

**Transiente Elastographie und Fibrosemarker ermöglichen die  
Diagnose einer Leberbeteiligung bei pädiatrischen  
Mukoviszidosepatienten**

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

vorgelegt von  
Marion Uta Kügler  
aus Annaberg-Buchholz

Gießen 2016

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

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer

Tag der Disputation: 11.07.2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Allgemeines .....	1
1.2 Ziel der Arbeit .....	2
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	3
2.1 Mukoviszidose .....	3
2.1.1 Genetische Grundlagen .....	3
2.1.2 Epidemiologie .....	5
2.1.3 Klinik .....	5
2.1.4 Diagnostik .....	6
2.1.5 Therapie .....	7
2.1.6 Prognose .....	9
2.2 Leberbeteiligung in der Mukoviszidose .....	9
2.2.1 Häufigkeit .....	9
2.2.2 Ätiologie und Pathogenese .....	10
2.2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung einer CFLD .....	14
2.2.4 Klinik .....	16
2.2.5 Diagnostik .....	18
2.2.5.1 Etablierte Diagnostik .....	18
2.2.5.2 Neue nicht-invasive Diagnoseverfahren .....	22
2.2.6 Therapie .....	23
2.3 Transiente Elastographie .....	26
2.3.1 Aufbau des Gerätes .....	26
2.3.2 Funktionsweise des Gerätes .....	27
2.4 Biomarker als Laborparameter für den Nachweis einer Leberfibrose .....	29
2.4.1 Matrixmetalloproteinasen .....	30
2.4.2 Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen .....	31
2.4.3 Hyaluronsäure .....	32
2.4.4 Prokollagen III .....	32
2.4.5 YKL-40 .....	33
2.4.6 M30 .....	34
2.4.7 M65 .....	34
<b>3. Material und Methoden</b> .....	35
3.1 Patienten .....	35
3.1.1 Aufklärung der Patienten .....	36
3.1.2 Besonderheiten bei pädiatrischen Patienten .....	36

3.2 Geräte und Materialien.....	36
3.2.1 Geräte.....	36
3.2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	37
3.2.3 Verbrauchsmaterialien.....	38
3.2.4. kommerzielle ELISA-Kits .....	38
3.3 Methoden .....	39
3.3.1 Transiente Elastographie (TE).....	39
3.3.2 Klinische Routinelaborparameter .....	40
3.3.3 Bestimmung von Biomarkern zum Nachweis einer Leberfibrose mittels ELISA .....	40
3.3.3.1 Der Sandwich-ELISA.....	40
3.3.3.2 Kompetitiver ELISA .....	41
3.3.4 Ethikvotum.....	41
3.3.5 Statistische Analyse .....	41
<b>4. Ergebnisse und Auswertung.....</b>	<b>43</b>
4.1 Patientencharakteristika .....	43
4.2 Erhöhte Lebersteifigkeit bei pädiatrischen CF-Patienten mit Leberbeteiligung ..	45
4.3 Expression von Fibrose-Biomarkern bei CF-Patienten mit Leberbeteiligung .....	46
4.4 Diagnostische Aussagekraft von TE und Fibrose-Biomarkern zur Feststellung einer Leberbeteiligung bei CF .....	53
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>56</b>
5.1 Transiente hepatische Elastographie .....	57
5.2 Fibrosemarker im Serum.....	58
5.2.1 Die Marker MMPs und TIMPs .....	59
5.2.2 Der Marker YKL-40 .....	61
5.2.3 Weitere Fibrose-Biomarker .....	63
5.3 Kombinierte diagnostische Ansätze .....	67
5.4 Limitationen der Studie.....	67
5.4.1 Die Leberbiopsie vs. Ultraschall (Standard) vs. TE.....	68
5.4.2 Die Herangehensweise bei Studien innerhalb und außerhalb Europas .....	68
5.4.3 Limitationen der TE .....	70
5.5 Prävalenz und Inzidenz der CFLD in den verschiedenen Studien .....	71
5.5.1 Prävalenz der CFLD in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht in einzelnen Studien .....	71
5.5.2 Herangehensweisen bei der Diagnosefindung CFLD im Vergleich.....	72
5.6 Ausblick.....	75
<b>6. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>77</b>

<b>7. Zusammenfassung</b> .....	78
<b>8. Summary</b> .....	79
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	80
<b>10. Darstellungsverzeichnis</b> .....	82
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	82
10.2 Tabellenverzeichnis.....	84
<b>11. Literaturverzeichnis</b> .....	85
<b>12. Publikationsverzeichnis</b> .....	121
<b>13. Anhang</b> .....	123
13.1 Einwilligungserklärung der Patienten zur Teilnahme an der Studie .....	123
13.2 Patienteninformation .....	124
13.3 Ethikvotum.....	125
13.4 Urkunde zur Durchführung der TE .....	126
13.5 Durchführung des ELISA exemplarisch für TIMP-1 .....	127
<b>14. Erklärung zur Dissertation</b> .....	130
<b>15. Danksagung</b> .....	131

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Die Mukoviszidose, auch zystische Fibrose (engl.: cystic fibrosis) (CF) genannt, ist eine genetisch bedingte autosomal-rezessive angeborene Stoffwechselerkrankung [An 1946], [He 2010]. Der Begriff Mukoviszidose besteht aus folgenden Bestandteilen: Mu-ko- (lat. mucus – Wortbildungselement mit der Bedeutung „Schleim“), -viszi- (lat. viscidus – „zähflüssig, klebrig“) und -ose (teilweise über neulat. –osis aus griech. –ōsis: Endung weiblicher Substantive aus Medizin und Biologie mit der Bedeutung „krankhafter Zustand, Erkrankung“) [Du 1994]. Das Krankheitsbild Mukoviszidose wurde erstmals 1938 als eigenständiges klinisches Syndrom beschrieben, indem es vom Krankheitsbild der Zöliakie differenziert wurde [An 1938].

Der genetische Defekt, der dieser Krankheit zugrunde liegt, besteht in einem mutierten Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Gen. Dieses Gen kodiert einen Chloridkanal. Durch die genetische Mutation kommt es zur Ausbildung eines defekten Chloridkanals in allen exokrinen Drüsen. Von diesem genetischen Defekt sind hauptsächlich Lunge, Pankreas, Darm und Leber betroffen. Ein Teil der betroffenen Patienten entwickelt im Verlauf der CF eine Leberbeteiligung in Form einer Leberfibrose, die zu einer fokal biliären Zirrhose (FBC) und später zu einer multilobulären biliären Zirrhose (MBC) fortschreiten kann. Diese sogenannte CFLD (Cystic Fibrosis Liver Disease) entwickelt sich meist im Laufe von Jahren oder Jahrzehnten. Um die Progression von Fibrose zu Zirrhose aufzuhalten, ist es notwendig, betroffene Patienten möglichst früh zu identifizieren.

Zur Diagnostik einer Leberbeteiligung existiert noch keine einheitliche Herangehensweise. Der Goldstandard zur Diagnose einer Leberfibrose besteht grundsätzlich in der Leberbiopsie [Sch 2004]. Da allerdings die Form der Fibrose bei CF eher fokaler Natur ist, wird die Leberbiopsie bei CF kontrovers diskutiert. Wenn es sich bei den betroffenen Patienten darüber hinaus um Kinder handelt, muss das Risiko-Nutzen-Verhältnis bzw. die Zumutbarkeit noch intensiver abgewogen werden. Aufgrund dieser Gesichtspunkte wurde begonnen, nach nicht-invasiven Verfahren zu suchen, die ebenso gut in der Lage sind, eine Leberbeteiligung zu verifizieren. Eines dieser Verfahren, das zurzeit evaluiert wird [Fr 2007], [Fr 2008], ist die transiente Elastographie (TE). Dabei handelt es sich um ein ultraschallbasiertes Verfahren zur Messung der Lebersteifigkeit, aus deren Höhe die Konsistenz des Lebergewebes abgeleitet werden

kann. Je härter das Gewebe, desto wahrscheinlicher ist eine Leberfibrose oder gar -zirrhose.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, anhand von Parametern, die im Serum der Patienten bestimmt werden, indirekt auf eine Fibrose der Leber zu schließen [Sc 1999]. Experimentell sind bereits sogenannte Fibrose-Biomarker in der Erforschung wie z.B. Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Chitinase-3-like Protein 1, auch Cartilage Glycoprotein 39 oder YKL-40 genannt, oder die Inhibitoren der MMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases - TIMPs), TIMP-1 und -2.

### 1.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser vorliegenden Doktorarbeit ist es, ein nicht-invasives Verfahren zur Identifizierung einer Leberbeteiligung bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten zu evaluieren und mittels Bestimmung von Routinelaborparametern und Fibrose-Biomarkern Erkenntnisse über das Vorliegen einer Leberbeteiligung bei CF-Patienten zu gewinnen. Da es bisher an nicht-invasiven Verfahren zur Erkennung einer Lebererkrankung unter anderem auch bei Patienten mit zystischer Fibrose mangelt, ist das Ziel, die nicht-invasive Diagnostik zur Identifizierung von Lebererkrankungen zu verbessern.

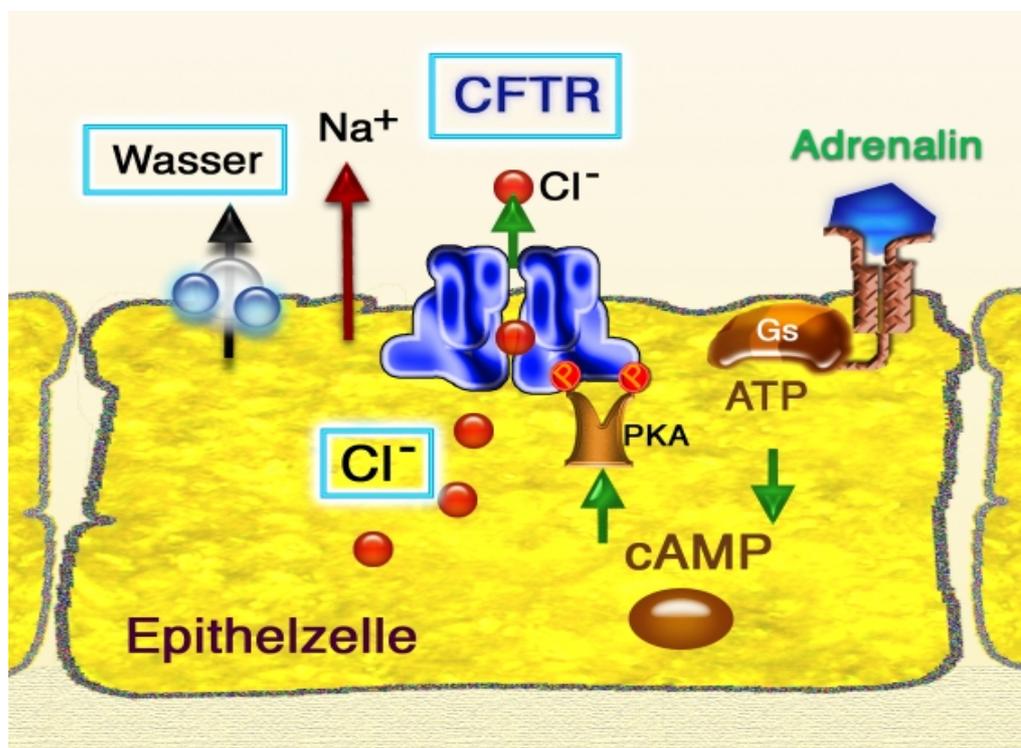
1. Zunächst sollte mit Hilfe der transienten Elastographie (Fibroscan®, Echosens Paris) die Evaluierung der Lebersteifigkeit erfolgen. Die Evaluierung sollte an pädiatrischen Mukoviszidosepatienten vorgenommen werden.
2. Außerdem sollten mittels ELISA-Messungen verschiedene Fibrose-Biomarker wie MMP-1, -2, -8, -9 und -13, TIMP-1 und TIMP-2, MMP-9/TIMP-1-Komplex, Hyaluronsäure, Prokollagen III, YKL-40, M30 und M65 im vorliegenden pädiatrischen Patientenkollektiv bestimmt werden.
3. Darüber hinaus sollte die diagnostische Aussagekraft bzw. der diagnostische Nutzen der einzelnen Komponenten wie TE und Fibrose-Biomarker evaluiert werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Mukoviszidose

#### 2.1.1 Genetische Grundlagen

Der autosomal-rezessive Erbgang, der der CF zugrunde liegt, wurde 1946 entdeckt [An 1946]. 1983 folgte die Identifizierung des Chloridtransportes als grundlegender Defekt bei CF. 1985 identifizierte man den langen Arm des Chromosoms 7 als Sitz des Gendefektes [Kn 1985]. Die zystische Fibrose ist eine komplexe Erbkrankheit, die sich durch die Mutation in einem CFTR-Gen auszeichnet. Dieses Gen kodiert für einen Chloridkanal. Die Klonierung des betreffenden Gens gelang 1989. Damit wurde der grundlegende Defekt im cAMP-abhängigen Chloridkanal aufgezeigt.



**Abb. 1:** Der CFTR-Kanal (nach <http://pflege-und-medizin.de/Atmung/Mucoviszidose/muc.jpg>) (letzter Zugriff: 19.10.2015) [pf 2015] (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Volker Schmieden)

Durch das Fehlen oder die Fehlfunktion dieses Chloridkanals kommt es zu einem Defizit an intraluminalen Wasser und dadurch zu einer Akkumulation eines dicken und hochviskosen Schleims sowie zur Obstruktion der exokrinen Drüsen [Co 2006]. Die autosomal-rezessive Erkrankung besitzt einen hochvariablen Genotyp, Phänotyp und ein hochvariables klinisches Erscheinungsbild [Co 2007].

