrated.
Multicenter studies are essential for the final establishment of these diagnostics in CF.

From the results listed, the conclusion can be drawn that lipocalin-2 plays an increasingly important role in the diagnosis of liver disease in pediatric CF patients. Additionally, the lipocalin-2 measurement should be used as a supportive measure for routine diagnosis. It remains to be clarified whether lipocalin-2 is a parameter of the acute phase reaction and is therefore only present in an increased manner in acute episodes. Furthermore, there is a lack of precise knowledge of the rise behavior of lipocalin-2 in acute liver damage as well as in the individual stages of fibrosis. The results of the present work suggest that lipocalin-2 reacts even more sensitively to liver cell damage than established liver parameters/fibrosis scores and the TE.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Amplitude
AAR	AST/ALT-Ratio
ABC	<i>ATP-binding-Casette</i> (dt.: ATP-binde-Kassette)
ACLF	<i>acute-on-chronic liver failure</i> (dt.: Akut-auf-chronisches Leberversagen)
AFLD	alkoholische Fettlebererkrankung
AG	Arbeitsgemeinschaft
alpha2m	alpha-2-Makroglobulin
ALT	Alanin-Aminotransferase
APR	Akut-Phase-Reaktion
APRI	Aspartate-Aminotransferase to Platelet Ratio Index
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> (dt.: akutes Lungenversagen)
ASH	alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under curve</i> (Messgenauigkeit)
AZ	Aktenzeichen
BDL	<i>bile duct ligation</i>
BIM	Bcl2-interagierender Zelltod-Mediator
CAD	Kanadische Dollar
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	COPD Assessment Tests
CCl4	Tetrachlormethan
CF	<i>cystic fibrosis</i> (dt.: zystische Fibrose)
CF ^{+lung}	CF-Patienten ohne Lungenbeteiligung
CFLD	<i>cystic fibrosis with liver disease</i> (dt.: zystische Fibrose assoziierte Leberbeteiligung)
CFLD _{erw}	erwachsene CF-Patienten mit Leberbeteiligung
CFLD _{erw} ^{+lung}	erwachsene CF-Patienten mit Leber- aber ohne Lungenbeteiligung
CFLD _{päd}	pädiatrische CF-Patienten mit Leberbeteiligung
CFLD _{päd} ^{+lung}	pädiatrische CF-Patienten mit Leber- aber ohne Lungenbeteiligung
CF ^{-lung}	CF-Patienten mit Lungenbeteiligung
CFnoLD	CF ohne Leberbeteiligung
CFnoLD _{erw}	erwachsene CF-Patienten ohne Leberbeteiligung
CFnoLD _{päd}	pädiatrische CF-Patienten ohne Leberbeteiligung
CFnoLD _{päd} ^{+lung}	pädiatrische CF-Patienten ohne Leber- und ohne Lungenbeteiligung
CF _{päd} ^{-lung}	pädiatrische CF-Patienten mit Lungenbeteiligung
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (dt. chronisch obstruktive Lungenerkrankungen)
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i> (dt.: disseminierte intravasale Koagulopathie)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
erw	Erwachsene Patienten

et al.	<i>et alii</i> (dt.: und andere)
F	Fibrosestadium
Fa.	Firma
Fab	Antigen bindendes Fragment
Fc	Fragment Crystallisable
FEV1	<i>forced expiratory pressure in 1 second</i> (dt.: Einsekundenkapazität)
FIB-4	Fibrosis-4 Index
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HBV	Hepatitis B
HCV	Hepatitis C
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIT	heparininduzierende Thrombopenie
Ho-1	Hämoxygenase
HRP	Horseradish-Peroxidase
IBMX	3- Isobutyl-1-methylxanthin
ICM	intestinale Kurzschlussstrommessung
IL	Interleukin
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
IQR	<i>Interquartil range</i> (dt.: Interquartilbereich)
IRT	Immunreaktives Trypsin
ITP	Autoimmunthrombopenien
KI	Konfidenzintervall
lat.	lateinisch
LCN2	Lipocalin-2
LD	<i>liver disease</i> (dt.: Leberbeteiligung)
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1/CCL	monocyte chemotactic protein 1
MMP	Matrixmetalloproteinase
mMRC	modified Medical British Research Council
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonucleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSD	Membranspannende Domäne
Na ⁺	Natrium-Ionen
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NBS	Neugeborenen-Screening
NF	Nuklearfaktor
NGAL	Neutrophile-Gelatinase-assoziierte Lipocalin
NPD	nasale Potentialdifferenz
NPV	negativer prädiktiver Wert
päd	pädiatrische Patienten
PAP	pankreatitis-assoziiertes Protein
PAS-D	<i>Periodic acid Schiff-Diastase</i> (dt.: Periodsäure-Schiff-Diastase)
PHT	portale Hypertension
PIIINP	Prokollagen III Aminopeptid
PPV	<i>positive predictive value</i> (dt.: positiver prädiktiver Wert)
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
(R-) Domäne	regulatorische Domäne
ROC	<i>receiver operating characteristic</i> (dt.: Grenzwertoptimierungskurve)

SAA	Serum Amyloid A
TE	Transiente Elastographie
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor beta
Thr.	Thrombozyten
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> (dt.: Gewebehemmer der MMPs)
TM	<i>Time-Motion</i> (dt.: Bewegungszeit)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	thrombotisch-thrombopenische Purpura
UK	United Kingdom
US	<i>United States</i> (dt.: Vereinigte Staaten)
V.	Vena
VC	<i>vital capacity</i> (dt.: Vitalkapazität)
WHO	World Health Organization
YKL	Tyrosin-Lysin-Leucin
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung des CFTR-Kanals	7
Abbildung 1.2	Algorithmus der Handlungsempfehlung zur CF-Diagnose	10
Abbildung 1.3:	Formel zur Berechnung des APRI-Scores	24
Abbildung 1.4:	Formel zur Berechnung des FibroTests [®]	25
Abbildung 1.5:	Formel zur Berechnung des FIB-4-Scores.....	26
Abbildung 1.6:	Formel zur Berechnung des Forns Index	26
Abbildung 3.1:	Gruppierung der Studienkohorte nach Alter (Cut-off ≥ 18 Jahre) und Leberbeteiligung (CFnoLD/CFLD).....	36
Abbildung 3.2:	Formel zur Bestimmung der Geschwindigkeit V und des Elastitätsmoduls E..	37
Abbildung 3.3:	Schematische Darstellung der Positionierung der FibroScan [®] -Messsonde während einer Messung am Patienten.....	38
Abbildung 3.4:	Abbildung des FibroScans [®] mit gleichzeitiger Darstellung des Elastogramms bei gesunder und bei versteifter Leber.....	39
Abbildung 3.5:	Schematisches Prinzip des Sandwich-ELISA.....	44
Abbildung 4.1:	Box-Plot-Darstellung der Altersverteilung aller eingeschlossenen Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86)	50
Abbildung 4.2:	Box-Plot-Darstellung der Lipocalin-2-Werteverteilung aller eingeschlossenen Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86).....	54
Abbildung 4.3:	Box-Plot-Darstellung der transienten hepatischen Elastographie- Untersuchung aller eingeschlossenen CF-Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86)	55
Abbildung 4.4:	Altersseparation: Box-Plot-Darstellung der Lipocalin-2-Werteverteilung aller eingeschlossenen Patienten unterteilt in CFnoLD/CFLD (n = 86).....	56
Abbildung 4.5:	Box-Plot-Darstellung der transienten Elastographie-Werteverteilung aller eingeschlossenen pädiatrischen Patienten unterteilt in CFnoLD _{päd} /CFLD _{päd} (n = 48)	57
Abbildung 4.6:	Darstellung der Genauigkeit der CFLD-Messmethoden anhand der ROC-Analyse bei pädiatrischen Patienten (n = 48).....	59
Abbildung 4.7:	Box-Plot-Darstellung der transienten hepatischen Elastographie-Werte aller eingeschlossenen erwachsenen Patienten unterteilt in CFnoLD _{erw} /CFLD _{erw} (n = 38).....	61
Abbildung 4.8:	Darstellung der Genauigkeit der CFLD-Messmethoden anhand der ROC-Analyse bei erwachsenen Patienten (n = 38)	62