Das CFTR-Gen auf dem Chromosom 7 hat eine Länge von 250 kB und kodiert ein Protein aus 1480 Aminosäuren, CFTR [Ke 1989], [Cy 1993], [Wi 1995], [And 1991]. Dieses Protein besteht aus zwei transmembranären Domänen, aus zwei nukleotid-bindenden Domänen [He 2010] und aus einer einzigen regulatorischen Domäne, welche als ein cAMP-abhängiger Chloridkanal fungiert [Fer 2001], [He 2010]. Infolgedessen gehört CFTR zur Familie der ATP-binding cassette (ABC) Transporter (Unterfamilie C, Nummer 7; ABCC7) [He 2010], [Row 2005].

CFTR ist auf der apikalen Membran von sekretorischen und absorbierenden Epithelzellen lokalisiert. Betroffen sind überwiegend die exokrinen Drüsen von Lunge, paranasalen Sinus [Bo 2007], [nl 2012], Pankreas und Darm, genauso wie die Schweißgänge, Gallengänge und die Samenleiter bei Männern [Wi 2008], [He 2010], [Ke 1989], [Ri 1989], [Rom 1989]. Außerdem ist CFTR für die Aufrechterhaltung der Flüssigkeitsbilanz über den Epithelzellen verantwortlich [Co 2006].

Im Jahr 2000 sind mehr als 850 verschiedene Allele, die der Krankheit zugrunde liegen, und im Jahr 2008 1.500 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens beschrieben worden [Zi 2000], [Far 2008]. Bis heute sind bereits mehr als 1.900 Mutationen des CFTR-Gens bekannt (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>).

Das häufigste von mehr als 1.000 verursachenden Allelen entspricht einer spezifischen Deletion von drei Basenpaaren im Exon 10, die zu einem Verlust der Aminosäure Phenylalanin in Position 508 des Produktes des CF-Gens führt. Diese Mutation ( $\Delta F508$ ) macht 70% aller bekannten Mutationen aus [Ke 1989], [Cy 1993], [Wi 1995], [And 1991], [Fer 2001].

Des Weiteren werden die Mutationen in sechs verschiedene Klassen eingeteilt, um den Genotyp besser dem Phänotyp zuordnen zu können. Diese Einteilung richtet sich nach den molekularen und funktionellen Konsequenzen, die durch die Mutation entstehen und damit durch den Defekt im CFTR ausgelöst werden. Bei Klasse-I-Mutationen wird entweder keine CFTR-mRNA oder kein funktionelles CFTR-Protein gebildet wie bei Nonsense- und Frameshiftmutationen oder bei Mutationen an den Spleißstellen. Bei Mutationen der Klasse II wie z.B. die Mutation  $\Delta F508$  wird CFTR-mRNA hergestellt, aber es entsteht ein fehlgefaltetes Protein, welches intrazellulär abgebaut wird und somit nicht zur apikalen Seite der Zellmembran transportiert werden kann. Klasse-III-Mutationen stellen einen Regulationsdefekt dar. Es entsteht ein Rezeptor, der in die apikale Zellmembran eingebaut wird. Dieser reagiert allerdings nicht auf die cAMP-

Stimulation. Bei der Klasse-IV-Mutation handelt es sich um einen Kanaldefekt. Hier wird ein Protein mit gestörter Funktion hergestellt, woraus eine abnormale Anionenleitfähigkeit folgt. Bei Klasse-V-Mutationen wird nur eine reduzierte Anzahl an Rezeptoren hergestellt und an der apikalen Seite der Membran eingebaut. Die reduzierte Anzahl an Rezeptoren kommt entweder durch eine zu geringe Synthese oder durch eine defekte Prozessierung der CFTR-mRNA zustande. Klasse-VI-Mutationen kommen dadurch zustande, dass durch den vorzeitigen Abbruch des C-Terminus von CFTR ein funktionelles aber instabiles Protein hergestellt wird [Wi 1995], [Wi 2008].

### 2.1.2 Epidemiologie

Mit einer Häufigkeit von 1:2.500 - 1:3.000 Neugeborenen weltweit ist die CF die häufigste bekannte genetische Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung [Wi 2008], [Co 2006], [Co 2007], [He 2010]. Die Frequenz der verschiedenen Mutationen variiert signifikant zwischen den einzelnen ethnischen Bevölkerungsgruppen [Mo 2009].

### 2.1.3 Klinik

Das Krankheitsbild CF stellt ein klinisches Syndrom dar, da multiple Organsysteme Pathologien durch den Defekt im CFTR-Gen aufweisen [Da 2006], [Wi 2008]. Aufgrund der in vielen Epithelien vorkommenden Expression von CFTR gestaltet sich das klinische Erscheinungsbild vielfältig. Die Ausprägung der CF ist zum Teil abhängig von der Art der Mutation, die der Patient aufweist [Wi 2008]. Die Expression des Phänotyps ist sehr heterogen, im Hinblick auf das Ausmaß der Krankheit und die beteiligten Organe [Co 2007].

Der Defekt im CFTR-Gen kann zu einer erhöhten Chloridkonzentration im Schweiß, zu einer Lungenerkrankung durch bakterielle Infektionen und Bronchiektasen, zu Pankreasinsuffizienz, Darmobstruktion, biliärer Zirrhose und kongenitalem bilateralem Verkleben der Vas deferens führen. Häufig treten diese Auffälligkeiten in Kombination auf [Ke 1989], [Ri 1989]. Die meisten Manifestationen der CF sind bezogen auf die Unfähigkeit des Drüsenganglumens, Makromoleküle adäquat zu hydratisieren, was die Bildung von viskösem Schleim und eine Verstopfung der Drüsengänge zur Folge hat [Fer 2001].

Erste Symptome können schon bei Neugeborenen auftreten. Dazu zählen u.a. verzögerte Gewichtszunahme, verlangsamtes Wachstum (auch im Verlauf der weiteren Kindheit), keine Stuhlgänge in den ersten 24-48 Lebensstunden und salzig schmeckende Haut. Des Weiteren können Symptome im Zusammenhang mit der Darmtätig-

keit auftreten. Diese beinhalten Gewichtsabnahme, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Bauchschmerzen durch schwere Darmträgheit, gesteigerte Gasbildung und Blähungen (geschwollenes, geblähtes Abdomen) und übelriechende farblose oder lehmfarbige Stühle mit Schleim oder auch als Diarrhoe. In der Lunge und den Nasennebenhöhlen (NNH) können folgende Symptome auftreten: Husten oder vermehrter Schleim in Lunge und NNH, Müdigkeit, nasale Polypen, rezidivierende Pneumonien (Fieber, vermehrter Husten, vermehrte Atemnot, Appetitverlust, vermehrtes Sputum), Schmerzen oder Druck über den NNH aufgrund von Infektion oder Polypen. Später werden meist noch weitere Symptome beobachtet wie Infertilität bei Männern, rezidivierende Pankreatitiden und respiratorische Symptome [nl 2012].

Mögliche Komplikationen der CF sind sehr vielfältig. Die häufigste stellt die chronische respiratorische Infektion dar, gefolgt von intestinalen Problemen wie Gallensteine, intestinale Obstruktion und Rektalprolaps, Hämoptysen, chronisch respiratorische Insuffizienz, Diabetes mellitus, Infertilität, Leberbeteiligung oder auch Leberinsuffizienz (biliäre Zirrhose), Pankreatitis, Malnutrition, nasale Polypen und Sinusitis, Osteoporose und Arthritis, rezidivierende Pneumonien, Pneumothorax und Cor pulmonale [nl 2012].

#### 2.1.4 Diagnostik

1953 wurde der Defekt in der Elektrolytzusammensetzung des Schweißes entdeckt [Dis 1953], woraufhin 1959 ein diagnostischer Test, der Schweißtest, unter Nutzung der Pilocarpin-Iontophorese Technik entwickelt wurde. Dieser Test arbeitet mit der erhöhten Chloridkonzentration im Schweiß und man konnte nun auch mildere Fälle von CF z.B. bei Patienten ohne Pankreasinsuffizienz identifizieren [Gi 1959]. Man stellte die Diagnose CF bei einer Chloridkonzentration im Schweiß von 60 mVal/l oder höher und einem Geschwister oder einem Cousin ersten Grades mit CF oder bei einer Lungenerkrankung mit passendem klinischen Bild oder bei Pankreasinsuffizienz [Da 1984]. Um die Aussagefähigkeit des Schweißtestes zu erhöhen, sollte dieser nur in Funktionslaboren durchgeführt werden, die dafür standardisiert sind. Zudem sollte dieser Test grundsätzlich wiederholt werden, wobei zu beachten ist, dass erst zwei positive Testergebnisse die Diagnose rechtfertigen. Darüber hinaus wurden altersspezifische Referenzintervalle für die Chloridwerte im Schweiß etabliert, wodurch die Aussagekraft für die Diagnose von CF weiter verbessert werden konnte [Mi 2008].

Einige CF-Patienten weisen normale Chloridkonzentrationen im Schweiß auf. Bei diesen muss eine umfangreichere Diagnostik betrieben werden wie z.B. der Test auf Azoospermie bei Männern (fast alle männlichen CF-Patienten leiden an Azoospermie),

die Untersuchung der Funktion von Leber und Gallenblase, die Identifizierung einer Pansinusitis, die Nachweise von intestinaler Obstruktion oder Messung der nasalen Potentialdifferenz (NPD) [Ste 1982]. Im Jahr 1981 wurde nachgewiesen, dass die NPD bei Patienten mit CF im Vergleich von gesunden und erkrankten Kontrollpersonen gestört ist. Es wurde festgestellt, dass die Natriumreabsorption einen festen Bestandteil der CF-Erkrankung darstellt [Kno 1981]. Die NPD-Messung kann daher als klinischer Test verwendet werden. Patienten mit CF haben eine erhöhte Natriumreabsorption und eine reduzierte Chloridsekretion als Reaktion auf die cAMP-Stimulation.

Seit der Entdeckung des CF-Gens 1989 [Ke 1989], [Ri 1989], [Rom 1989] besteht die Möglichkeit, die Diagnose mit Hilfe der direkten Identifizierung von zwei mutierten CF-Allelen zu stellen. Es gibt kommerzielle Tests für die 86 häufigsten Allele. Ca. 93 % der CF-Patienten können damit identifiziert werden. Des Weiteren ist in vielen Ländern ein Neugeborenencreening zur frühzeitigen Diagnose von CF etabliert [Com 2007]. Bei diesem Screening werden immunreaktive Trypsinwerte im Blut gemessen, das direkt nach der Geburt abgenommen wird. Diese Werte sind bei Patienten mit CF erhöht [Dav 1984]. Um falsch positive Messungen auszuschließen, wird bei einem positiven Test auch ein Screening auf CF-Mutationen oder ein zweiter immunreaktiver Trypsintest durchgeführt. Die definitive Diagnose kann indes nur mittels Schweißtest oder Identifizierung zweier mutierter Allele gestellt werden [Da 2006].

Um die Diagnose möglichst sicher und genau stellen zu können, sollte eine Kombination aus den genannten diagnostischen Tests verwendet werden [Cast 2009].

### 2.1.5 Therapie

Eine frühzeitige Diagnose der CF und ein umfangreicher Therapieplan können das Überleben und die Lebensqualität verbessern [nl 2012]. Seit Mitte der 1950er Jahre werden CF-Patienten in spezialisierten Zentren behandelt um eine bessere Betreuung und Therapie zu ermöglichen [Da 2006]. Im Jahr 1964 wurde eine aus drei Säulen bestehende Behandlung der CF etabliert: ausreichende Ernährung, Linderung der Atemwegsobstruktion und antibiotische Therapie von Lungeninfektionen [Ma 1964], [Da 2006]. Dadurch verbesserten sich die Lebenserwartung und die Lebensqualität der Patienten. Bis heute ist eine aggressive Therapie das Grundprinzip der Behandlung.

Im Jahr 1955 wurde die „Cystic Fibrosis Foundation“ gegründet. Es wurde ein Netzwerk aus spezialisierten Zentren aufgebaut um eine evidenzbasierte Betreuung der Patienten in hoher Qualität zu gewährleisten [Da 2006]. In diesen Zentren erfolgt eine

interdisziplinäre Therapie durch Spezialisten, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass zahlreiche Organe der Patienten von der Krankheit beeinträchtigt werden [Da 2006]. Verlaufskontrolle und Überwachung sind sehr wichtig. CF-Patienten sollten in spezialisierten Zentren für Kinder bzw. für Erwachsene betreut werden.

Derzeit werden folgende Therapiemöglichkeiten vorgenommen: zur Behandlung der Lunge werden Antibiotika per os, intravenös oder per inhalationem zur Prävention und Therapie von Lungen- und NNH (Nasennebenhöhlen) -Infektionen verabreicht. Des Weiteren verwendet man inhalative Medikamente zur Öffnung der Atemwege, das Enzym DNase um den Schleim zu verdünnen und zur Erleichterung des Abhustens und hypertonsche Salzlösungen. Darüber hinaus sollten CF-Patienten jährlich gegen Grippe und Pneumokokken geimpft werden. Weitere Optionen sind, wenn notwendig, die Sauerstofftherapie und eine Lungentransplantation. Zur Lockerung des Schleims werden auch verschiedene physiotherapeutische Behandlungen durchgeführt. Zur Therapie der Darm- und ernährungsbedingten Probleme werden Pankreasenzyme sowie Vitamine (besonders Vitamin A, D, E und K) zugeführt. Darüber hinaus kommt eine spezielle proteinreiche und hochkalorische Diät zur Anwendung [nl 2012].

CF-Patienten müssen auch in ihrem persönlichen Umfeld einiges beachten. Es sollten Rauch, Staub, Schmutz und weitere Luftunreinheiten vermieden werden. Mehrfach am Tag muss mit Hilfe von Inhalation, Vibration und Abklopfen der Brust und weiteren Verfahren eine Reinigung der Atemwege und ein Abhusten des Schleims erfolgen, es muss reichlich Flüssigkeit zugeführt werden und es sollte zwei bis drei Mal in der Woche Ausdauersport betrieben werden, wie Laufen, Schwimmen oder Radfahren [nl 2012].

Durch das heutzutage verbesserte Verständnis der zugrunde liegenden Pathologie der CF ist die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien möglich. Diese zielen auf die Korrektur des zugrunde liegenden Defekts im CFTR-Protein oder die Verbesserung der Effekte der gestörten CFTR-Funktion ab. Dabei werden drei Herangehensweisen verfolgt:

1. pharmakologische Verhinderung des CF-abhängigen Ionentransportdefektes mit Hemmung der exzessiven Natriumreabsorption und steigender Chloridsekretion;
2. Nutzung allelspezifischer Therapien um spezifische Defekte der mutierten Form von CFTR zu korrigieren wie bei Medikamenten, die die Herstellung von  $\Delta F508$  verbessern oder bei Medikamenten, die frühere Stopcodons fördern und

3. Nutzung von Gentherapie, indem eine normale Kopie des CF-Gens in die jeweiligen Zellen eingebracht wird [Da 2006].

Derzeit befinden sich einige neue Medikamente zur Behandlung von CF in Phase I-III Studien. Diese schließen hyperosmolare Mittel ein, die entworfen wurden um den Fluss von Wasser durch das Lungengewebe zu fördern, Salzmodulatoren, die andere Chlorid- oder Natriumkanäle in der Lunge modulieren und Medikamente, entworfen zur Reparatur des geschädigten CFTR-Proteins [Sto 2008]. PTC 124, ist ein weiteres zur Zeit in Phase II Studien getestetes Pharmakon, ein oral bioverfügbares kleines Molekül, welches zum Anregen von Ribosomen während der mRNA Translation konzipiert wurde, selektiv vorzeitige Stopcodons „überliest“ und damit überwiegend funktionelle CFTR produzieren lässt [Ker 2008]. PTC 124 supprimiert durch diese Wirkungsweise Nonsensmutationen.

Eine weitere Studie hat gezeigt, dass Kinder mit CF niedrigere Serumwerte von Insulinlike growth factor-I (IGF-I) aufweisen, als für ihre normale Wachstumshormon-(GH)-produktion zu erwarten wäre. Weiterhin ist bei Kindern mit CF die Antwort auf endogenes GH vermindert [Mo 2009].

#### 2.1.6 Prognose

Im Jahr 1938, als das Krankheitsbild CF entdeckt wurde, betrug die Lebenserwartung nur sechs Monate [Da 2008]. Im Laufe der Jahre verbesserte sich diese, da immer mehr Erkenntnisse über das Krankheitsbild CF entdeckt und bekannt wurden und somit bessere Möglichkeiten der Diagnostik und Therapie entwickelt wurden [Da 2006].

Bedingt durch die frühere Diagnose der Krankheit und die verbesserte unterstützende Behandlung stieg die durchschnittliche Lebenserwartung im Jahr 1985 auf 25 Jahre und in den letzten Jahren auf 37 Jahre an [Bo 2007], wobei heute fast ein Alter von 40 Jahren erreicht werden kann [Da 2006], [Wi 2008]. Auf Grundlage dieser Entwicklungen ist anzunehmen, dass Kinder, die heute geboren werden, ein Alter von 50 Jahren erreichen könnten [He 2010].

### 2.2 Leberbeteiligung in der Mukoviszidose

#### 2.2.1 Häufigkeit

Die CF-assoziierte Lebererkrankung (CF-associated Liver Disease – CFLD) ist eine relativ häufige und frühe Komplikation der Krankheit CF und verantwortlich für 2,5 % der Gesamtmortalität der Patienten. Sie repräsentiert somit den dritthäufigsten Grund

für den Tod von CF-Patienten nach pulmonalen und Transplantationskomplikationen [Mo 2009], [Co 2006]. Insgesamt ist rund ein Drittel der CF-Patienten von einer CFLD betroffen [Co 2007]. Deren Entstehung ist bisher nicht hinreichend erforscht, jedoch wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass bei 2-10 % [Di 2001], [He 2010], [Me 2010] der Patienten, eine Entwicklung zur multilobulären Zirrhose stattfindet, die zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann. Somit kann man festhalten, dass das Risiko für Mortalität bei CFLD-Patienten höher ist, als bei den CF-Patienten, die keine Leberbeteiligung aufweisen [Rowl 2015].

Die Prävalenz der CFLD ist aufgrund der Tatsache, dass es keine sensitiven und spezifischen diagnostischen Marker für die CFLD gibt, nicht eindeutig feststellbar. In Abhängigkeit von der Methodik, die den einzelnen Studien zugrunde gelegt wird, werden unterschiedliche Anhaltspunkte der Prävalenz gesetzt [Di 2001], [Co 2006], [Co 2007]. Querschnittstudien, in denen die CFLD aktiv unter Nutzung von biochemischer und ultrasonographischer Beurteilung gesucht wird, haben eine Prävalenz von 18-37 % geliefert [Co 1994]. Prospektive Studien haben eine kumulative Inzidenz der CFLD von 27-35 % ohne inzidente Fälle nach dem Alter von 18 Jahren ermittelt [Li 1999], [Co 2002]. Folglich ist die CFLD eine relativ frühe Komplikation bei CF – in der Mehrheit der betroffenen Patienten wird die CFLD in der Kindheit am Ende der ersten Lebensdekade klinisch apparent, kann sich aber früher entwickeln, insbesondere bei Patienten mit Mekoniumileus [Li 1999], [Co 2002].

Weitere Studien zur Prävalenz der CFLD deuten an, dass sich die klinisch eindeutige CFLD gewöhnlich in der Pubertät oder davor entwickelt, und dass die CFLD eine Prävalenz von 13-17 % hat. Das Auftreten einer isolierten Hepatomegalie lässt nicht zwangsläufig auf eine fortgeschrittene CFLD schließen. Die Hepatomegalie tritt nämlich bei 6-30 % der CF-Patienten auf, und ist damit doppelt so häufig wie die CFLD [Li 1999], [Co 2002], [Wi 1999], [Di 2001].

Eine Steatosis hepatis ist die häufigste hepatobiliäre Komplikation bei CF, sie tritt, je nach Studie bei 23-67 % oder bei bis zu 75 % der Patienten auf [Li 1999], [Chen 2005].

### 2.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die CFLD zeigt einen langsamen progressiven und häufig asymptomatischen Verlauf [Li 1999], [Co 2002], [Wi 1999], [Di 2001]. Die Pathogenese stellt sich multifaktoriell mit einer variablen Beteiligung von umweltbedingten und genetischen Determinanten dar [Co 2006], [Co 2007].

Es existiert ein weites Spektrum an hepatobiliären Komplikationen bei CF. Dazu zählen Steatosis, fokale biliäre Zirrhose (FBC), multilobuläre biliäre Zirrhose (MBC), Mikrogallenblase, aufgetriebene Gallenblase, Cholelithiasis, intrahepatischer Schlamm, Kompression des Hauptgallenganges durch das Pankreas und das Cholangiokarzinom [Wi 2008], portale Hypertension, neonatale Cholestase und sklerosierende Cholangitis [He 2010].

#### 2.2.2.1 Die Entstehung der Fibrose und Zirrhose in der Leber

Die Fibrose in der Leber, ähnlich zu der in anderen Organen beobachteten, ist eine Antwort der Wundheilung, die nach Gewebeschädigung auftritt [No 2011]. Das Endstadium der CFLD äußert sich überwiegend in einer FBC als eine pathognomonische Lebermanifestation. Diese kann man bei einem Drittel der CF-Patienten beobachten [Mo 2009], [So 1999]. Es wird angenommen, dass diese biliäre Zirrhose in Verbindung mit dem Basisdefekt von CF steht [St 2005], [Ki 2000], [Co 2004], [Di 2001].

Die FBC und die MBC entstehen durch eine Blockade der kleinen Gallengänge mit dickem eosinophilen PAS-positiven (durch Periodic acid-Schiff Reaktion nachgewiesen) Material und führen somit zu einer biliären Obstruktion durch visköse Schleimsekretion. Daraus resultiert anschließend eine periduktale Inflammation und Gallengangsepithelproliferation, welche zu einer progressiven periportalen Fibrose [Mo 2009], [So 1999] führen. Dies ist aufgrund der Ausdehnung der Erkrankung von einer initial fokalen Leberfibrose zu einer MBC und zu portaler Hypertension klinisch sehr bedeutsam [Co 2004], [Da 2006], [Fer 2001].

Die Progression von FBC zu MBC und zu portaler Hypertension, welche bei bis zu 8 % der Patienten auftritt, kann Jahre bis Jahrzehnte dauern und sollte als ein Kontinuum gesehen werden [So 1999].

Die CFLD ist in der Anwesenheit eines fehlerhaften CFTR-Proteins im Gallengangssystem begründet. Das normale CFTR-Protein spielt eine Schlüsselrolle bei der Sekretion der Gallenflüssigkeit und deren Regulierung. CFTR wird ausschließlich auf der apikalen Oberfläche der Gallengangsepithelzellen, den Cholangiozyten und den Epithelien der Gallenblase exprimiert. Dieses Protein existiert nicht in Hepatozyten oder anderen Leberzellen [Di 2001], [Ki 2000], [Co 2006], [Mo 2009]. CFTR formt einen cAMP-abhängigen Kanal mit niedriger Leitfähigkeit, der Cl<sup>-</sup>-Ionen von der Zelle ins Lumen des Gallengangs befördert [Co 2006], [Di 2001]. Es reguliert die Flüssigkeit und den Gehalt an Elektrolyten in der Galle [He 2010].

Der Reaktionsmechanismus und die Funktionsweise von CFTR laufen wie folgt ab: Durch die Bindung von Sekretin an Rezeptoren auf der basolateralen Seite der Cholangiozyten erhöht sich der intrazelluläre cAMP-Wert [Lev 1976]. Dadurch wird CFTR aktiviert, wodurch der  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  [Al 1993] und der  $\text{H}_2\text{O}$ -Transport stimuliert werden. Ein negatives Potential und ein osmotischer Gradient werden über der Zellmembran erzeugt, sodass Natrium über die Zellmembran und Wasser aus der Extrazellulärflüssigkeit in das Lumen des Gallenganges befördert werden [Co 2006], [Di 2001]. Der Wechsel des apikalen Chloridgradienten und der Aufbau der  $\text{Cl}^-$ -Ionen im Lumen fördert den Bicarbonationen ( $\text{HCO}_3^-$ )-Transfer von der Zelle ins Lumen durch die  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscherpumpe, die dadurch die Alkalisierung der Gallenflüssigkeit unterstützt [Be 2010]. Durch diesen Prozess wird die Alkalität und Verdünnung der Gallenflüssigkeit reguliert [Fer 2001]. Diese Alkalität ist erforderlich für die Verdauungsfunktion und die Löslichkeit der organischen Bestandteile der Gallenflüssigkeit [Di 2001].

Das Fehlen oder die Fehlfunktion von CFTR induziert wahrscheinlich eine Kaskade von fehlerhafter Sekretin/cAMP-aktivierter  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion, welche zu vermindertem Gallenfluss führt, die Alkalität der Gallenflüssigkeit reduziert und schließlich eine Verstopfung der intrahepatischen Gallengänge durch abnormal eingedickten Schleim verursacht [Co 2006], [Qu 2008]. Durch die intrahepatische Obstruktion und Verstopfung der Gallengänge mit dickem Sekret werden die Cholangiozyten und Hepatozyten geschädigt. Diese Sequenz findet unter Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren statt und mündet in einer Aktivierung der hepatischen Sternzellen, die zur Kollagensynthese stimuliert werden. Diese Kollagenablagerungen führen letztendlich zu der Entwicklung einer FBC, die zu einer MBC führen kann [Mo 2009], [Fer 2001], [Di 2001].

Die Schädigung der Gallengangsendothelien ist vermutlich das erste Stadium in der Entwicklung einer periportalen Fibrose. Histologisch wird dies nachgewiesen durch ultrastrukturelle Anomalien der Cholangiozyten mit unregelmäßigen Formen der Zellen, Nekrose und periduktulärer Kollagenablagerung [Li 1992]. Es ist anzunehmen, dass diese Läsionen das anatomische Pendant der jahrelangen Schädigung im duktilären Gallefluss repräsentieren, der die Anfälligkeit des biliären Epithels steigern kann, durch Detergenzien in Form von endogenen Gallensäuren beeinträchtigt und durch infektiöse Agentien geschädigt zu werden [Co 2006]. Die Entwicklung der Leberfibrose ist charakterisiert durch vermehrte Ablagerung von strukturellen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie verschiedenen Kollagentypen, Proteoglykanen, strukturellen Glykoproteinen und Hyaluronsäure (HA) [No 2011].