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Histologische Klassifikationssysteme zur Einschätzung und Einteilung der Fibrosestadien hier am Beispiel der Virushepatitis.....	21
Tabelle 1.2:	Konversion der FibroTest®-Werte zu den Fibrosestadien (nach METAVIR).....	25
Tabelle 3.1:	Laborgeräte	40
Tabelle 3.2:	Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 3.3:	Kommerzielle Labor-Kits	41
Tabelle 3.4:	ELISA Versuchsprotokoll zur Bestimmung von Lipocalin-2.....	45
Tabelle 3.5:	Interpretation des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) in Anlehnung an Cohen.....	47
Tabelle 4.1:	Eigenschaften, Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten.....	52
Tabelle 4.2:	Vergleich der Messmethoden berechnet anhand der ROC-Analysen bei pädiatrischen Patienten.....	59
Tabelle 4.3:	Vergleich der Messmethoden berechnet anhand der ROC-Analysen bei erwachsenen Patienten	63
Tabelle 4.4:	Korrelationskoeffizienten nach Spearman von Lipocalin-2 mit Werten der TE, Labor- und Lungenfunktionsparametern der einbezogenen CF-Patienten	64
Tabelle 4.5:	Korrelationskoeffizienten nach Spearman von Lipocalin-2 mit Ergebnissen der TE, Labor-, Lungenfunktionsparametern und Alter der einbezogenen CF-Patienten.....	67
Tabelle 4.6:	Pädiatrische Patienten mit einer Lungenfunktion von $FEV1 \geq 70\%$ und $VC \geq 80\%$ (lungengesund ($CF_{\text{päd}}^{+\text{lung}}$)).	68
Tabelle 4.7:	Erwachsene Patienten mit einer Lungenfunktion von $FEV1 \geq 70\%$ und $VC \geq 80\%$ (lungengesund).....	69
Tabelle 4.8:	Eigenschaften, Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten mit einer Lungenfunktion von $FEV1 \geq 70\%$ und $VC \geq 80\%$ (lungengesund).....	70
Tabelle 4.9:	Korrelationen der Laborparameter und Messergebnisse der einbezogenen CF-Patienten mit einer Lungenfunktion von $FEV1 \geq 70\%$ und $VC \geq 80\%$ (lungengesund).	71

12 Literaturverzeichnis

1. **Abella V, Scotece M, Conde J, Gómez R, Lois A, Pino J, Gómez-Reino JJ, Lago F, Mobasher A, Gualillo O** The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases, *Biomarkers* (2015) 20:565–571
2. **Alicandro G, Battezzati PM, Battezzati A, Speziali C, Claut L, Motta V, Loi S, Colombo C** Insulin secretion, nutritional status and respiratory function in cystic fibrosis patients with normal glucose tolerance, *Clinical Nutrition* (2012) 31:118–123
3. **Andersen DH** Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease, *American Journal of Diseases of Children* (1938) 56:344–399
4. **Andersen DH, Hodges RG** Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology, *American Journal of Diseases of Children* (1946) 72:62–80
5. **Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ** Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity., *Science* (1991) 253:202–205
6. **Aoyama T, Paik Y-H, Seki E** Toll-Like Receptor Signaling and Liver Fibrosis, *Gastroenterology Research and Practice* (2010) 2010:1–8
7. **Ariza X, Graupera I, Coll M, Solà E, Barreto R, García E, Moreira R, Elia C, Morales-Ruiz M, Llopis M, Huelin P, Solé C, Fabrellas N, Weiss E, Nevens F, Gerbes A, Trebicka J, Saliba F, Fondevila C, Hernández-Gea V, Fernández J, Bernardi M, Arroyo V, Jiménez W, Deulofeu C, Pavesi M, Angeli P, Jalan R, Moreau R, Sancho-Bru P, Ginès P** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a biomarker of acute-on-chronic liver failure and prognosis in cirrhosis., *Journal of Hepatology* (2016) 65:57–65
8. **Asimakopoulou A, Borkham-Kamphorst E, Tacke F, Weiskirchen R** Lipocalin-2 (NGAL/LCN2), a “help-me” signal in organ inflammation, *Hepatology* (2016) 63:669–671
9. **Asimakopoulou A, Weiskirchen S, Weiskirchen R** Lipocalin 2 (LCN2) Expression in Hepatic Malfunction and Therapy, *Frontiers in Physiology* (2016) 7:430
10. **Aubé C, Oberti F, Koralı N, Namour M-A, Loisel D, Tanguy J-Y, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Rifflet H, Maïga MY, Penneau-Fontbonne D, Caron C, Calès P** Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis, *Journal of Hepatology* (1999) 30:472–478
11. **Bagheri-Hanson A, Nedwed S, Rueckes-Nilges C, Naehrlich L** Intestinal current measurement versus nasal potential difference measurements for diagnosis of cystic fibrosis: a case–control study, *BMC Pulmonary Medicine* (2014) 14:156
12. **Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR** Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)., *Cell* (1992) 68:809–818
13. **Bechtold SM, Rohrer TR, Raile K, Hofer S, Thon A, Boettcher C, Konrad K, Pozza RD, Bollow E, Holl RW** Diabetes mellitus in pediatric solid organ recipients without and with cystic

- fibrosis: An analysis from the German-Austrian diabetes database (Diabetes Patienten Verlaufsdokumentation), *Pediatric Diabetes* (2018) 19:1191–1197
14. **Van Biervliet S, Verdievel H, Vande Velde S, De Bruyne R, De Looze D, Verhelst X, Geerts A, Robberecht E, Van Vlierberghe H** Longitudinal Transient Elastography Measurements Used in Follow-up for Patients with Cystic Fibrosis, *Ultrasound in Medicine & Biology* (2016) 42:848–854
 15. **Blackfan KD, May CD** Inspissation of secretion, dilations of the ducts and acini, atrophy and fibrosis of the pancreas in infants, *Journal of Pediatrics* (1938) 13:627 – 634
 16. **De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M** Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms., *Thorax* (2006) 61:627–635
 17. **Boelle P-Y, Debray D, Guillot L, Clement A, Corvol H** Cystic Fibrosis Liver Disease: Outcomes and Risk Factors in a Large Cohort of French Patients., *Hepatology* (2018) 69:1648–1656
 18. **Borkham-Kamphorst E, Drews F, Weiskirchen R** Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1b through nuclear factor-kB activation, *Liver International* (2011) 31:656–665
 19. **Borkham-Kamphorst E, van de Leur E, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, Tacke F, Berger T, Mak TW, Weiskirchen R** Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* (2013) 1832:660–673
 20. **Botros M, Sikaris KA** The de ritis ratio: the test of time. *The Clinical Biochemist Reviews* (2013) 34:117–130
 21. **Boyle MP, De Boeck K** A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect., *The Lancet Respiratory medicine* (2013) 1:158–163
 22. **Bravo AA, Sheth SG, Chopra S** Liver Biopsy, *English Journal* (2001) 344:495–500
 23. **Breton E, Bridoux-Henno L, Guyader D, Daniélou H, Jouan H, Beuchée A, Nousbaum JB, Dabadie A** Value of transient elastography in noninvasive assessment in children's hepatic fibrosis, *Archives de Pédiatrie* (2009) 16:1005–1010
 24. **Brew K, Nagase H** The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (2010) 1803:55–71
 25. **Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz** Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen, Gendiagnostikgesetz - GenDG (2009) BGBl. I:2529, 3672
 26. **Busch R** Zur Geschichte der Mukoviszidose, *Das Deutsche Gesundheitswesen* (1978) 33:316–320
 27. **Busch R** Zur Frühgeschichte der zystischen Pankreasfibromatose, *Schriftenreihe für Geschichte der Naturwissenschaften* (1979) 16:95–109
 28. **Busch R** Historical aspects of cystic fibrosis, *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Rostock* (1986) 35:84–87
 29. **Busch R** On the history of cystic fibrosis., *Acta Universitatis Carolinae Medica* (1990) 36:13–15
 30. **Calès P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet M-C, Konaté A, Gallois Y, Ternisien C, Chevaller A, Lunel F** A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis, *Hepatology* (2005) 42:1373–1381