Allgemein finden sich bei der Leberfibrose im Wesentlichen qualitative und quantitative Veränderungen der ECM. Diese Änderungen entstehen infolge der Regulation der Matrixmetalloproteinase (MMPs) und ihren spezifischen Inhibitoren (TIMPs). Diese kontrollieren die Expression und Ablagerung von verschiedenen Bestandteilen der ECM [Her 2011], [Fri 2010], [Fri 2006]. Einige andere Zelltypen wie Makrophagen (Kupferische Zellen), Lymphozyten, Endothelzellen, aus dem Knochenmark abgeleitete Vorläuferzellen, portale Fibroblasten und gegebenenfalls andere Zelltypen spielen ebenso eine Rolle in der Fibrogenese [Her 2011], [Kis 2008], [Duf 2005], [Wy 2010].

Die periportale Fibrose ist geprägt von fibröser Expansion der Portalfelder mit Fibrose, die sich entlang der terminalen zentroazinären Portalvenen ausdehnt. Es wird das Auftreten einer Fibrose der Sternzellen angenommen [Ram 2004].

Während der Fibrogenese bewirkt die Leberschädigung Inflammation, Aktivierung und Proliferation von hepatischen Sternzellen (HSCs), die die Remodellierung der ECM kontrollieren und koordinieren [Her 2011], [Fri 2010], [Fri 2006]. Die Umwandlung der ansässigen HSCs vom ruhenden in den aktivierten Zustand (myofibroblastic-like Zellen) ist ein kritischer Bestandteil in der Leberfibrogenese. Außerdem trägt die Produktion von TGF- $\beta$  durch die Gallengangsepithelzellen zur Aktivierung der HSCs bei [Lew 2002]. In der normalen Leber sind die HSCs im Disséraum ansässig und sind hauptsächlich Speicherorte von Vitamin A. Im Rahmen der bedeutendsten funktionellen Veränderungen in Verbindung mit der Aktivierung der HSCs ist ein signifikanter Anstieg in der Sekretion von ECM-Proteinen zu verzeichnen, der vermutlich verantwortlich für die übergreifende fibrogenetische Reaktion ist [No 2011]. Die Ablagerung der ECM im Disséraum und die Erzeugung subendothelialer Basalmembranen führen zu einem reduzierten Blutfluss durch das Organ, Strangulierung von in der Nähe befindlichen Hepatozyten und Beeinflussung der Ausscheidungsfähigkeit aller Leberzellen [No 2010].

Andere Mechanismen verschärfen das Problem. Eine CFTR-abhängige gestörte Sekretion von Proteinen wie Muzin, die durch ansteigende Sekretion von Chondroitinsulfat nachgewiesen wird, führt zur Obstruktion der kleinen Gallengänge und trägt ebenfalls zu einer Erhöhung der Viskosität der Galle bei [Meh 2005], [Bh 1998], [Di 2001]. Die Aktivität der freien Radikale kann auf diese Weise in der abnormalen Galle erhöht werden. Die biliäre Stase kann die Anfälligkeit des Gallengangsepithels für infektiöse Agentien und toxische Komponenten, die in die Galle ausgeschieden werden, erhöhen. Die Ansammlung hydrophiler toxischer Gallensäuren kann die direkte Schädigung der

Hepatozyten auslösen [Di 2001]. Dies führt ebenfalls zu einer Verstopfung der Gallengänge mit eosinophilem Material, welches unter der frühen histologischen Umwandlung des Gewebes bei Kleinkindern und Kindern mit CF gefunden wurde [Op 1975].

Der Gesamteffekt des fehlerhaften CFTR besteht darin, dass dickere, weniger alkalische Gallenflüssigkeit im Gallengangssystem akkumuliert [Ba 1997], damit die Gallengänge verstopft und den Trigger für den Beginn einer Fibrose liefert. CFTR reguliert auch andere transmembranäre Ionenaustauscher wie die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Pumpe [Ba 1997]. Ein regulatorischer Faktor der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Pumpe, wenn er überexprimiert wird, kann CFTR mit  $\Delta\text{F508}$  so umverteilen, dass mehr Chloridsekretion erfolgen kann und somit die jeweilige Flüssigkeit weniger viskös ist [Fa 2009].

Andere calciumabhängige und G-Protein-gekoppelte Chloridkanäle im apikalen Gallengangsepithel können teilweise den sekretorischen Defekt der Leber aufgrund des fehlerhaften CFTR-Proteins kompensieren und als Umgehung des sekretorischen Defektes bei CF dienen [Fer 2001], [Di 2001].

Hepatobiliäre Manifestationen treten fast ausschließlich bei CF-Patienten mit schweren Klasse I-III Mutationen [Mc 2003] auf, betreffend die CFTR-Synthese, -Prozessierung und -Regulation. Es gibt allerdings keine klaren Verbindungen zwischen Phänotyp und spezifischen CFTR-Mutationen [He 2010]. Genetische Tests zur Vorhersage einer Leberbeteiligung bei CF-Patienten sind dementsprechend nicht sinnvoll. Es ist unklar, warum nur eine Minderheit der Patienten mit den gleichartigen schweren CFTR-Mutationen eine CFLD entwickelt [He 2010].

Es gilt, herauszufinden, aus welchen Gründen die CFLD unterschiedlich stark ausgeprägt ist [Co 2007]. Tatsächlich wird die CFLD derzeit als erste vererbare Lebererkrankung betrachtet, die durch eine gestörte sekretorische Funktion des Gallengangsepithels zustande kommt. Es ist bislang nicht bekannt, weshalb lediglich ein Drittel der CF-Patienten von der CFLD betroffen ist. Nur bei einer Minderheit von Patienten, meist im Kindesalter, stellt die CFLD und ihre ungewöhnlich schnelle Progression das klinische Hauptproblem dar [Co 2006].

### 2.2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung einer CFLD

Die Entwicklung einer CFLD scheint auf Patienten mit einem Genotyp, der eine besonders schwere Ausprägung der Erkrankung CF verursacht, beschränkt zu sein. Dennoch ist mit dem Vorhandensein und der Schwere der CFLD keine spezifische CFTR-

Mutation assoziiert. Eine multifaktorielle Pathogenese ist naheliegend [Co 1994], [Wi 1999].

Obwohl die CFLD fast ausschließlich bei CF-Patienten mit schweren Klasse I-III Mutationen in CFTR auftritt, gibt es keinen Beweis einer Beziehung zwischen Phänotyp und spezifischer Mutation [Mo 2009]. Modifizierende Gene wie ein Polymorphismus in Genen, die Inflammation, Fibrose oder oxidativen Stress hochregulieren, scheinen die Anfälligkeit zur Entwicklung dieser Läsionen zu übertragen [Wi 1999], [Wi 2007], [He 2010].

Neben den genetischen Faktoren spielen auch Umwelteinflüsse eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung der CFLD. Ein schlechter Ernährungsstatus, antioxidative Defizienz, Noncompliance und chronische medikamentöse Hepatotoxizität können den biliären sekretorischen Defekt und die Leberschädigung verschlechtern. Virale Hepatitiden, abdominale Operationen und ausschließliche parenterale Ernährung können die CFLD ebenfalls negativ beeinflussen [Co 2006].

Auf der anderen Seite hat ein diskordantes Erscheinungsbild der Leber bei CF-Geschwistern, bei denen gleiche umweltbedingte Faktoren zu vermuten sind, angedeutet, dass die klinische Ausprägung der CFLD durch genetische Faktoren, die unabhängig vom CFTR-Gen vererbt werden, moduliert werden kann [Cas 2001]. Zu einem früheren Zeitpunkt erhobene Daten bezüglich genetischer Modifikatoren für CFLD ließen auf eine komplexe multigenetische Vererbung mit möglicher Interaktion von verschiedenen Kandidatengenen (wie  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel oder  $\alpha$ 1-Antiprotease (SERPINA 1), TGF- $\beta$ -1, mannosebindendes Lectin 2 und Glutathion S-Transferase, Angiotensin converting enzyme (ACE)) schließen [Co 2006], [Cast 2008], [Bar 2009], [Hen 2002], [Ga 2001]. Die Identifizierung von genetischen Modifikatoren ist eine relevante Aufgabe, weil diese die Identifizierung von Patienten mit einem Risiko für die Entwicklung einer CFLD zum Zeitpunkt der Diagnose CF und eine frühe Einleitung prophylaktischer Strategien ermöglichen kann [Co 2006].

Seit Mitte der 1990er Jahre wurden Faktoren festgestellt, die signifikant mit der Entwicklung einer CFLD in Verbindung zu bringen sind. Hierzu gehören das Alter bei der Diagnosestellung der CF, das männliche Geschlecht, ein Mekoniumileus in der Anamnese, die Pankreasinsuffizienz und Genotypen, die ein schweres Krankheitsbild verursachen [Co 1994], [Wi 1999], [Co 2002], [La 2004], [Cor 2004], [Li 1999], aber ihre Rolle konnte nicht durchgängig bestätigt werden. Eine Reihe von noch unbekanntem Fak-

toren, eingeschlossen genetische Modifikatoren assoziiert mit Geschlecht oder ethnischer Gruppe, können Patienten eine unterschiedliche Anfälligkeit für eine Leberbeteiligung verleihen. Es wurde beispielsweise ein modifizierendes Gen gefunden, das häufiger einen Mekoniumileus auslösen kann [Zi 1999].

Es ist daher festzustellen, dass keine Korrelation der Entwicklung einer Leberbeteiligung mit den verschiedenen Mutationen des krankheitsverursachenden CFTR Gens existiert. Genetische und umweltbedingte Faktoren können die Expression von Manifestationen bei CF modifizieren, eingeschlossen die Lungen- und die Lebererkrankung. Auch Histokompatibilitätsantigene, Infektionen und Unterschiede in der medizinischen Behandlung können als Modifikatoren in Frage kommen [Di 2001].

#### 2.2.4 Klinik

Kinder mit CF, die eine Leberdysfunktion haben, zeigen ein unterschiedliches klinisches Bild.

1. Neonatale Cholestase: Diese ist nur selten zu beobachten und tritt in Assoziation mit Mekoniumileus und bei Nutzung parenteraler Ernährung in 50% der Fälle auf. Das eosinophile Sekret wird in den intrahepatischen Gallengängen eingedickt. Es liegt meist eine konjugierte Hyperbilirubinämie vor, die mit farblosem Stuhl assoziiert sein kann, was zu einer Verwechslung mit dem Krankheitsbild der extrahepatischen Gallengangsatresie führen kann. Die Auflösung der Cholestase tritt dann spontan auf, obwohl eine kleine Anzahl von Kindern auch eine Leberfibrose entwickelt [Di 2001], [He 2010].
2. Biliäre Abnormitäten: Einige dieser Abnormitäten werden bei der CF beobachtet. Gallensteine und Cholezystitis können auftreten, zudem existiert ein altersabhängiger Trend für das Auftreten der Symptome. Die Gallensteine sind gewöhnlich aus Calciumbilirubinatzusammengesetzt, welches nicht von Gallensäuren gelöst werden kann. Die Obstruktion des Hauptgallenganges kann aufgrund von Steinen oder biliärem Schlamm auftreten und führt zu abdominalem Schmerz und akutem Auftreten eines Ikterus. Eine Mikrogallenblase, die bei der Sonographie als ein asymptomatischer Befund beobachtet wird, ist nicht ungewöhnlich. Strikturen und perlschnurartige Veränderungen, ähnlich denen bei primär sklerosierender Cholangitis (PSC), treten auch bei einigen erwachsenen CF-Patienten auf. Auffallend ist, dass die Inzidenz von CFTR-Mutationen in der Population der Patienten mit PSC höher (10,6 %) ist als in der Allgemeinbevölkerung (4 %).

3. Asymptomatische Vermehrung des Oberbauchumfanges: Mit Beginn der Pubertät haben nahezu 10-30 % der an CF erkrankten Kinder eine Hepatomegalie entwickelt, in den meisten Fällen mit einer Leberfibrose.
4. Hämatemesis: Aufgrund der gestiegenen Sensibilität für eine möglichst frühe Identifizierung der CFLD tritt die portale Hypertension als Erstmanifestation der CFLD und damit das Symptom Hämatemesis (Ösophagusvarizenblutung) seltener auf [Di 2001].
5. Andere Leberabnormalitäten: Infektionen, metabolische Störungen, Autoimmunerkrankungen, Leberschädigung aufgrund von medikamentöser Therapie und kongenitale Abnormalitäten können bei von CFLD betroffenen Kindern genauso auftreten wie auch bei gesunden Kindern. Heterozygotie für  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel ist als ein Risikofaktor für schwere CFLD in einer multizentrischen Studie mit 180 Kindern festgestellt worden [Di 2001].

Weitere Symptome, die eine Lebererkrankung vermuten lassen, sind: ein Wechsel in der Aktivität oder der schulischen Leistung, mangelhafte Gewichtszunahme, Müdigkeit, Übelkeit, abdominelle Schwellung oder Schmerzen, Ekchymosen, gastrointestinale Blutungen, Ikterus oder Pruritus.