31. **Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS** Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice, *Journal of Cystic Fibrosis* (2008) 7:179–196
32. **Castera L** Noninvasive Methods to Assess Liver Disease in Patients With Hepatitis B or C, *Gastroenterology* (2012) 142:1293-1302.e4
33. **Castera L, Fornis X, Alberti A** Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography, *Journal of Hepatology* (2008) 48:835–847
34. **Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Lédinghen V** Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C, *Gastroenterology* (2005) 128:343–350
35. **Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK** The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer., *Biochimica et biophysica acta* (2012) 1826:129–69
36. **Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE** Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel., *Cell* (1991) 66:1027–1036
37. **Cines DB, Blanchette VS** Immune Thrombocytopenic Purpura, *New England Journal of Medicine* (2002) 346:995–1008
38. **Clancy JP, Szczesniak RD, Ashlock MA, Ernst SE, Fan L, Hornick DB, Karp PH, Khan U, Lymp J, Ostmann AJ, Rezayat A, Starner TD, Sugandha SP, Sun H, Quinney N, Donaldson SH, Rowe SM, Gabriel SE** Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function., *PLoS One* (2013) 8:e73905
39. **Clinical and Functional Translation of CFTR** List of current CFTR2 mutations, In: CF Foundation, Johns Hopkins University, The Hospital for Sick Children (2017)
40. **Clinical and Functional Translation of CFTR** CFTR2 Variant List History, In: CF Foundation, Johns Hopkins University, The Hospital for Sick Children (2020)
41. **Coffey MJ, Whitaker V, Gentin N, Junek R, Shalhoub C, Nightingale S, Hilton J, Wiley V, Wilcken B, Gaskin KJ, Ooi CY** Differences in Outcomes between Early and Late Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Newborn Screening Era., *Journal of Pediatrics* (2017) 181:137-145.e1
42. **Cohen J** Statistical power analysis for the behavioral sciences, L Erlbaum Associates (1988) 2:551
43. **Cohn JA, Strong T V, Picciotto MR, Nairn AC, Collins FS, Fitz JG** Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells., *Gastroenterology* (1993) 105:1857–1864
44. **Colombo C, Alicandro G** Liver Disease in Cystic Fibrosis: Illuminating the Black Box, *Hepatology* (2019) 69:1379–1381
45. **Colombo C, Apostolo MG, Ferrari M, Seia M, Genoni S, Giunta A, Sereni LP** Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis., *Journal of Pediatrics* (1994) 124:393–399

46. **Colombo C, Battezzati PM** Liver involvement in cystic fibrosis: primary organ damage or innocent bystander?, *Journal of Hepatology* (2004) 41:1041–1044
47. **Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, Morabito A, Costantini D, Padoan R, Giunta A** Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome, *Hepatology* (2002) 36:1374–1382
48. **Colombo C, Costantini D, Rocchi A, Romano G, Rossi G, Bianchi ML, Bertoli S, Battezzati A** Effects of liver transplantation on the nutritional status of patients with cystic fibrosis, *Transplant International* (2005) 18:246–255
49. **Colombo C, Crosignani A, Battezzati PM** Liver involvement in cystic fibrosis, *Journal of Hepatology* (1999) 31:946–954
50. **Colombo C, Russo MC, Zazzeron L, Romano G** Liver Disease in Cystic Fibrosis, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2006) 43:49–55
51. **Colombo C, Russo MC, Zazzeron L, Romano G** Liver disease in cystic fibrosis, *Current Opinion in Pulmonary Medicine* (2007) 13:529–536
52. **Conway SP, Morton AM, Oldroyd B, Truscott JG, White H, Smith AH, Haigh I** Osteoporosis and osteopenia in adults and adolescents with cystic fibrosis: prevalence and associated factors., *Thorax* (2000) 55:798–804
53. **Cooke RE, Gibson LE, Lewis E** A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis, *Pediatrics* (1959) 23:545–549
54. **Crawford AR, Lin X-Z, Crawford JM** The normal adult human liver biopsy: A quantitative reference standard, *Hepatology* (1998) 28:323–331
55. **Criée C-P, Baur X, Berdel D, Bösch D, Gappa M, Haidl P, Husemann K, Jörres RA, Kabitz H-J, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Merget R, Mitfessel H, Nowak D, Ochmann U, Schürmann W, Smith H-J, Sorichter S, Voshaar T, Worth H** Leitlinie zur Spirometrie, *Dustri-Verlag Dr Karl Feistle* (2015) 69:9–11
56. **Criée C-P, Berdel D, Heise D, Jörres RA, Kardos P, Köhler D, Leupold W, Magnussen H, Marek W, Merget R, Mitfessel H, Rasche K, Rolke M, Smith H-J, Sorichter S, Worth H** Empfehlung zur Ganzkörperplethysmographie (Bodyplethysmographie), *Journal of Experimental Psychology: General* (2007) 136:1–42
57. **Cystic Fibrosis Foundation** Patient Registry 2018 Annual Data Report, *cff.org* (2018) 74
58. **Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium** Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis., *The New England journal of medicine* (1993) 329:1308–1313
59. **Davies JC, Alton EFW, Bush A** Cystic fibrosis., *BMJ (Clinical research ed)* (2007) 335:1255–1259
60. **Davis PB** Cystic fibrosis since 1938., *American journal of respiratory and critical care medicine* (2006) 173:475–482
61. **Davison S** Assessment of liver disease in cystic fibrosis, *Paediatric Respiratory Reviews* (2018) 27:24–27
62. **Debray D, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C** Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease, *Journal of Cystic Fibrosis* (2011) 10:29–36

63. **Debray D, Lykavieris P, Gauthier F, Dousset B, Sardet A, Muncks A, Laselve H, Bernard O** Outcome of cystic fibrosis-associated liver cirrhosis: management of portal hypertension, *Journal of Hepatology* (1999) 31:77–83
64. **Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ** Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging, *Hepatology* (1994) 19:1513–1520
65. **Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH)** S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung, Springer-Verlag 23:281–323
66. **Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR** A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake, *Cell* (2005) 123:1293–1305
67. **Devireddy LR, Hart DO, Goetz DH, Green MR** A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production., *Cell* (2010) 141:1006–1017
68. **Dijk FN, McKay K, Barzi F, Gaskin KJ, Fitzgerald DA** Improved survival in cystic fibrosis patients diagnosed by newborn screening compared to a historical cohort from the same centre., *Archives of disease in childhood* (2011) 96:1118–1123
69. **Diwakar V, Pearson L, Beath S** Liver disease in children with cystic fibrosis, *Paediatric Respiratory Reviews* (2001) 2:340–349
70. **Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS** Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies, *Journal of Cystic Fibrosis* (2012) 11:461–479
71. **Echosens™** FibroScan®502 - The first clinically validated device using Transient Elastography, www.echosens.com (2011) 3–12 (Booklet)
72. **Echosens™** FibroScan®502 Touch - Innovation in liver disease management, www.echosens.com (2018) 3–16 (Booklet)
73. **Von Eckardstein A** Labordiagnostik der Leberfibrose und der nichtalkoholischen Fettleber-Krankheit, *Journal of Laboratory Medicine* (2014) 38:75–85
74. **Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R** Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteney, *Clinical genetics* (1985) 28:265–271
75. **Eichler I, Nilsson M, Rath R, Enander I, Venge P, Koller DY** Human neutrophil lipocalin, a highly specific marker for acute exacerbation in cystic fibrosis, *European Respiratory Journal* (1999) 11:1145–1149
76. **Erhardt A, Lörke J, Vogt C, Poremba C, Willers R, Sagir A, Häussinger D** Transiente Elastografie zur Diagnose der Leberzirrhose, *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2006) 131:2765–2769
77. **Fanconi G, Knauer, E. Uehlinger C** Das Coeliakie Syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien, *Wiener Medizinische Wochenschrift* (1936) 86:753
78. **Farber S** Pancreatic function and disease in early life. Pathology changes associated with pancreatic insufficiency in early life, *Arch Path* (1944) 37:238
79. **Farber S** Some organic digestive disturbances in early life, *Michigan State Medical Society* (1945) 44:587 – 594
80. **Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, LeGrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW, Cystic Fibrosis Foundation**

- Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report, *Journal of Pediatrics* (2008) 153:4–14
81. **Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR** Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation, *Journal of Pediatrics* (2017) 181:4–15
 82. **Feranchak AP, Sokol RJ** Cholangiocyte Biology and Cystic Fibrosis Liver Disease, *Seminars in Liver Disease* (2001) 21:471–488
 83. **Ferkol T, Rosenfeld M, Milla CE** Cystic fibrosis pulmonary exacerbations, *Journal of Pediatrics* (2006) 148:259–264
 84. **Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony H-P** Zytokine, *Zeitschrift für Rheumatologie* (2007) 66:297–303
 85. **FitzSimmons SC** The changing epidemiology of cystic fibrosis, *Journal of Pediatrics* (1993) 122:1–9
 86. **Flass T, Narkewicz MR** Cirrhosis and other liver disease in cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis* (2013) 12:116–124
 87. **Flower DR** The lipocalin protein family: structure and function., *The Biochemical Journal* (1996) 318:1–14
 88. **Flume PA, Mogayzel PJ, Robinson KA, Goss CH, Rosenblatt RL, Kuhn RJ, Marshall BC** Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines Treatment of Pulmonary Exacerbations, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2009) 180:802–808
 89. **Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J** Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model, *Hepatology* (2002) 36:986–992
 90. **Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE** Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, *BioTechniques* (1999) 26:112–125
 91. **Friedrich-Rust M, Ong MF, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, Herrmann E** Performance of Transient Elastography for the Staging of Liver Fibrosis: A Meta-Analysis, *Gastroenterology* (2008) 134:960–974
 92. **Friedrich-Rust M, Schlueter N, Smaczny C, Eickmeier O, Rosewich M, Feifel K, Herrmann E, Poynard T, Gleiber W, Lais C, Zielen S, Wagner TOF, Zeuzem S, Bojunga J** Non-invasive measurement of liver and pancreas fibrosis in patients with cystic fibrosis., *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* (2013) 12:431–439
 93. **Garay-Rojas E, Harper M, Hraba-Renevey S, Kress M** An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene 24p3, *Gene* (1996) 170:173–180
 94. **Giannandrea M, Parks WC** Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis., *Disease models & mechanisms* (2014) 7:193–203
 95. **Gibson L, Cooke R** A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis., *Pediatrics* (1959) 23:545–549
 96. **Gibson R, Burns JL, Ramsey BW** Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in