Wenn eine Lebererkrankung festgestellt wurde, sollte auch eine Überprüfung des Verlaufs der Neonatalperiode, der Medikation, der Nahrungsaufnahme, des Alkoholkonsums, der Reiseanamnese, der Gabe von Bluttransfusionen in der Vergangenheit und der familiären Belastung durch Lebererkrankungen stattfinden. Körperliche Anzeichen, die bei jedem Klinikbesuch überprüft werden sollten, sind: Leberpalpation und Messung des Leberabstandes zum Rippenbogen und Xiphoid, Perkussion und Messung der Leberausdehnung, Palpation und Messung der Milz unter dem linken Rippenbogen, Leberhautzeichen (Palmarerythem, Spidernaevi, Ikterus, dilatierte Bauchwandvenen), Aszites, neurologische Merkmale einer Zirrhose sowie der Ernährungsstatus. Bei den meisten Patienten zeigen sich vorübergehende nicht signifikante Erhöhungen der Serumwerte für AST, ALT und  $\gamma$ GT 2,5-mal höher, als der höchste Wert des Referenzbereiches. Diese Laborwerte identifizieren allerdings keine Patienten mit signifikanter Lebererkrankung wie die multilobuläre biliäre Zirrhose und können nicht die Entwicklung einer terminalen Lebererkrankung prognostizieren [Wi 2008]. Bodewes et al. konnte zeigen, dass eine hochnormale bis erhöhte  $\gamma$ GT bei pädiatrischen CF-Patienten stark mit einer Leberzirrhose bei CFLD assoziiert ist, vor allem bei wiederholten  $\gamma$ GT-Messungen [Bod 2015]. Dabei ging es auch um die Identifizierung von Patienten, die ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Leberzirrhose bei CFLD aufweisen

[Bod 2015]. Die CFLD zeigt einen langsamen progressiven Verlauf, Leberversagen stellt ein spätes Ereignis dar. Die Entwicklung einer portalen Hypertension und die damit verbundenen Komplikationen treten allerdings früher und häufiger auf [Fei 1993], [De 1999]. Die Pathogenese der Steatosis hepatis ist nicht direkt mit dem Gendefekt verbunden, wird aber mit Mangelernährung, essentiellen Fettsäuredefizit, Carnitin- oder Cholindefizit oder Insulinresistenz in Verbindung gebracht und ist bisher nicht hinreichend erforscht [Li 1999], [Chen 2005].

### 2.2.5 Diagnostik

Zur Diagnostik der CFLD gehören Routine-Labortests, Serum-Surrogat-Fibrosemarker, ECM-Marker und Kombinationen dieser Werte. Des Weiteren zählen zu den nicht-invasiven Methoden spezialisierte Leberfunktionstests [Lot 2009], radiologische Bildgebung und TE (FibroScan®: Echosens, Paris, Frankreich) [Fr 2008].

Da die CFLD oft subklinisch verläuft, ist sie häufig unterdiagnostiziert. Obwohl neueste Konsensleitlinien für die Diagnose von CF und die Verfahrensweise bei Leber- und Gallensystemerkrankungen bei CF veröffentlicht wurden, bleibt die frühe Diagnose der CFLD eine Herausforderung und es sollte eine Kombination von diagnostischen Modalitäten genutzt werden [Fa 2008], [So 1999], [He 2010].

Die Erkennung der CFLD ist aus zwei Gründen sehr wichtig. Zum einen erscheinen erst spät klinische Zeichen, nämlich dann, wenn pathologische Veränderungen ausgeprägt sind. Zum anderen legen einige Studien nahe, dass wahrscheinlich nur die frühen Läsionen reversibel sind. Es existiert kein Goldstandard zur Diagnose einer CFLD, was zu Kontroversen zwecks bester Identifizierung und Evaluierung der Krankheit führt. Dennoch hat sich etabliert, dass Kinder mit CF alle sechs bis acht Wochen untersucht werden und dass ein jährlicher, detaillierter Bericht über ihren Krankheitsverlauf sowie über ihre Therapie erstellt wird [Lit 2000].

#### 2.2.5.1 Etablierte Diagnostik

Üblicherweise werden vier Verfahren bzw. Screening Tests zum Erkennen der CFLD genutzt: die reguläre klinische Untersuchung, die laboratorische Blutuntersuchung der Leberenzyme und der Hämatologie wie z. B. die Prothrombinzeit und die Sonographie zur Untersuchung der Morphologie der Leber. Die mittels Leberbiopsie gewonnene Leberhistologie und die gastrointestinale Endoskopie werden in einigen Zentren genutzt, um das Ausmaß der Erkrankung zu evaluieren und genau zu beurteilen [Di 2001].

Bluttests werden gewöhnlich jährlich bei Kindern durchgeführt um Patienten zu entdecken, die eine asymptomatische Leberbeteiligung aufweisen. Dabei werden folgende Werte im Labor untersucht: Blutbild, Prothrombinzeit, Transaminasen, Gesamt- und direktes Bilirubin, AP,  $\gamma$ GT, Albumin und Gesamtprotein, Cholesterin und Glucose [So 1999].

Indikatoren für Cholestase ( $\gamma$ GT und AP) zeigen eher eine Erhöhung als die Transaminasen. Leberenzyme allein sind weder sensitiv noch spezifisch, denn Abnormalitäten können mild oder intermittierend sein und korrelieren nicht mit der Schwere der Leberläsion. 20-30 % der pädiatrischen CF-Patienten können zu jederzeit eine einzelne Leberwertenzymerrhöhung haben. Eine Stiftung in den USA schlägt vor, dass eine Leberbeteiligung signifikant verdächtig ist, wenn der Wert eines Leberenzym, der im Abstand von sechs Monaten gemessen wird, jeweils mehr als 1,5 mal höher ist als die Obergrenze des Referenzbereichs [So 1999]. Nicht selten weisen CF-Patienten mit einer MBC (multilobular biliary cirrhosis – multilobuläre biliäre Zirrhose) aber auch durchgängig normale Leberwerte im Labor auf [Co 2007].

Der Ultraschall der Leber, der Gallenwege, der Gallenblase, der Gefäße von Leber und Milz hat einen bewährten Platz in der Evaluation von Kindern mit klinischen oder biochemischen Merkmalen einer Lebererkrankung [Pat 1999]. Andererseits ist seine Rolle bei der Identifizierung einer Lebererkrankung bei asymptomatischen Kindern mit normaler Biochemie nicht festgelegt. In den letzten 20 Jahren hat die Sonographie eine immer stärker werdende Rolle in der Evaluation der Lebererkrankung übernommen. Mit der Sonographie können Hinweise auf fokale biliäre Fibrose, multinoduläre Zirrhose, Steatosis hepatis und biliäre Abnormalitäten detektiert werden [No 2011]. Der Ultraschall ist sinnvoll als eine erste nicht-invasive Untersuchungsmethode zum Screening einer Lebererkrankung, die zuverlässig unterscheiden kann zwischen Zeichen einer Zirrhose und portalen Hypertension, fettiger Infiltration und extrahepatischen Gallengangsabnormalitäten. Die Sonographie ist allerdings ein sehr untersucherabhängiges Verfahren [Ak 2007], [Co 2007], [Leu(1) 2015].

Den Goldstandard zur Diagnostik einer Leberfibrose (Staging und Grading) stellt die Leberbiopsie dar. Wegen des fokalen Charakters der Fibrose bei CF ist die Leberbiopsie zur Nutzung als Verlaufskontrolle unzumutbar [No 2011], [Br 2001], [Gas 1988]. Die CFLD ist eine fokale Erkrankung und es wird argumentiert, dass eine perkutane Leberbiopsie aufgrund der Möglichkeit eines Stichprobenfehlers, der bis zu 20-30 % erreichen kann [Ov 2012] und der mit der Biopsie verbundenen Morbidität (3 %) und

Mortalität (0,03 %) nicht als Goldstandard genutzt werden kann [No 2011]. Andere Forscher hingegen argumentieren, dass eine Leberbiopsie essentiell ist, zum einen für die Unterscheidung zwischen fokal biliärer Fibrose (FBC), Steatosis hepatis und für das Ausmaß der portalen Fibrose und zum anderen zum Ausschluss anderer Gründe der Leberdysfunktion [Di 2001]. Des Weiteren kann die Leberbiopsie wichtige Informationen zur Progressionsrate der Lebererkrankung und zum Ansprechen der Therapie liefern [Co 2007].

Die Leberbiopsie stellt eine für den Patienten unangenehme, weil invasive und damit schmerzhaftere Untersuchungsmethode dar, die darüber hinaus für die Untersuchenden einige Limitationen mit sich bringt. Dazu gehören die Intra- und Interbeobachtbarvariabilität der Pathologen. Zudem repräsentiert die Leberbiopsie nur einen sehr kleinen Teil des Gewebes, 1/50.000tel der Leber [Br 2001]. Infolge der initial fokalen Veränderungen bei der CFLD kann es bei der Leberbiopsie zu einem erheblichen Stichprobenfehler und aufgrund der fleckförmigen Verteilung der Läsionen in der Leber zur Unterschätzung der Schwere und Ausdehnung der CFLD oder sogar zu falsch negativen Resultaten kommen [Br 2001], [Leeu 2014]. Des Weiteren trägt diese Prozedur Risiken wie Blutungen und Infektionen oder auch einen Pneumothorax, der zwar nicht die häufigste Komplikation darstellt, aber im Zusammenhang mit CF besonders gefürchtet wird [Po 1997], [Br 2001], [Ca 2010], [Str 2010]. Aufgrund dessen kann die Leberbiopsie keine allgemeine Routinediagnostik zur Bestätigung oder zur Kontrolle der CFLD sein [St 2005], [Co 2006]. Besonders für pädiatrische CF-Patienten, für die das Risiko-/Nutzenverhältnis noch behutsamer abgeschätzt werden muss, ist es sehr wichtig nicht-invasive Methoden zu entwickeln, die akkurat eine Fibrose feststellen können [Ca(2) 2008].

Zurzeit existiert kein einzelner zuverlässiger Test zur Erkennung einer CFLD. Deshalb verwendet man eine Kombination aus diagnostischen Modalitäten um eine CFLD identifizieren und diagnostizieren zu können. Die diagnostischen Kriterien wurden initial von Colombo et al. [Co 2002] etabliert und schließen eine positive Leberhistologie (FBC oder MBC) oder mindestens zwei der folgenden Auffälligkeiten bei mehr als zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen innerhalb eines Jahres ein: klinische Hepatomegalie (Leberspanne >12cm in der Medioklavikularlinie) bestätigt mit Ultraschall, Leberserumwerte über der Obergrenze des Normalwertes (ALT, AST,  $\gamma$ GT oder AP) und andere Ultraschallabnormalitäten als Hepatomegalie (z.B. erhöhte heterogene Echogenität; noduläre Veränderungen; irreguläre Ränder, Splenomegalie). Die Diagnostikkriterien nach Debray [De 2011] stellen sich ähnlich dar. Laut Debray müssen zwei der folgen-

den Faktoren/Kriterien vorliegen, damit das Vorliegen einer CFLD in Erwägung gezogen werden kann: Auffälligkeiten bei der körperlichen Untersuchung wie Hepatomegalie, die sich als vergrößerte Leberspanne relativ zum Alter zeigt bzw. wenn sich die palpable Lebergrenze in der Medioclavicularlinie mehr als 2 cm über den unteren Rippenrand hinaus erstreckt und/oder Splenomegalie, auch durch Ultraschall bestätigt. Ein prominenter linker Leberlappen, tastbar im Epigastrium wird oft bei multilobulärer Zirrhose gesehen. Weitere Faktoren stellen Auffälligkeiten bei Leberfunktionstests definiert als Anstieg der Transaminasen (AST, ALT) und der GGT über die obere Norm hinaus an drei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten in 12 Monaten dar, nachdem eine andere Ursache der Lebererkrankung ausgeschlossen wurde. Wenn im Ultraschall gezeigt werden kann, dass es eine Leberbeteiligung gibt (erhöhte bzw. heterogene Echogenität, unregelmäßige Ränder, noduläre Veränderungen) oder portale Hypertension (Splenomegalie, erhöhte Dicke des kleinen Omentums, spontane splenorenale Anostomosen, große Kollateralvenen, Aszites) und biliäre Veränderungen (Dilatation der Gallengänge), weist dies auf eine CFLD hin. Eine Leberbiopsie kann bei Zweifel an der Diagnose indiziert sein. Auch bei Debray müssen mehrere Kriterien vorhanden sein um die Diagnose einer CFLD zu stellen. Bei Zweifeln an der Diagnose steht aber am Ende immer noch die Leberbiopsie als Goldstandard, welche einen komplikationsbehafteten und unangenehmen Eingriff vor allem bei Kindern darstellt.

Neben der Sonographie wurden auch einige weitere radiologische Untersuchungsmöglichkeiten wie Computertomographie und Magnetresonanz-Bildgebung getestet. Diese Bildgebungstechniken sind grundsätzlich in der Lage, portale Hypertension nachzuweisen. Sie sind aber typischerweise nicht sensitiv für milde oder moderate Fibrose.

Die hepatobiliäre Szintigraphie ist ebenfalls ein mögliches Untersuchungsverfahren zur Feststellung einer CFLD, in welcher Derivate der Iminodiessigsäure als Marker verwendet werden. Diese Untersuchung kann mit Dilatation von intra- und extrahepatischen Gallengängen und verzögerter biliärer Exkretion und intestinaler Erscheinung des Markers ein typisches Bild der Schädigung des biliären Abflusses dokumentieren [Oc 1996]. Die Szintigraphie liefert ebenfalls funktionelle Informationen und ist entwickelt worden, um eine zeitabhängige Progression der Lebererkrankung zu dokumentieren [Fo 2002] sowie das Ansprechen der Therapie mit Ursodesoxycholsäure (UDCA) zu kontrollieren [Co(1) 1992]. Allerdings liefert die Szintigraphie nur funktionelle Informationen. Daher wurde die Suche auf nicht-invasive Methoden zur Untersuchung der Leberfibrose fokussiert [No 2011], [Br 2001].

#### 2.2.5.2 Neue nicht-invasive Diagnoseverfahren

Jüngste Herangehensweisen zum Messen einer hepatischen Fibrose bei Erwachsenen schließen FibroTest, ELF (enhanced liver fibrosis) (eine Gruppe von Serummarkern), Index des Aspartat-Transaminase-Thrombozyten-Verhältnis (APRI) [Leu(2) 2015] und die TE [Ci 2014], ein Messverfahren zur Bestimmung der Lebersteifigkeit, ein [Den 2009], [No 2008], [No(1) 2009], [No(2) 2009], [No 2010], [Sta 2014].

Aufgrund der neuen diagnostischen Möglichkeiten eine Lebererkrankung nicht-invasiv zu evaluieren, ändert sich die Rolle der Biopsie (eigentlich Goldstandard) zunehmend vor allem bei Kindern [Ov 2012].

##### *Die transiente Elastographie (TE):*

Momentan kann die Lebersteifigkeit mit Hilfe der hepatischen Elastographie, auch TE genannt, basierend auf Ultraschall oder Magnetresonanz (MR) abgeschätzt werden [No 2011]. Die ersten klinischen Daten zur transienten Elastographie wurden 2002 veröffentlicht [Sa 2003].

Die Lebersteifigkeit ist bei der Fibrose der Leber signifikant erhöht und liefert daher einen Wert zur Feststellung einer signifikanten Fibrose (definiert als mindestens perisinusoidale und portale/periportale Fibrose), einer fortgeschrittenen Fibrose (septale oder überbrückende Fibrose) oder einer Zirrhose, bei der die Aussagekraft der Untersuchung am höchsten ist [No 2011]. Es hat sich gezeigt, dass die Lebersteifigkeit mit der Leberfibrose in einer Vielzahl von Lebererkrankungen sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern korreliert [Ca(2) 2008], [Del 2009], [Lé 2007], [Behr 2013], [Kit 2013], [Fr 2013]. Die Untersuchung der Leber mittels TE erfolgt durch einen rechten Interkostalraum an der typischen Lokalisation der Leberpunktion [Fr 2007]. In Abschnitt 2.3.2 wird die genaue Funktionsweise des TE-Gerätes beschrieben.

Mit Hilfe dieses Gerätes kann abgeschätzt werden, wie fest das Lebergewebe des untersuchten Patienten beschaffen ist, wodurch auf das Vorliegen einer Leberfibrose, -zirrhose geschlossen werden kann. Dazu kommt u.a. das METAVIR-Punktesystem zur Anwendung, das jedoch vorwiegend für Lebererkrankungen wie z.B. Hepatitis C verwendet wird [The 1994], [Lé 2007]. Ursprünglich wurde der METAVIR-Score ausschließlich für die Hepatitis C entwickelt und dürfte im Grunde nur für virale Lebererkrankungen gelten [Bed 1996]. Da dieser Score gut etabliert ist, wurde er auch für andere Lebererkrankungen verwendet.

Das METAVIR-Punktesystem besteht aus fünf Stadien, die nach den morphologischen Eigenschaften der portalen Fibrose gegliedert sind: F0 = keine Fibrose, F1 = portale Fibrose ohne Septen, F2 = portale Fibrose mit wenigen Septen, F3 = zahlreiche Septen ohne Zirrhose und F4 = Zirrhose [The 1994]. Dieses System wird zur Interpretation der Leberhistologie verwendet. Seitdem bei einer Korrelation von Fibroscanwerten mit METAVIR-Fibrosestadien ein signifikanter Zusammenhang festgestellt wurde, werden METAVIR-Fibrosestadien auch in der TE angewendet [Lé 2007]. Der größte klinische Nutzen der TE liegt in der Diagnostik (Nachweis oder Ausschluss) einer Zirrhose [No 2011].

#### *Biomarker als Laborparameter zur CFLD-Diagnostik*

Es besteht die Möglichkeit eine Leberfibrose mit Hilfe von Fibrose-Biomarkern nachzuweisen. In Kapitel 2.4 wird darauf explizit eingegangen.

#### *Weitere Untersuchungsverfahren:*

Um die Einschränkungen der TE zu umgehen, wurden nicht-invasive Methoden für die Evaluation der Leberfibrose unter Nutzung der Ultraschallwellen entwickelt. Dazu gehören die Realtime Gewebe Elastographie (RT-E), die akustische Stärkestrahlungsimpuls (ARFI)-Bildgebung [Man 2012], [Mon 2012], [Fr 2013], [Sta 2014] und die Überschallscherwellenbildung (SSI) [Ka 2009], [Sp 2010], [Mu 2009].

Auch Bildgebungstechniken (Ultraschall, Magnetresonanz und Computertomographie) haben zunehmend Bedeutung in der Diagnose von hepatobiliären Abnormitäten erlangt [Ak 2007], [Cha 2006].

### 2.2.6 Therapie

Zur Therapie der CF ist es notwendig, Ärzte und Therapeuten aus verschiedenen Fachrichtungen einzubeziehen wie pädiatrische Gastroenterologen oder Hepatologen, erfahrene Ernährungsberater, Kinderradiologen und hepatobiliäre Chirurgen. Kinder mit dekompensierter Zirrhose müssen von einem pädiatrischen Lebertransplantationszentrum betreut werden [Di 2001].

Obwohl die therapeutischen Möglichkeiten für die CFLD gegenwärtig noch limitiert sind, besteht ein reges Interesse in der möglichst frühen Entdeckung dieser Krankheit [He 2010] um frühzeitig therapeutisch eingreifen zu können.

Zurzeit stellt die Gallensäure Ursodesoxycholsäure (UDCA) die einzige Möglichkeit der Therapie der CFLD dar. Diese Therapie zielt auf eine Verbesserung der biliären Sekre-

tion bezogen auf die Viskosität der Galle und der Zusammensetzung der Galle ab, ist frei von ernsthaften Nebenwirkungen und wird generell gut toleriert. Darüber hinaus kann UDCA auch eine Rolle bei der Prävention der CFLD spielen [Che 2000], [Mo 2009], [Co 2007]. Die Therapie mit der UDCA zeigt Potential insofern, als dass es viele Marker der CFLD verbessert. Dennoch gibt es keinen direkten Beweis für die Modifizierung des Fortschreitens zur Zirrhose [Che 2000]. Verglichen zu einer neueren Gallensäure, der norUrsodesoxycholsäure (norUDCA), ist UDCA signifikant toxischer und induziert bei Mäusen Galleinfarkte in den von der Versorgung abgetrennten Leberlappen. norUDCA lindert nur die Lebererkrankung ohne dabei einen toxischen Einfluss zu haben und ist vermutlich noch besser zur Therapie der CFLD geeignet [Fic 2013].

Ferner ist anzunehmen, dass einige mögliche Mechanismen als günstige Effekte angenommen werden: UDCA verdrängt toxische Gallensäuren aus dem enterohepatischen Kreislauf, hat einen stabilisierenden Effekt an Membranen, die toxischen Gallensäuren ausgesetzt sind, stimuliert die Chloridsekretion der calciumabhängigen Chloridkanäle und die Bicarbonatsekretion, hat immunmodulatorische Eigenschaften und schützt die Zellen [Ba 1997], [Ku 2001] [Pa 2002], [Ch 1999], [Mo 2009].

Weitere positive Effekte umfassen eine Verbesserung der Leberbiochemie (AST/ALT,  $\gamma$ GT), eine Verbesserung der hepatischen exkretorischen Funktion und des biliären Abflusses ebenso wie auch eine Verbesserung der Leberhistologie und des Ernährungs- und essentiellen Fettsäurestatus [Co 2006], [Li 1998], [Co 1996], [Le 1997]. Dies wurde in verschiedenen Studien mit jedoch wenigen Probanden und kurzer Laufzeit beobachtet [Co 1994], [Co 1999], [Che 2000]. Allerdings bleibt die Wirkung auf den natürlichen Verlauf der CFLD noch zu definieren [Che 2000]. 2012 konnte Kappler et al. feststellen, dass der frühe Beginn einer UDCA-Therapie bei früher Diagnose einer CFLD durchaus die Entwicklung einer schweren Lebererkrankung verhindern und auch längerfristig zu einer persistierenden signifikanten Verbesserung der Lebertests im Serum führen kann [Kap 2012].

Die Behandlung der CFLD bezweckt die Verhinderung der weiter fortschreitenden Leberschädigung und die Verhinderung von Komplikationen (z.B. portale Hypertension und Zirrhose). Dosis-Effekt-Studien zeigen, dass eine Dosis von 20 mg pro kg Körpergewicht und Tag am effektivsten ist. Diese Dosis ist höher, als die Dosis, die bei anderen Lebererkrankungen verabreicht wird [Co(2) 1992].

Trotzdem existiert kein 100%-iger Beweis, dass UDCA eine progressive Leberfibrose bei CF verzögern oder rückgängig machen kann. Die Gabe von UDCA ist dennoch weit verbreitet in der Therapie der CFLD, auch wenn die prophylaktische Gabe von UDCA bei fehlender Leberdysfunktion nicht erforscht ist [Di 2001], [Che 2000]. Asymptomatische Patienten mit einem frühen Stadium der CFLD profitieren mit höherer Wahrscheinlichkeit von der UDCA-Anwendung [Co 2007].

Um die Progression der CFLD zu verlangsamen, sollte darüber hinaus ein besonderes Augenmerk auf das Nahrungsbedürfnis des Patienten gelegt werden [Co 2006]. Außerdem sollte sorgfältig auf die Energieaufnahme und die Zuführung fettlöslicher Vitamine geachtet werden. Die Proteinaufnahme sollte nicht reduziert werden, es sei denn, es liegen ein dekompensiertes Leberversagen oder eine hepatische Enzephalopathie vor. Die portale Hypertension und ihre Komplikationen sowie die dekompensierte Lebererkrankung werden genauso therapiert wie Patienten mit Zirrhose anderer Ätiologie. Eine Lebertransplantation sollte als letzte Möglichkeit der Therapie in Betracht gezogen werden [Di 2001], [Ko 2014].

Die Prognose und die Handhabung der chronischen Lebererkrankungen bei Kindern hängen größtenteils vom Ausmaß und der Progression der Leberfibrose ab, weil eine geringfügige Fibrose oft das wichtigste Anzeichen für das Vorliegen einer CFLD darstellt und die Indikation für potentielle Therapien bedeutet [Th 2010], [Leo 2008].

Weitere therapeutische Strategien wie die zielgerichtete Gentherapie der Leber [Ya 1993] und die pharmakologische Korrektur der defekten Ionentransportfunktion befinden sich im Forschungsstadium [Roma 1999], [Spi 2005]. Der sogenannte Docosaheptaensäureersatz führt zu einer signifikanten Milderung des Ausmaßes der Lebererkrankung in einem langlebigen CFTR Knockout-Mouse-Model mit einer auffallenden Reduktion der periportalen Inflammation [Beh 2007]. Die günstige Auswirkung dieser Therapie, welche mit der Inhibierung von Zytokinen und/oder des Eicosanoidmetabolismus in Zusammenhang steht, muss noch in klinischen Studien bestätigt werden [Co 2007]. Des Weiteren existiert neuerdings eine weitere Therapieoption, Ataluren (PTC124), ein Medikament, welches den Translationsprozess an den Ribosomen beeinflusst, um die Produktion von funktionierendem CFTR zu induzieren [Wi 2011].

## 2.3 Transiente Elastographie

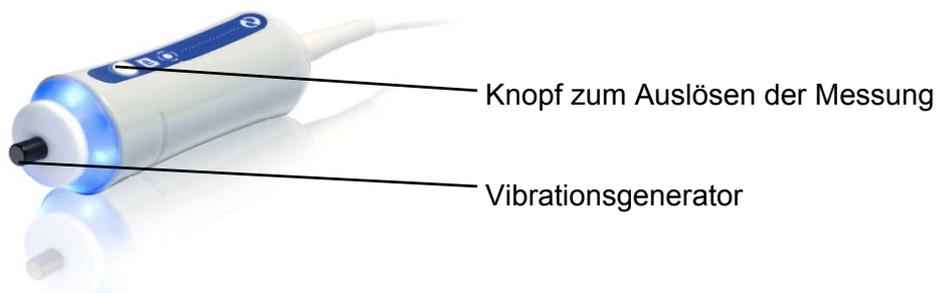
### 2.3.1 Aufbau des Gerätes



**Abb. 2:** Aufbau des Gerätes der transienten Elastographie (FibroScan®, Echosens, Paris, Frankreich)  
(modifiziert nach

<http://www.medizin2.ukwuerzburg.de/typo3temp/pics/4dbbed2632.jpg>) (letzter Zugriff:

22.10.2012) [med 2012]



**Abb. 3:** Ultraschallsonde des Gerätes (modifiziert nach <http://www.medizin2.ukwuerzburg.de/uploads/pics/fibro1.jpg>) (letzter Zugriff: 22.10.2012) [med 2012]

### 2.3.2 Funktionsweise des Gerätes

Die TE (FibroScan®; Echosens, Paris, Frankreich) ist eine nicht-invasive, benutzerfreundliche und schnelle Untersuchung, die eine objektive und reproduzierbare Messung der Lebersteifigkeit liefert [Sa 2003], [Cob 2007], [Ca 2008], [Ye 2008], [Roc 2008]. Darüber hinaus wird mit dieser Methode eine exzellente Interbeobachterübereinstimmung in Verbindung gebracht [Fr 2007]. Dieses auf Ultraschall basierende Verfahren ist eine neue Technologie, die die Generierung von gepulsten Echo-Ultraschallsignalen zur Messung der Lebersteifigkeit bei Kindern und Erwachsenen umfasst [Lé 2007].