- Cystic Fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2003) 168:918–951
97. **Gooding I, Dondos V, Gyi KM, Hodson M, Westaby D** Variceal hemorrhage and cystic fibrosis: Outcomes and implications for liver transplantation, *Liver Transplantation* (2005) 11:1522–1526
 98. **Goubau C, Wilschanski M, Skalicka V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, Munck A, Derichs N, Middleton PG, Hjelte L, Padoan R, Vasar M, De Boeck K** Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis, *Thorax* (2009) 64:683–691
 99. **Gregg RG, Simantel A, Farrell PM, Kosciak R, Kosorok MR, Laxova A, Laessig R, Hoffman G, Hassemer D, Mischler EH, Splaingard M** Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: comparison of biochemical and molecular methods., *Pediatrics* (1997) 99:819–824
 100. **Gressner A-M, Gao C-F, Gressner O-A** Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: a short survey., *World Journal of Gastroenterology* (2009) 15:2433–2440
 101. **Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM** Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests, *Clinica Chimica Acta* (2007) 381:107–113
 102. **Guechot J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboudeau J, Poupon R** Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of a-interferon therapy, *Journal of Hepatology* (1995) 22:22–26
 103. **Gugliani L, Gopal R, Rangel-Moreno J, Junecko BF, Lin Y, Berger T, Mak TW, Alcorn JF, Randall TD, Reinhart TA, Chan YR, Khader SA** Lipocalin 2 Regulates Inflammation during Pulmonary Mycobacterial Infections, *PLoS One* (2012) 7:e50052
 104. **Gunneson TJ, Menon KVN, Wiesner RH, Daniels JA, Hay JE, Charlton MR, Brandhagen DJ, Rosen CB, Porayko MK** Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy performed by a physician assistant, *The American Journal of Gastroenterology* (2002) 97:1472–1475
 105. **Haack A, Aragão GG, Novaes MRCG** Pathophysiology of cystic fibrosis and drugs used in associated digestive tract diseases., *World Journal of Gastroenterology* (2013) 19:8552–8561
 106. **Halfon P, Bacq Y, De Muret A, Penaranda G, Bourliere M, Ouzan D, Tran A, Botta D, Renou C, Bréchet M-C, Degott C, Paradis V** Comparison of test performance profile for blood tests of liver fibrosis in chronic hepatitis C, *Journal of Hepatology* (2007) 46:395–402
 107. **Hanley AJ, McNeil JB** The Meaning and Use of the Area under a Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve, *Radiology* (1982) 143:29–36
 108. **Harris R, Harman DJ, Card TR, Aithal GP, Guha IN** Prevalence of clinically significant liver disease within the general population, as defined by non-invasive markers of liver fibrosis: a systematic review, *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* (2017) 2:288–297
 109. **Hecken J** Gemeinsamer Bundesausschuss. Kinder-Richtlinie: Formale und inhaltliche Überarbeitung (Neustrukturierung) - Neufassung., . In: Bundesministerium für Gesundheit
 110. **Hederström E, Forsberg L, Florén C-H, Prylz H** Liver biopsy complications monitored by ultrasound, *Journal of Hepatology* (1989) 8:94–98
 111. **Heinz RG, Valentin WA, Knöbl PP** Thrombopenie auf der Intensivstation, *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin* (2016) 111:425–433
 112. **Herget-Rosenthal S** One step forward in the early detection of acute renal failure,

- The Lancet (2005) 365:1205–1206
113. **Herrmann U, Dockter G, Lammert F** Cystic fibrosis-associated liver disease, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* (2010) 24:585–592
 114. **Hillaire S, Cazals-Hatem D, Erlinger S, Paradis V** Cystic fibrosis liver disease in adults: Limits of noninvasive tests of fibrosis, *Hepatology* (2018) 67:798–799
 115. **Hodson M, Bush A, Geddes D** History of cystic fibrosis, CRC Press (2012) 3:3–19
 116. **Horowitz JM, Venkatesh SK, Ehman RL, Jhaveri K, Kamath P, Ohliger MA, Samir AE, Silva AC, Taouli B, Torbenson MS, Wells ML, Yeh B, Miller FH** Evaluation of hepatic fibrosis: a review from the society of abdominal radiology disease focus panel., *Abdominal Radiology* (2017) 42:2037–2053
 117. **Hraba-Renevey S, Türler H, Kress M, Salomon C, Weil R** SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism., *Oncogene* (1989) 4:601–608
 118. **Hudson M, Sheron N, Rowe IA, Hirschfield GM** Should we screen for cirrhosis?, *BMJ* (2017) 358:j3233
 119. **Ikezoe K, Handa T, Mori K, Watanabe K, Tanizawa K, Aihara K, Tsuruyama T, Miyagawa-Hayashino A, Sokai A, Kubo T, Muro S, Nagai S, Hirai T, Chin K, Mishima M** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in idiopathic pulmonary fibrosis., *The European Respiratory Journal* (2014) 43:1807–1809
 120. **Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poinard T** Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study, *The Lancet* (2001) 357:1069–1075
 121. **Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H** Histological grading and staging of chronic hepatitis, *Journal of Hepatology* (1995) 22:696–699
 122. **Jalan R, Hayes PC** UK guidelines on the management of variceal haemorrhage in cirrhotic patients. *British Society of Gastroenterology, Gut* (2000) 46:1–15
 123. **Janssen J, Laatz W** Statistische Datenanalyse mit SPSS Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests, Springer Berlin Heidelberg Verlag (2013) 8:615
 124. **Javier R-M, Jacquot J** Bone disease in cystic fibrosis: What’s new?, *Joint Bone Spine* (2010) 78:445–450
 125. **Jeong WK, Lim HK, Lee H-K, Jo JM, Kim Y** Principles and clinical application of ultrasound elastography for diffuse liver disease, *Ultrasonography* (2014) 33:149–160
 126. **Jiang H, Zheng T, Duan T, Chen J, Song B** Non-invasive in vivo Imaging Grading of Liver Fibrosis., *Journal of Clinical and Translational Hepatology* (2018) 6:198–207
 127. **Kalousek I, Röselová P, Otevrelová P** NGAL-neutrophil gelatinase associated lipocalin in biochemistry, physiology and clinical praxis, *Casopis lekaru ceskych* (2006) 145:373–376
 128. **Kamal N, Surana P, Koh C** Liver disease in patients with cystic fibrosis., *Current Opinion in Gastroenterology* (2018) 34:146–151
 129. **Kangelaris KN, Prakash A, Liu KD, Aouizerat B, Woodruff PG, Erle DJ, Rogers A, Seeley EJ, Chu J, Liu T, Osterberg-Deiss T, Zhuo H, Matthay MA, Calfee CS** Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS., *American Journal of*

- Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology (2015) 308:1102–1113
130. **Karlas T, Neuschulz M, Oltmanns A, Güttler A, Petroff D, Wirtz H, Mainz JG, Mössner J, Berg T, Tröltzsch M, Keim V, Wiegand J** Non-invasive evaluation of cystic fibrosis related liver disease in adults with ARFI, transient elastography and different fibrosis scores, *PLoS One* (2012) 7:1–8
 131. **Keating C, Lommatzsch ST, Sosnay P** Clinical Care Guide for Diagnosis Of Cystic Fibrosis, Cystic Fibrosis Foundation (2017) 1–2
 132. **Kennedy P, Wagner M, Castéra L, Hong CW, Johnson CL, Sirlin CB, Taouli B** Quantitative Elastography Methods in Liver Disease: Current Evidence and Future Directions., *Radiology* (2018) 286:738–763
 133. **Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC** Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, NY)* (1989) 245:1073–1080
 134. **Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H** Standards of care for patients with cystic fibrosis: A European consensus, *Journal of Cystic Fibrosis* (2005) 4:7–26
 135. **Kettaneh A, Marcellin P, Douvin C, Poupon R, Ziol M, Beaugrand M, de Lédinghen V** Features associated with success rate and performance of fibroscan measurements for the diagnosis of cirrhosis in HCV patients: A prospective study of 935 patients, *Journal of Hepatology* (2007) 46:628–634
 136. **Kim H-J, Lee H-K, Cho J-H, Yang H-J** Quantitative comparison of transient elastography (TE), shear wave elastography (SWE) and liver biopsy results of patients with chronic liver disease., *Journal of Physical Therapy Science* (2015) 27:2465–2468
 137. **Kinnman N, Lindblad A, Housset C, Buentke E, Scheynius A, Strandvik B, Hulcrantz R** Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in liver tissue from patients with cystic fibrosis, *Hepatology* (2000) 32:334–340
 138. **Kisseleva T, Brenner DA** Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2007) 22:73–78
 139. **Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N** Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase., *Journal of Biological Chemistry* (1993) 268:10425–10432
 140. **Klotter V, Gunchick C, Siemers E, Hudel H, Roderfeld M, Roeb E** Die Steigerung der Lebersteifigkeit erlaubt eine frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose: Ergebnisse einer prospektiven, longitudinalen Kohortenstudie, *Zeitschrift für Gastroenterologie* (2017) 55:57–299
 141. **Klotter V, Gunchick C, Siemers E, Hudel H, Roderfeld M, Roeb E** Prospektive, longitudinale Kohortenstudie zur hepatischen Elastografie: Frühzeitige Diagnose der Leberbeteiligung bei zystischer Fibrose, *Zeitschrift für Gastroenterologie* (2018) 56:2–89 (Abstract)
 142. **Klotter V, Gunchick C, Siemers E, Rath T, Hudel H, Naehrlich L, Roderfeld M, Roeb E** Assessment of pathologic increase in liver stiffness enables earlier diagnosis of CFLD: Results from a prospective longitudinal cohort study, *PLoS One* (2017) 12:e0178784
 143. **Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW WJ**

- Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis [Hepatology 1981;1:431–435],
Journal of Hepatology (2003) 38:382–386
144. **Knowles M, Gatz J, Boucher R** Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis., The New England Journal of Medicine (1981) 305:1489–1495
 145. **Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatz JT, Boucher RC** Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo.,
The American review of respiratory disease (1981) 124:484–490
 146. **Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC** In Vivo Nasal Potential Difference: Techniques and Protocols for Assessing Efficacy of Gene Transfer in Cystic Fibrosis,
Human Gene Therapy (1995) 6:445–455
 147. **Knowlton RG, Cohen-Haguenaer O, Van Cong N, Frézal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M** A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7., Nature (1985) 318:380–382
 148. **Ko YH, Thomas PJ, Delannoy MR, Pedersen PL** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein.,
Journal of Biological Chemistry (1993) 268:24330–24338
 149. **Kobelska-Dubiel N, Klinecicz B, Cichy W** Liver disease in cystic fibrosis.,
Przegląd gastroenterologiczny (2014) 9:136–141
 150. **Konstan MW, Berger M** Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology., Pediatric Pulmonology (1997) 24:137–161
 151. **Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE** Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C,
Hepatology (2005) 41:1376–1382
 152. **Laguna TA, Lin N, Wang Q, Holme B, McNamara J, Regelman WE** Comparison of quantitative sweat chloride methods after positive newborn screen for cystic fibrosis.,
Pediatric Pulmonology (2012) 47:736–742
 153. **Lamireau T, Monnereau S, Martin S, Marcotte J-E, Winnock M, Alvarez F** Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study, Journal of Hepatology (2004) 41:920–925
 154. **Landsteiner K** Darmverschluss durch eingedicktes Meconium: Pankreatitis,
Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie (1905) 16:903–907
 155. **Lee S, Lee W-H, Lee M-S, Mori K, Suk K** Regulation by lipocalin-2 of neuronal cell death, migration, and morphology, Journal of Neuroscience Research (2012) 90:540–550
 156. **Leeuwen L, Fitzgerald DA, Gaskin KJ** Liver Disease in Cystic Fibrosis,
Paediatric Respiratory Reviews (2014) 15:69–74
 157. **Legroux-Gérot I, Leroy S, Prudhomme C, Perez T, Flipo RM, Wallaert B, Cortet B** Bone loss in adults with cystic fibrosis: Prevalence, associated factors, and usefulness of biological markers,
Joint Bone Spine (2012) 79:73–77
 158. **LeGrys VA, Applequist R, Briscoe DR, Farrell P, Hickstein R LS** Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis: Approved Guideline- Third Edition,

- Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) 29:1–49
159. **Lemaitre C, Dominique S, Billoud E, Eliezer M, Montialoux H, Quillard M, Riachi G, Koning E, Morisse-Pradier H, Savoye G, Savoye-Collet C, Gorla O** Relevance of 3D Cholangiography and Transient Elastography to Assess Cystic Fibrosis-Associated Liver Disease?, *Canadian Respiratory Journal* (2016) 2016:1–8
 160. **Leung DH, Khan M, Minard CG, Guffey D, Ramm LE, Clouston AD, Miller G, Lewindon PJ, Shepherd RW, Ramm GA** Aspartate aminotransferase to platelet ratio and fibrosis-4 as biomarkers in biopsy-validated pediatric cystic fibrosis liver disease, *Hepatology* (2015) 62:1576–1583
 161. **Leung DH, Narkewicz MR** Cystic Fibrosis-related cirrhosis, *Journal of Cystic Fibrosis* (2017) 16:50–61
 162. **Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA** The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease., *American Journal of Pathology* (2002) 160:1705–1715
 163. **Lewindon PJ, Puertolas-Lopez M V., Ramm LE, Noble C, Pereira TN, Wixey JA, Hartel GF, Calvopina DA, Leung DH, Ramm GA** Accuracy of Transient Elastography Data Combined With APRI in Detection and Staging of Liver Disease in Pediatric Patients With Cystic Fibrosis, *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (2019) 19
 164. **Lewindon PJ, Shepherd RW, Walsh MJ, Greer RM, Williamson R, Pereira TN, Frawley K, Bell SC, Smith JL, Ramm GA** Importance of hepatic fibrosis in cystic fibrosis and the predictive value of liver biopsy, *Hepatology* (2011) 53:193–201
 165. **Li L, Somerset S** Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: Challenges for nutrition therapy, *Digestive and Liver Disease* (2014) 46:865–874
 166. **LifeSpan** Human Antithrombin-III ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F10410, isbio.com (2019) 2
 167. **Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B** Natural history of liver disease in cystic fibrosis, *Hepatology* (1999) 30:1151–1158
 168. **Lindblad A, Hulterantz R, Strandvik B** Bile-duct destruction and collagen deposition: a prominent ultrastructural feature of the liver in cystic fibrosis., *Hepatology* (1992) 16:372–381
 169. **Lindemann H, Tümmler B, Dockter G** Mukoviszidose – Zystische Fibrose, *Georg Thieme Verlag KG* (2004) 4:1–2
 170. **Lindor K, Bru C, Jorgensen R, Rakela J, Bordas J, Gross J, Rodes J, McGill D, Reading C, James E, Charboneau J, Ludwig J, Batts K, Zinsmeister A** The role of ultrasonography and automatic-needle biopsy in outpatient percutaneous liver biopsy, *Hepatology* (1996) 23:1079–1083
 171. **Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D** Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose, *Deutsches Ärzteblatt* (2007) 104:1752–1757
 172. **Louis D, Duc MLP, Reix P, Chazalotte J-P, Durieu I, Feigelson J, Bellon G** Partial splenectomy for portal hypertension in cystic fibrosis related liver disease, *Pediatric Pulmonology* (2007) 42:1173–1180
 173. **Mall M, Hirtz S, Gonska T, Kunzelmann K** Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis* (2004) 3:165–169

174. **Martin C, Hamard C, Kanaan R, Boussaud V, Grenet D, Abély M, Hubert D, Munck A, Lemonnier L, Burgel P-R** Causes of death in French cystic fibrosis patients: The need for improvement in transplantation referral strategies!, *Journal of Cystic Fibrosis* (2016) 15:204–212
175. **Martínez SM, Crespo G, Navasa M, Fornis X** Noninvasive assessment of liver fibrosis, *Hepatology* (2011) 53:325–335
176. **Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW, European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group** A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis* (2009) 8:71–78
177. **Merk D, Schubert-Zsilavec M** Neue Ansätze bei Mukoviszidose, *Pharmazeutische Zeitung* (2011) 37
178. **Mikolasevic I, Orlic L, Franjic N, Hauser G, Stimac D, Milic S** Transient elastography (FibroScan®) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand?, *World Journal of Gastroenterology* (2016) 22:7236–7251
179. **Mirtajani SB, Farnia P, Hassanzad M, Ghanavi J, Farnia P, Velayati AA** Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analysis, *Biomedical and Biotechnology Research Journal* (2017) 1:105–112
180. **Mishra A, Greaves R, Massie J** The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era., *The Clinical Biochemist Reviews* (2005) 26:135–153
181. **Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery, *The Lancet* (2005) 365:1231–1238
182. **Morali G, Maor Y, Klar R, Braun M, Ben Ari Z, Bujanover Y, Zuckerman E, Boger S, Halfon P** Fibrotest-Actitest: The Biochemical Marker of Liver Fibrosis-The Israeli Experience, *The Israel Medical Association Journal* (2007) 9:588–591
183. **Naehrig S, Chao C-M, Naehrlich L** Cystic Fibrosis., *Deutsches Ärzteblatt International* (2017) 114:564–574
184. **Naehrlich L, Burkhart M, Wosniok J** Deutsches Mukoviszidose-Register Berichtsband 2018, *Mukoviszidose eV & Mukoviszidose Institut GmbH* (2019) 1–45
185. **Naehrlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barben J, Bargoni J, Blankenstein O, Bremern W, Brunsmann F, Ellemunter H, Fusch C, Gembruch U, Hammermann J, Jacobeit J, Jung A** S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“ (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie, *AWMF online* (2013) 1–28
186. **Naehrlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Derichs N** Handlungsempfehlung nach der Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“, *Monatsschrift Kinderheilkunde* (2014) 162:723–724
187. **Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M** Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression., *Future Science OA* (2018) 4
188. **Newsome SJ, Daniel RM, Carr SB, Bilton D, Keogh RH** Investigating the effects of long-term dornase alfa use on lung function using registry data, *Journal of Cystic Fibrosis* (2018) 18:110–117

189. **Niederau C, Lange S, Frühauf M, Thiel A** Cutaneous signs of liver disease: value for prognosis of severe fibrosis and cirrhosis, *Liver International* (2008) 28:659–666
190. **Oppenheimer EH, Esterly JR** Hepatic changes in young infants with cystic fibrosis: Possible relation to focal biliary cirrhosis, *Journal of Pediatrics* (1975) 86:683–689
191. **Orasan OH, Ciulei G, Cozma A, Sava M, Dumitrascu DL** Hyaluronic acid as a biomarker of fibrosis in chronic liver diseases of different etiologies., *Clujul Medical* (2016) 89:24–31
192. **Pacifico L, Ferraro F, Bonci E, Anania C, Romaggioli S, Chiesa C** Upper limit of normal for alanine aminotransferase: Quo vadis?, *Clinica Chimica Acta* (2013) 422:29–39
193. **Pagliaro L, Rinaldi F, Craxi A, Di Piazza S, Filippazzo G, Gatto G, Genova G, Magrin S, Maringhini A, Orsini S, Palazzo U, spinello M, Vinci M** Percutaneous blind biopsy versus laparoscopy with guided biopsy in diagnosis of cirrhosis, *Digestive Diseases and Sciences* (1983) 28:39–43
194. **Palomaki GE, FitzSimmons SC, Haddow JE** Clinical sensitivity of prenatal screening for cystic fibrosis via CFTR carrier testing in a United States panethnic population., *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* (2004) 6:405–414
195. **Panteghini M** Aspartate aminotransferase isoenzymes, *Clinical Biochemistry* (1990) 23:311–319
196. **Parisi GF, Di Dio G, Franzonello C, Gennaro A, Rotolo N, Lionetti E, Leonardi S** Liver disease in cystic fibrosis: an update., *Hepatitis monthly* (2013) 13:e11215
197. **Pencharz PB, Durie PR** Pathogenesis of malnutrition in cystic fibrosis, and its treatment, *Clinical Nutrition* (2000) 19:387–394
198. **Peretti N, Marciel V, Drouin E, Levy E** Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency, *Nutrition & Metabolism* (2005) 2:1–18
199. **Pfaffl MW, Meyer HHD** Quantifizierung der mRNA-Expression von Kandidatengenen in Nutzieren mittels qRT-PCR 1 Einleitung, *Züchtungskunde* (2006) 78:440–450
200. **Pfyffer JX** Zitat, *Wörterbuch der Schweizerdeutschen Sprache* (1848) 7:899
201. **Del Poggio P, Colombo S** Is transient elastography a useful tool for screening liver disease?, *World Journal of Gastroenterology* (2009) 15:1409–1414
202. **Potter CJ, Fishbein M, Hammond S, McCoy K, Qualman S** Can the histologic changes of cystic fibrosis-associated hepatobiliary disease be predicted by clinical criteria?, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (1997) 25:32–36
203. **Pradere J-P, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF** Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis., *Seminars in Liver Disease* (2010) 30:232–344
204. **Quinton PM** Chloride impermeability in cystic fibrosis., *Nature* (1983) 301:421–422
205. **Quinton PM** Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective., *Physiological Reviews* (1999) 79:3–22
206. **Ranu H, Wilde M, Madden B** Pulmonary function tests., *The Ulster Medical Journal* (2011) 80:84–90
207. **Rath, Hage, Kugler, Menendez M, Zachoval, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E** Serum proteome profiling identifies novel and powerful markers of cystic fibrosis liver disease, *PLoS One* (2013) 8:e58955
208. **Rath T, Menendez KM, Kügler M, Hage L, Wenzel C, Schulz R, Graf J, Nährlich L, Roeb E,**

- Roderfeld M** TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease., *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* (2012) 44:780–787
209. **Rath T, Roderfeld M, Gler C, Wenzel C, Graf J, Beitinger F, Roeb E, Zachoval R, Guler C, Wenzel C, Graf J, Beitinger F, Roeb E, Zachoval R** YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* (2011) 46:1369–1380
210. **Rath T, Zwaschka L, Hage L, Kügler M, Menendez K, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E** Identification of Neutrophil Activation Markers as Novel Surrogate Markers of CF Lung Disease, *PLoS One* (2014) 9:e115847
211. **Rathcke CN, Vestergaard H** YKL-40--an emerging biomarker in cardiovascular disease and diabetes., *Cardiovascular Diabetology* (2009) 8:1–7
212. **Ratjen F, Döring G** Cystic fibrosis., *Lancet* (2003) 361:681–689
213. **Ratzu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel JF, Le Bail B, de Ledinghen V, Poynard T** Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease., *BMC Gastroenterology* (2006) 6:6
214. **Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pyrsopoulos NT, Feng Z-Z, Reddy KR, Schiff ER** Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection, *The American Journal of Gastroenterology* (2002) 97:2614–2618
215. **Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA., *Science (New York, NY)* (1989) 245:1066–1073
216. **De Ritis F, Coltorti M, Giusti G** An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: The transaminase serum activities, *Clinica Chimica Acta* (1957) 2:70–74
217. **Rock MJ, Hoffman G, Laessig RH, Kopish GJ, Litsheim TJ, Farrell PM** Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: nine-year experience with routine trypsinogen/DNA testing, *Journal of Pediatrics* (2005) 147:73–77
218. **Roderfeld M** Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis, *Matrix Biology* (2018) 68–69:452–462
219. **Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E** Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation, *Journal of Cystic Fibrosis* (2009) 8:338–347
220. **Roeb E** Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects), *Matrix Biology* (2018) 68–69:463–473
221. **Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB** Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Intracellular Processing, Trafficking, and Opportunities for Mutation-Specific Treatment, *Chest* (2011) 139:1480–1490
222. **Rokitansky K** *Handbuch der pathologischen Anatomie*, Braumuller & Seidel (1842) 2:654
223. **Rommens JM** Cystic Fibrosis Mutation Database Statistics, *CFTR Mutation Database Curator* (2011)