Das Gerät generiert eine elastische Welle mittels eines Vibrationsgenerators, die auf die Thoraxwand auf der Höhe des rechten Leberlappens appliziert wird. Der Vibrationsgenerator sendet kurz ein Signal mit niedriger Amplitude (Vibration und Frequenz) in die Leber, welches eine elastische Scherwelle induziert, die sich im Lebergewebe ausbreitet. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der dadurch erzeugten Welle in der Leber wird mittels Ultraschallsignalen gemessen. Aus der Ausbreitungsgeschwindigkeit ( $V$ ) und der Dichte der Leber ( $\rho$ ) lässt sich die Steifigkeit des Lebergewebes ( $E$ ) in kPa berechnen. Folgende Formel wird für die Berechnung herangezogen:  $E = 3\rho V^2$ . Die Puls-Echo Ultraschalltechnik erlaubt die Messung der Geschwindigkeit der Welle, ausgedrückt in Kilopascal, die direkt proportional zur Lebersteifigkeit ist [Sa 2003], [Del 2009], [Fra 2007], [Cob 2007], [Fr 2007].

Je fester das Gewebe, also je höher die Steifigkeit des Lebergewebes in kPa, desto schneller verbreitet sich die Scherwelle und desto schneller ist somit die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Die Steifigkeit des Lebergewebes wird dem Untersuchenden für jede einzelne Messung vom Gerät angezeigt. Zeitgleich berechnet das Gerät den Median aller bisher an einem Patienten durchgeführten Messungen.

Die in den Untersuchungen gemessene Lebersteifigkeit variiert zwischen 2,5 und 75 kPa. Dabei liegt die normale Lebersteifigkeit zwischen 4 und 6 kPa, wohingegen bei Zirrhose die Lebersteifigkeit generell mehr als 12-14 kPa beträgt [Sa 2003], [Del 2009], [Fra 2007], [Cob 2007], [Fr 2007].

Standardmäßig sollten bei der TE zehn valide Messungen pro Patient durchgeführt werden. Die Erfolgsrate ist definiert als das Verhältnis zwischen der Zahl an validen Messungen und der Gesamtzahl der Messungen. Der Medianwert gilt als repräsentativ für den elastischen Betrag der Leber. Eine Untersuchung mit zehn validen Messungen,

einer Erfolgsrate von mehr als 60 % und einem Interquartilbereich (IQR) kleiner als Medianwert/3 gilt als zuverlässig [Fra 2007], [Lu 2009], [Fr 2007]. In 90-96 % der Gesamtuntersuchungen wird eine Erfolgsrate von mindestens 60 % erzielt. Die Dauer der Untersuchung beträgt zwischen fünf und zehn Minuten [Sa 2003], [Fr 2007].

Mit der M-Mode-(Time-Motion-Mode)-Technik kann Lebergewebe von anderen Geweben, insbesondere Darm und Lunge, unterschieden werden. Auch größere Gefäße, welche bei der Untersuchung gemieden werden sollten, können hiermit identifiziert werden. Eine erfolgreiche Messung ist nur im Lebergewebe, nicht in anderen Organen, möglich. Studien haben eine Korrelation der gemessenen Steifigkeit des Lebergewebes mit dem Fibroestadium aufgezeigt und entsprechende Schwellenwerte zur Interpretation der Ergebnisse anhand des jeweiligen Studienkollektivs gebildet [Fr 2007].

Während ein Leberstanzbiopsiezylinder nur ein Areal von 1:25.000 bis 1:50.000 der gesamten Leber repräsentiert, umfasst der im Rahmen der FibroScan-Untersuchung beurteilte Gewebezylinder ein Areal von 1:500 des Lebergewebes [Fr 2007]. Die TE erlaubt vielfach Ablesungen von geringfügig verschiedenen Bereichen, dadurch werden Daten von einer größeren Stichprobe bereitgestellt. Somit können Stichprobenfehler, die mit einer Leberbiopsie assoziiert sein können, eliminiert werden [No 2011]. Die TE hat einige attraktive Eigenschaften über ihre Nicht-Invasivität hinaus. Am wichtigsten ist, dass die TE eine relativ große Stichprobe (Volumen, welches näherungsweise aus einem Zylinder von 1 cm Breite und 4 cm Länge besteht) der Leber untersucht. Diese ist, verglichen mit einer Probe aus einer Leberbiopsie, geschätzt einige 100mal größer [Sa 2003], [Del 2009], [Fra 2007], [Cob 2007], [Ca(1)2008].

Studien haben eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der FibroScan-Untersuchungen mit einer hohen Intra- (96-98 %) und Interuntersucher- (89-96 %) Übereinstimmung aufgezeigt. Die Durchführung der FibroScan®-Untersuchung kann leicht erlernt werden und braucht nur wenige Übungsstunden unter Anleitung [Fr 2007].

Allerdings gibt es einige technische Einschränkungen bei der TE. Für ein Pulssignal von hoher Qualität, muss ein direkter und relativ kurzer Weg zur Leber gegeben sein. Die Eindringtiefe ist begrenzt. Somit ist es schwierig, die TE bei adipösen Patienten oder Patienten mit Aszites durchzuführen. Weiterhin können die Rippen das Signal undeutlich machen. In etwas mehr als 10 % der untersuchten Patienten kann das Minimum von zehn validen TE-Messungen nicht erreicht werden. Es ist wahrscheinlich, dass neue Schallköpfe zumindest einige dieser Defizite überwinden können. Die Kom-

bination von TE und anderen nicht-invasiven Tests kann helfen, eine bessere Untersuchung des Status der Fibrose zu ermöglichen [No 2010], [Lé 2007], [Fra 2007].

#### 2.4 Biomarker als Laborparameter für den Nachweis einer Leberfibrose

In der gesunden Leber stellt sich die Homöostase der extrazellulären Matrix (ECM) als ein kontinuierlich präzise regulierter andauernder Umsatz mit Hilfe von einer Gruppe von Enzymen, den Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs), dar [Hem 2007]. Bei chronischer Leberschädigung werden hepatic stellate cells – hepatische Sternzellen (HSCs) aktiviert und differenzieren sich in einen fibroblastenähnlichen Phänotyp. In aktivierten HSCs ist speziell die Expression von TIMP-1 hochreguliert, welche zu einer Inhibierung der Aktivität der MMPs und nachfolgend zu einer Akkumulation von Matrixproteinen im Extrazellularraum führt. Eine substanzielle Veränderung der ECM-Zusammensetzung stellt die Ablagerung von Kollagen dar, hauptsächlich fibrillen-formende Typen wie Typ I, II und IV, welche in fibrotischer ECM bis auf das Zehnfache ansteigen [Sc 2001]. Daher liegt es nahe, dass diese Gruppe von Enzymen im dysregulierten Zustand zu einer Fibrose der Leber beitragen kann [Hem 2007].

Von den bekannten MMPs werden nur einige im Lebergewebe exprimiert und unter den verschiedenen Spezies müssen Unterschiede zwischen dem Genotyp und der Aminosäuresequenz betrachtet werden.

Als Hinweis auf Leberfibrose bzw. eine Fibrogenese kommen verschiedene Fibrose-Biomarker in Betracht. Dazu gehören die Familie der MMPs, TIMPs, Hyaluronsäure (HA), Prokollagen III (PIIIP) und YKL-40, aber auch M30 und M65. Diese Marker sind sowohl an der Umsetzung der ECM, als auch an der Aktivierung von Zellen, die ECM produzieren, beteiligt [Nø 2003].

Als weitere neuere Fibrose-Biomarker werden auch Micro-RNAs (miR) betrachtet. Diese werden ebenfalls im Serum gemessen. Die kombinierte Verwendung der Serum miR-122, miR-21 und miR-25 könnte klinischen Nutzen für die frühzeitige Diagnose einer CFLD bringen und wenn sie in Kombination mit Serum miR-210, miR-148a und miR-19a verwendet wird, ist es möglich Patienten mit früher Leberfibrogenese (F0-F1) zu detektieren. Es ist somit nicht-invasiv möglich Kinder mit CFLD mit Fibrose (F1-F4) von denen mit keiner Fibrose (F0) zu unterscheiden [Coo 2015]. Außerdem wurden noch zwei weitere mögliche Fibrose-Biomarker beschrieben. Sowohl TIMP-4, als auch Endoglin sind erhöht bei Patienten mit CFLD und können im Zusammenhang mit der TE die Sensitivität für die nicht-invasive Diagnose einer CFLD steigern [Ra 2013].

### 2.4.1 Matrixmetalloproteinasen

Die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) besteht aus zinkabhängigen proteolytischen Enzymen. Diese beinhalten bislang 22 verschiedene Arten von MMPs [Som 2003]. Obwohl alle von ihnen ein breites Substratspektrum aufweisen, werden sie basierend auf ihr hauptsächliches Substrat in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysins, Matrilysins, Metalloelastasen, Membrantyp-MMPs (MT-MMPs) und andere eingeteilt. MMPs werden als Zymogene sezerniert und durch Spaltung ihres Propeptids aktiviert. Die Aktivität der MMPs wird durch die Bindung der TIMPs reguliert [Hem 2007].

MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-14 (Membrantyp-MMP1, MT1-MMP), welche zur Leberschädigung führen, werden von HSCs während ihrer Aktivierung exprimiert [Kni 1999], [Ik 1999]. Die Aktivierung von MMP-2 wird durch MMP-14 vermittelt und vollzieht sich an der Zellmembran durch die Formation eines ternären Komplexes von pro-MMP-2, TIMP-2 und MMP-14 [Stro 1995]. MMP-2 ist ein autokriner Proliferations- und Migrationsfaktor für HSCs [Ik 1999], [Beny 1999].

MMP-3 (Stromelysin-1) wird vorübergehend in frühen HSC-Aktivierungsstadien exprimiert [Kni 1999] und es hat sich gezeigt, dass mehrere pro-MMPs wie MMP-1, -3, -7, -8, -9 und -13 durch Spaltung des Propeptids durch MMP-3 aktiviert werden [Su 1990], [Na 1990], [Im 1995], [Knä 1993], [Og 1992], [Knä 1996].

MMP-9 (Gelatinase B) wird von Kupfferzellen in Primärkultur [Kni 1999], von IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -stimulierten Hepatozyten [Gia 2006], IL-1 $\alpha$ -stimulierten HSCs [Han 2004] und in Alkohol- oder Kohlenstofftetrachlorid (CCl<sub>4</sub>) induzierter Leberschädigung [Ro 2006] hergestellt. MMP-9 wird von MMP-3 aktiviert, welches durch Plasmin aktiviert wird [Ramo 1999]. Bei Lebererkrankungen sind HSCs [Han 2004] und inflammatorische, mononukleäre Zellen z.B. Lymphozyten und Neutrophile auch Ursprungsort einer MMP-9 Synthese [Kni 2000].

MMP-13 wird von HSCs [Ir 1997], [Kni 1999], Fibroblasten, Kupfferzellen und Perisinusoidalzellen [Wat 2000] exprimiert und seine Synthese kann mit Hilfe von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder EGF hochreguliert werden [Kni 1999], [Han 2004], [Lee 2003], [Sak 2004], [Yas 2004]. Die MMP-1/MMP-13 Aktivierung vollzieht sich gewöhnlich in einem Zwei-Schritt-Mechanismus über Plasmin und MMP-3 [Su 1990] oder über MMP-14 und MMP-2 bei Fehlen von TIMP-2 [Knä 2002]. MMP-13 kann das umgebende Gewebe abbauen, um neu synthetisierte ECM ablagern zu können [Hem 2007].

#### 2.4.2 Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen

Bislang wurden vier verschiedene Typen von Inhibitoren der MMPs (TIMPs) identifiziert: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4. Alle bekannten MMPs können von mindestens einem der vier TIMPs inhibiert werden. Dennoch gibt es individuelle Unterschiede bezüglich der Bindungsstärke und folglich dem Ausmaß der Inhibierung einer bestimmten MMP. Hinsichtlich des Phänomens der Fibrose spielen TIMP-1 und TIMP-2 eine ausschlaggebende Rolle [Ir 1997], [Roe 1993], [Roe 1997].

Die vier TIMPs haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Fibrogenese im Lebergewebe. Ein initialer Beweis in Bezug auf die Verbindung von TIMP-1 und TIMP-2 und hepatische Fibrose beruht auf Ergebnissen von Rattenhepatozyten. Bei diesen Versuchen stimulierte die Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen die Transkription von beiden Genen [Roe 1993], [Roe 1994], [Roe 1995]. Später wurden erhöhte Expressionen von TIMP-1 und TIMP-2 in zwei Rattenmodellen mit Leberschädigung, die durch CCl<sub>4</sub>-Injektion und Gallengangsligierung induziert wurde, gezeigt [Roe 1997]. TIMP-1 und TIMP-2 werden hauptsächlich von HSCs produziert [Ir 1997], [Herb 1997] und sind in einigen menschlichen Lebererkrankungen hochreguliert [Beny 1996], [Ir 1995].