224. **Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping., *Science (New York, NY)* (1989) 245:1059–1065
225. **Rosenfeld M, Pepe MS, Longton G, Emerson J, FitzSimmons S, Morgan W** Effect of choice of reference equation on analysis of pulmonary function in cystic fibrosis patients., *Pediatric Pulmonology* (2001) 31:227–237
226. **Roth GA, Nickl S, Lebherz-Eichinger D, Schmidt EM, Ankersmit HJ, Faybik P, Hetz H, Krenn CG** Lipocalin-2 Serum Levels Are Increased in Acute Hepatic Failure, *Transplantation Proceedings* (2013) 45:241–244
227. **Rowe SM, Clancy JP, Wilschanski M** Nasal Potential Difference Measurements to Assess CFTR Ion Channel Activity, *Methods in Molecular Biology* (2011) 741:69–86
228. **Rowland M, Gallagher CG, O’Laoide R, Canny G, Broderick A, Hayes R, Greally P, Slattery D, Daly L, Durie P, Bourke B** Outcome in cystic fibrosis liver disease., *American Journal of Gastroenterology* (2011) 106:104–109
229. **Sadler MD, Crotty P, Fatovich L, Wilson S, Rabin HR, Myers RP** Noninvasive methods, including transient elastography, for the detection of liver disease in adults with cystic fibrosis., *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2015) 29:139–144
230. **Saint-Criq V, Gray MA** Role of CFTR in epithelial physiology., *Cellular and Molecular Life Sciences* (2017) 74:93–115
231. **Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph J-M, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R** Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis., *Ultrasound in Medicine & Biology* (2003) 29:1705–1713
232. **Sant’Agnese PA di, Darling RC** Electrolyte abnormalities of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas, *American Journal of the Medical Sciences* (1953) 225:67–70
233. **Schalm SW** The diagnosis of cirrhosis: clinical relevance and methodology, *Journal of Hepatology* (1997) 27:1118–1119
234. **Schiavon L de L, Narciso-Schiavon JL, de Carvalho-Filho RJ** Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C., *World Journal of Gastroenterology* (2014) 20:2854–2866
235. **Schirmacher P, Fleig WE, Tannapfel A, Langner C, Dries V, Terracciano L, Denk H, Dienes HP** Biopische Diagnostik der chronischen Hepatitis, *Der Pathologe* (2004) 25:337–348
236. **Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J** Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, *Journal of the American Society of Nephrology* (2007) 18:407–413
237. **Sebastiani G, Vario A, Guido M, Noventa F, Plebani M, Pistis R, Ferrari A, Alberti A** Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C, *Journal of Hepatology* (2006) 44:686–693
238. **Sermet-Gaudelus I, Roussel D, Bui S, Deneuve E, Huet F, Reix P, Bellon G, Lenoir G, Edelman A** The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of Cystic Fibrosis diagnosis in neonatal screening, *BMC Pediatrics* (2006) 6:25
239. **Shaheen AAM, Myers RP** Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: A systematic review,

- Hepatology (2007) 46:912–921
240. **Sharma GD, Haver K** Cystic Fibrosis: Practice Essentials, Background, Pathophysiology, Medscape (2018) 7
 241. **Siddique I, El-Naga HA, Madda JP, Memon A, Hasan F** Sampling variability on percutaneous liver biopsy in patients with chronic hepatitis C virus infection., Scandinavian Journal of Gastroenterology (2003) 38:427–432
 242. **Singh M, Rebordosa C, Bernholz J, Sharma N** Epidemiology and genetics of cystic fibrosis in Asia: In preparation for the next-generation treatments., Respirology (Carlton, Vic) (2015) 20:1172–1181
 243. **Sokol RJ, Durie PR** Recommendations for Management of Liver and Biliary Tract Disease in Cystic Fibrosis, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (1999) 1:1–13
 244. **Sommerburg O, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, Happich M, Kulozik AE, Stopsack M, Gahr M, Hoffmann GF, Mall MA** Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany., Pediatric Pulmonology (2015) 50:655–664
 245. **Stauber R** Nichtinvasive Diagnose der Leberfibrose bei chronischen Hepatopathien, Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen (2009) 7:12–17
 246. **Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, Sulkowski MS, Torriani FJ, Dieterich DT, Thomas DL, Messinger D, Nelson M** Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection, Hepatology (2006) 43:1317–1325
 247. **Stern M** Qualitätssicherung Mukoviszidose- Überblick über den Gesundheitszustand in Deutschland 1995, Zentrum für Qualitätsmanagement im Gesundheitswesen, Einrichtung der Ärztekammer Niedersachsen (1995) 17
 248. **Stern M, Ellemunter H, Palm B, Posselt H-G, Smaczny C** Mukoviszidose (Cystische Fibrose): Ernährung und exokrine Pankreasinsuffizienz, Leitlinien Kinder- und Jugendmedizin (2015) N17b.1-N17b.12
 249. **Stonebraker JR, Ooi CY, Pace RG, Corvol H, Knowles MR, Durie PR, Ling SC** Features of Severe Liver Disease With Portal Hypertension in Patients With Cystic Fibrosis, Clinical Gastroenterology and Hepatology (2016) 14:1207-1215.e3
 250. **Stuhrmann-Spangenberg M, Aulehla-Scholz C, Dworniczak B, Reiss J** Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose, Medizinische Genetik (2009) 21:268–275
 251. **Sultan S, Pascucci M, Ahmad S, Malik A, Bianchi A, Ramadori P, Ahmad G, Ramadori G** Lipocalin-2 Is a Major Acute-Phase Protein in a Rat and Mouse Model of Sterile Abscess, Shock (2012) 37:191–196
 252. **Sun J** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells., Journal of Signal Transduction (2010) 2010:985132
 253. **Tao H, Yang J-J, Shi K-H, Huang C, Zhang L, Lv X-W, Li J** The significance of YKL-40 protein in liver fibrosis, Inflammation Research (2014) 63:249–254
 254. **Thavorn K, Coyle D** Transient Elastography and Controlled Attenuation Parameter for

- Diagnosing Liver Fibrosis and Steatosis in Ontario: An Economic Analysis.,
Ontario Health Technology Assessment Series (2015) 15:1–58
255. **The French METAVIR Cooperative Study Group** Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology* (1994) 20:15–20
256. **Thierry Poynard** Diagnosis method of inflammatory, fibrotic or cancerous disease using the biochemical markers, Patent No US 6,631,330 B1, United States Patent (2003) 1–6
257. **Trude H. Flo, Kelly D. Smith, Shintaro Sato, David J. Rodriguez, Margaret A. Holmes, Roland K. Strong, Shizuo Akira** AA Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron, *Nature* (2004) 432:917–921
258. **Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N** Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker, *Science* (1985) 230:1054–1057
259. **Turck D, Braegger CP, Colombo C, Declercq D, Morton A, Pancheva R, Robberecht E, Stern M, Strandvik B, Wolfe S, Schneider SM, Wilschanski M** ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis, *Clinical Nutrition* (2016) 35:557–577
260. **Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F** Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans.,
Journal of Clinical Investigation (2010) 120:4065–4076
261. **Wai C, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS - F.** A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology* (2003) 38:518–526
262. **Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold., *The EMBO Journal* (1982) 1:945–951
263. **Wang X, Li Y, Gao S, Xia W, Gao K, Kong Q, Qi H, Wu L, Zhang J, Qu J, Bai C** Increased serum levels of lipocalin-1 and -2 in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.,
International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2014) 9:543–549
264. **Waugh N, Royle P, Craigie I, Ho V, Pandit L, Ewings P, Adler A, Helms P, Sheldon C** Screening for cystic fibrosis-related diabetes: a systematic review.,
Health Technology Assessment (2012) 16:1–179
265. **Weiß C** Basiswissen Medizinische Statistik, Springer-Lehrbuch (2013) 6:126
266. **Welsh J, Cutting M, Ramsey BW, Accurso F, R. G** The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, McGraw-Hill (1995) 21:3799–3876
267. **WHO Human Genetics Programme** The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis : report of a joint meeting of WHO/IECFTN/ICF(M)A/ECFS, (2002) 24
268. **Wiencek JR, Lo SF** Advances in the Diagnosis and Management of Cystic Fibrosis in the Genomic Era., *Clinical Chemistry* (2018) 64:898–908
269. **Williams AL, Hoofnagle JH** Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis., *Gastroenterology* (1988) 95:734–739

270. **Wilschanski M, Durie PR** Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene., *Gut* (2007) 56:1153–1163
271. **Wilschanski M, Rivlin J, Cohen S, Augarten A, Blau H, Aviram M, Bentur L, Springer C, Vila Y, Branski D, Kerem B, Kerem E** Clinical and genetic risk factors for cystic fibrosis-related liver disease., *Pediatrics* (1999) 103:52–57
272. **Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, Corey M, Levison H, Durie PR** Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations., *Journal of Pediatrics* (1995) 127:705–710
273. **Witters P, De Boeck K, Dupont L, Proesmans M, Vermeulen F, Servaes R, Verslype C, Laleman W, Nevens F, Hoffman I, Cassiman D** Non-invasive liver elastography (Fibroscan) for detection of cystic fibrosis-associated liver disease, *Journal of Cystic Fibrosis* (2009) 8:392–399
274. **Wong JB, Koff RS** Watchful Waiting with Periodic Liver Biopsy versus Immediate Empirical Therapy for Histologically Mild Chronic Hepatitis C: A Cost-Effectiveness Analysis, *Annals of Internal Medicine* (2000) 133:665
275. **Wunderlich P, Stopsack M, Paul K-D, Rösen-Wolff A** Mukoviszidose-Screening bei Neugeborenen im Regierungsbezirk Dresden, *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2000) 125:1356–1362
276. **Xiao R, Chen R** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential novel biomarker for ventilator-associated lung injury., *Molecular Medicine Reports* (2017) 15:3535–3540
277. **Xu S, Venge P** Lipocalins as biochemical markers of disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* (2000) 1482:298–307
278. **Yokuş O, Gedik H** Etiological causes of pancytopenia: A report of 137 cases., *Avicenna Journal of Medicine* (2016) 6:109–112
279. **Yoshikawa K, Iwasa M, Eguchi A, Kojima S, Yoshizawa N, Tempaku M, Sugimoto R, Yamamoto N, Sugimoto K, Kobayashi Y, Hasegawa H, Takei Y** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin level is a prognostic factor for survival in rat and human chronic liver diseases., *Hepatology Communications* (2017) 1:946–956
280. **Zabransky S, Zink S** IRT-Bestimmung in Vollblutproben getrocknet auf Filterpapier als Suchtest auf Cystische Fibrose. In: *Screening auf angeborene endokrine und metabolische Störungen*, Springer (2001) 269–296
281. **Zakhary SM, Torres G, Hobeika P, Hikin D** Adult-onset cystic fibrosis in an African-American male., *Radiology Case Reports* (2011) 6:500
282. **Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet J-C, Beaugrand M** Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology* (2005) 41:48–54
283. Report of the committee for a study for evaluation of testing for cystic fibrosis., *Journal of Pediatrics* (1976) 88:711–750

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 dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Anhänge

Anhang 1: Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen. AZ: 75/09

17/11/2015 08:24 Sek. Prof Roeb Gastroenterologie

(FAX)+49 641 985 42339 P.001/015

JUSTUS-LIEBIG

FACHBEREICH 11



MEDIZIN

Ethik-Kommission, Gaffkystr. 11c, D-35385 Gießen

ETHIK-KOMMISSION
 am Fachbereich Medizin
 Vorsitz: Prof. Dr. K.L. Schmidt

 Frau
 Prof. Dr. E. Roeb
 Med. Klinik und Poliklinik II
 Klinikstraße 36
 35385 Gießen

 Gaffkystr. 11c
 D-35385 Gießen
 Tel.: (0641)99-42470 / 47660
 ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de

 Gießen, 30. Juni 2009
 Dr. Kr./erb

AZ.: 75/09

 Titel: *Früherkennung und Verlauf der Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten und anderen chronischen Lebererkrankungen mittels Elastographie (Fibroscan).*

Sitzung am 04.06.2009

Sehr geehrte(r) Antragsteller/Antragstellerin,

wir bedanken uns für die Vorstellung Ihres Forschungsprojektes. Im Folgenden erhalten Sie das Votum der Gießener Ethik-Kommission zur oben genannten Studie:

- Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP)
- Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung
- Eingesandte Unterlagen:
- Formalisierter Antrag
 - Ausführliche Darstellung des Vorhabens
 - Patienteninformation und -Einwilligungserklärung
 - Abteilungsleiterhaftpflicht

Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ICH-GCP) erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt. Sie stimmt dem Vorhaben zu. Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2). Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2).

Die Ethik-Kommission erwartet, dass Ihr bis 31.12.11, ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem (roten) Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Auszug aus dem Protokoll der Kommissionsitzung vom 04.06.2009:

Frau Prof. Dr. Roeb trägt vor. Hintergrund: Während die bisher einzige weitgehend zuverlässige Methode, das Ausmaß einer Leberschädigung abzuschätzen, die Leberpunktion und die daran sich anschließende feingewebliche Untersuchung des gewonnenen Lebergewebes war, steht seit Juli 2005 ein neues, auch als Elastometrie bezeichnetes Verfahren zur Verfügung, welches eine nicht invasive und schmerzfreie Abschätzung des Ausmaßes narbiger Umbauprozesse erlaubt. Die Leberelastizität wird als Maß der Verformbarkeit des Lebergewebes erfasst. Dies geschieht ambulant und nicht invasiv über einen speziellen Schallkopf, der einen 50 Hz-Vibrator enthält, der mit einem Ultraschallkopf gekoppelt ist. Dadurch kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit der niederfrequenten Impulswelle im Lebergewebe mittels des integrierten Ultraschalls gemessen werden; je fester und unelastischer das Lebergewebe ist, desto schneller laufen die niederfrequenten Wellen hindurch und verformen hierbei das Gewebe. Soweit bisher zu beurteilen erlaubt das neue Verfahren die Diagnose einer Leberzirrhose mit einer Sensitivität von 77 bis 100% und einer Spezifität von 98 bis 100%.

Primäres Studienziel des vorgestellten Projektes ist die Langzeitbeobachtung chronisch leberkranker Patienten, insbesondere von Mucoviszidose-Patienten, zur nicht invasiven Früherkennung einer Leberfibrose und -zirrhose; sekundäre Studienziele sind die Beurteilung von Serummarkern zur Früherkennung und deren eventuelle Korrelation mit der Elastographie. Es werden Patienten im Alter von 0-99 Jahren mit gesicherter Mucoviszidose eingeschlossen sowie mit gesicherten anderen Lebererkrankungen und solchen Leberleiden, die wahrscheinlich auch zu einer Leberfibrose führen. Zu den Serumparametern gehören verschiedene Metalloproteinasen, Alpha2-Makroglobulin, Hyaluronsäure, Prokollagen-III-Peptid u.a. Es handelt sich um eine ausgesprochene Langzeitstudie über 5 Jahre.

Die Kommission stimmt dem Vorhaben zu mit der ausdrücklichen Bitte, die Patienteninformation zu überarbeiten. Die Formulierungen „ist aufgeklärt worden“, „ist relativ ungefährlich“, „gesonderte Aufklärung“ sind widersprüchlich; da bereits bei den Mucoviszidose-Patienten in der Kinderklinik eine ausführliche Aufklärung durchgeführt wird, wäre eine nochmalige erforderlich. Kinder in einem Alter ab 14, erst recht ab 15 Jahren müssen direkt selbst informiert werden und auch unterschreiben, die gesetzlichen Vertreter müssen beide zusammen unterschreiben. Wichtig seien auch Hinweise, ob zusätzliche studienbedingte Blutentnahmen nötig seien, wieviel Blut abgenommen wird, warum dies erforderlich sei. Bei rein studienbedingten Blutentnahmen müssen auch die Risiken geschildert werden. Es wird auf die im Internet von unserer Ethik-Kommission publizierten Muster-Aufklärungstexte verwiesen. Die Formulierung „kleine Menge Serum“ sollte durch den Begriff „Blutentnahme“ ersetzt werden.

Anmerkung: Die Patienteninformation wurde inzwischen modifiziert.

Wir wünschen Ihnen für Ihr Forschungsprojekt viel Erfolg.



Prof. Dr. K. L. Schmidt
Vorsitzender

Die Namen der bei dieser Sitzung anwesenden Mitglieder sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Mitglieder: Frau Dr. Bülters-Sawatzki (Pädiatrie); Dr. Bödeker (Informatik); Herr Brunhard (Pharmazie); Prof. Dr. Dettmeyer (Rechtsmedizin); PD Dr. Gödicke (Bürgerliches Recht); Prof. Linn (Innere Medizin); Dr. Repp (Pharmakologie); Prof. Schmidt, Vorsitzender, (Rheumatologie); Prof. Schwemmlé, stv. Vorsitzender (Chirurgie); Prof. Rißé (Rechtsmedizin).

Vertreter: Prof. Dreyer (Pharmakologie); Prof. Dudeck (Informatik); Prof. Federlin, (Innere Medizin); Prof. Schapp (Bürgerliches Recht); Frau Prof. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzpel (Gynäkologie); Prof. Lasch (Innere Medizin); Prof. Weller (Rechtsmedizin).

P.S.: Bitte informieren Sie die Ethik-Kommission unter Benutzung des beigefügten Formulars über den Beginn der Studie!

Anhang 2: Patienteninformation zur Studie und Einwilligungserklärung



Justus-Liebig
Universität Giessen
Standort Giessen

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

UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIESSEN UND MARBURG



Philipps-Universität
Marburg

Patienteninformation zur Studie

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

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

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

JUSTUS-LIEBIG-



FACHBEREICH
MEDIZIN



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

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