Das TIMP-1 Protein bindet und hemmt aktivierte Kollagenasen um darauf das neu synthetisierte Kollagen vor dem unmittelbaren Abbau durch die MMPs zu schützen. TIMP-1 ist ebenfalls in der Lage, die Aktivierung von pro-MMPs, erwiesen in stimulierten HSCs [Han 2004], zu verhindern und programmierten Zelltod von HSCs, vermittelt über die Inhibierung von pro-MMP Aktivierung, und MMP Aktivität zu hemmen [Yo 2000], [Mur 2002]. TIMP-1 ist signifikant assoziiert mit der Fibrogenese in der Lunge [Ru 2003], [Se 2000], den Nieren [Joh 2002], [Hor 2002] und im Pankreas [Ph 2003], [Is 1998]. Deshalb stellt TIMP-1 ein zentrales Molekül in der Gewebsfibrose dar [Hem 2007].

TIMP-2 wird von Myofibroblasten in der Leber von Ratten, aktivierten HSCs und Kupfferzellen exprimiert [Kni 1999]. Bei chronisch toxischer Leberschädigung scheint die Bedeutung für die Fibrogenese von TIMP-2 auf die frühen Stadien beschränkt zu sein, und zwar dann, wenn ein vorübergehender Anstieg von TIMP-2 MMP-2 aktiviert und darauf ein perizellulärer Abbau der normalen Lebermatrix folgt. Die Notwendigkeit der Aktivierung von MMP-2 durch TIMP-2 wurde in Studien an Mäusen, die kein TIMP-2 bilden konnten, gezeigt. Diese Mäuse waren phänotypisch normal, funktionsfähig und fertil, waren aber nicht fähig, MMP-2 zu aktivieren. TIMP-2 ist demnach für

eine normale Entwicklung durchaus verzichtbar, für die MMP-2-Aktivierung in Mäusen hingegen ist TIMP-2 essentiell [Wa 2000].

### 2.4.3 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure (HA) ist ein Glykosaminoglykan mit hohem Molekulargewicht [Geo 2004], welches von ECM-produzierenden Zellen, Mesenchymzellen einschließlich aktivierter HSCs synthetisiert wird. Es zirkuliert durch das lymphatische System und ist diffus im Bindegewebe verteilt [Geo 2004]. Die zirkulierende Menge an HA dürfte nicht nur das Stadium der Erkrankung reflektieren, sondern auch den ECM-Metabolismus und die inflammatorische Aktivität innerhalb der Leber [Gu 2008]. HA spielt eine strukturelle Rolle in der Bindegewebsmatrix und ist in Zell-Zell-Interaktionen involviert. HA hat eine Halbwertszeit im Plasma von fünf bis sechs Minuten. In hohen Konzentrationen kommt sie in der Synovialis vor. Ihre Rolle besteht darin, Wasser zu binden und das Gelenk gleitfähig zu machen. Die Leber scheidet zusammen mit der Niere einen Großteil von HA aus. HA wird aus der Zirkulation durch die Bindung an das Adhäsionsmolekül CD44, welches sich an sinusoidalen Endothelzellen befindet, entfernt und nachfolgend in die Hepatozyten aufgenommen. Wenn es zu einer Fibrose kommt, verdicken sich die sinusoidalen Endothelzellen und sind so weniger permeabel für HA, weshalb die Reinigung von HA vermindert ist, wodurch HA im Serum ansteigt. Fibrose stimuliert außerdem die Mesenchymalzellen, wodurch noch mehr HA produziert wird [Har 2006].

In einer klinischen Studie, in der sich zufällig ausgewählte Kinder einer Leberbiopsie unterzogen haben, hat sich gezeigt, dass HA ein Marker von Fibrose darstellt [Har 2006]. Auch andere Studien haben gezeigt, dass HA sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Kindern einen interessanten Marker darstellt, welcher einer der besten Prädiktoren für Leberfibrose ist [Gu 2008], [No 2010], [LeeC 2013].

### 2.4.4 Prokollagen III

Das Prokollagen III (PIIIP=PIIINP) ist ein aminoterminales Propeptid des Typ III Kollagens, ein Spaltprodukt während der Umwandlung von Prokollagen III in Kollagen III [Ri 1988], welches einen Teil der bei Leberfibrose von HSCs hergestellten ECM, die im Disséraum abgelagert wird, ausmacht [Ben 1990], [Ta 2001], [Sm 1988]. PIIINP wird vom Typ-III-Kollagen-Precursormolekül Prokollagen III während der Bildung und des Wachstums von Kollagenfibrillen abgespalten [Fes 1978], [Ti 1981]. Weil dieses Propeptid leicht gelöst werden kann und im Serum vorkommt, wird davon ausgegangen, dass die PIIINP Serumwerte die Synthese von PIIINP widerspiegeln [Ben 1990]. Somit

kann die Höhe des PIIINP im Serum gemessen werden und eine Aussage über eine mögliche Fibrose liefern.

Einige Studien [Cho 1998], [Rohd 1983] haben gezeigt, dass PIIINP bei Fibrose/Zirrhose der Leber erhöht ist und ebenfalls einen Leberfibrose-Marker darstellt.

#### 2.4.5 YKL-40

YKL-40 gehört zur Familie 18 der Glykohydrolasen [Ha 1993], [Ren 1998] und ist ein Wachstumsfaktor von Bindegewebszellen und Endothelzellen [Mal 1999], [Ce 2001], [Re 2002]. Der Name YKL-40 leitet sich zum einen ab vom molekularen Gewicht des Proteins (40 kDa) und den drei Aminosäuren am Aminoterminus (Tyrosin, Lysin und Leucin) [Jo 1992]. Das Gen dieses Proteins wurde identifiziert, lokalisiert auf dem Chromosom 1 q31-q32 [Reh 1997] und die Struktur des Proteins ist beschrieben worden [Moh 2003]. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass YKL-40 ein Wachstumsfaktor von Fibroblasten [Re 2002], Chondrozyten und Synovialzellen [Ce 2001] und ein potenter Migrationsfaktor für Endothelzellen [Mal 1999] ist. Hämodynamische Studien zeigten, dass YKL-40 vom Hepato-Splanchnikusgebiet freigesetzt wird. In immunhistochemischen Studien von Leberbiopsien wurde festgestellt, dass in Arealen mit Fibrose, insbesondere in Bereichen mit beginnender Fibrose, eine positive Färbung für YKL-40 auftritt [Jo 1997], [Jo 2000]. Es wird angenommen, dass YKL-40 von HSCs sezerniert wird [Jo 2000], welche als wesentliche Effektorzellen in der Fibrogenese der Leber gelten [Fri 1993], [Fri 1999]. YKL-40 kann von Makrophagen [Ren 1998], und aktivierten Neutrophilen [Vo 1998] sezerniert werden.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass im Serum von Patienten mit Leberfibrose und alkoholischer Zirrhose sowie anderen Lebererkrankungen erhöhte Werte von diesen verschiedenen Markern zu verzeichnen sind [Nø 2003], [Ben 1990], [Jo 2000], [Jo 1997], [Ob 1997], [Tr 1992], [Tra 2000], [Ben 1987], [Sh 1992], [Sti 2001], [Ra 2011]. Des Weiteren gibt es Marker, die eine Zellapoptose anzeigen, z.B. M30 und M65. Caspasen werden während dieses Vorganges aktiviert und spalten verschiedene Substrate einschließlich Cytokeratin-18 (CK-18) [Leer 1999], [Fi 2003]. CK-18 in seiner voll ausgeprägten Moleküllänge kann von Caspase 6, 3 und 7 gespalten werden und es entstehen 2 Molekülfragmente mit etwa 30 kDa und 45 kDa Molekulargewicht. Das 30-kDa-Fragment kann von einem spezifischen Antikörper, M30, detektiert werden, während ein anderer Antikörper, M65, beide Fragmente zusammen detektieren kann [Schu 2004], [Cau 1997], [KuN 1997].

#### 2.4.6 M30

M30, ein monoklonaler Antikörper detektiert CK18Asp396 Neo-Epitop [She 2012], welches aus der Spaltung von CK-18 entstanden ist [Leer 1999], [Jok 2012]. Dieses Neo-Epitop ist ein Fragment, welches von CK-18 während der Zellapoptose durch Caspasen abgespalten wird, ein Hauptintermediärfilament Protein in Hepatozyten. Der Nachweis von M30-Werten im Serum spiegelt den Grad der hepatozellulären Apoptose wider und erlaubt speziell den Nachweis der Apoptose von Epithelzellen mit Hilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) [Jok 2012]. Im Grunde zeigt der M30-ELISA die Messung der Menge der laufenden Apoptose an [Alt 2015].

Joka et al. demonstrierten für verschiedene Lebererkrankungen erhöhte M30-Werte im Lebergewebe unter Verwendung des M30-ELISAs [Jok 2012]. Bei Patienten mit verschiedenen akuten und chronischen Lebererkrankungen wurden zudem erhöhte Serumwerte für Fragmente von CK-18, die durch Caspasen hergestellt werden, nachgewiesen [Ban 2000], [Ban 2001], [Sei 2005], [Kr 2005], [Vol 2008], [Gie 2011], [Vol 2006]. Diese Ergebnisse deuten an, dass man Fragmente von CK-18 als einen potentiellen Fibrose-Biomarker nutzen kann. Für die Entwicklung und Progression einer Leberfibrose wurden sowohl Apoptose als auch Nekrosevorgänge verantwortlich gemacht [Meha 2010].

#### 2.4.7 M65

M65 detektiert sowohl durch Caspasen gespaltenes, als auch ungespaltenes CK-18. Daher kann M65 als Marker für den Gesamtzelltod einschließlich Apoptose und Nekrose verwendet werden. Auch dieser Wert wird mit Hilfe eines ELISA bestimmt [Jok 2012], [Alt 2015].

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Single-Center-Studie im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie des Universitätsklinikums Gießen wurden im Zeitraum von Juni 2009 bis Dezember 2010 fortlaufend 75 pädiatrische Mukoviszidosepatienten prospektiv untersucht. Die Diagnose Mukoviszidose war vorab bei diesen Patienten mit Hilfe des Schweißtestes gestellt und später mit genetischen Tests bestätigt worden. Alle Patienten wurden gemäß der „European and U.S. Guidelines“ behandelt [Fa 2008], [Cast 2009], [Noa 1999]. Nachdem andere Ursachen für eine chronische Lebererkrankung ausgeschlossen worden waren, wurde die Diagnose der CF-assoziierten Lebererkrankung gemäß der neusten Leitlinien [De 2011] gestellt, wenn mindestens zwei der folgenden Bedingungen in mindestens zwei aufeinander folgenden Untersuchungen innerhalb eines Jahres vorlagen:

1. Hepatomegalie (Leberspanne mehr als 2 cm unter dem Rippenbogen in der Medioclavicularlinie) bestätigt mittels Sonographie,
2. Zwei pathologische Leberenzymwerte (ALT, AST,  $\gamma$ GT größer als die Obergrenze des Normalwertes),
3. Über die Hepatomegalie hinaus andere pathologische Auffälligkeiten der Leber in der Sonographie.

Die sonographische Darstellung der Leber wurde in fünf Kategorien klassifiziert: normal (US1); homogen hyperechogen (US2); heterogen (US3); nodulär (US4); Auftreten einer portalen Hypertension (US5) [Pat 1999], [De 2011].

Des Weiteren wurde im Rahmen der Studie zur Diagnosefindung einer Leberbeteiligung auch das Vorhandensein einer Therapie mit Ursafalk einbezogen.

33 von 75 Patienten, das entspricht 44 % der Patientenkohorte, trugen die Mutation  $\Delta$ F508 homozygot. Weitere 28 Patienten, 37 % der Patientenkohorte, waren heterozygot für diese Mutation. Dies bedeutet, dass die Mutation  $\Delta$ F508 bei 61 von 75, d.h. 81 %, Patienten dieses Patientenkollektivs nachweisbar war.

Bei den Patienten wurden regulär alle drei Monate routinemäßig folgende Untersuchungen durchgeführt: die Anamnese und körperliche Untersuchung des Patienten, eine Lungenfunktionsprüfung, wenn möglich eine Sputumprobe. Einmal jährlich erfolgte darüber hinaus eine Blutentnahme.

Das Serum wurde am Tag der Blutentnahme abzentrifugiert und für die spätere Bestimmung von Serummarkern (TIMP-2, YKL-40, Hyaluronsäure und Prokollagen-III) bei -80° C gelagert. Des Weiteren wurden MMP-1,-2,-8,-9 und -13 und TIMP-1 aus den Serumproben bestimmt.

### 3.1.1 Aufklärung der Patienten

Alle Patienten und deren Erziehungsberechtigte wurden über die Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung dieser Erhebung. Bei pädiatrischen Patienten unter 16 Jahren gaben die Erziehungsberechtigten ihre schriftliche Zustimmung an der Teilnahme zur Studie. Das Ethikvotum der zuständigen Kommission wurde vor Beginn der Studie eingeholt (Ethikvotum AZ 75/09 siehe Anhang).

### 3.1.2 Besonderheiten bei pädiatrischen Patienten

Da pädiatrische Patienten die Studienpopulation bildeten, gab es einige Besonderheiten zu beachten. Je nach Alter des Patienten war dessen Mitarbeit bei der Untersuchung eingeschränkt. So konnten z.B. bestimmte Atemmanöver nicht explizit umgesetzt werden. Weiterhin bedingt die Tatsache, dass pädiatrische Patienten engere Interkostalräume als Erwachsene aufweisen, eine schwierigere Durchführung der transienten Elastographie. Um dem zu begegnen, wurde im Rahmen der Untersuchung eine speziell für pädiatrische Patienten (Gewicht bis zu 15 kg) entwickelte Ultraschallsonde verwendet.

Darüber hinaus wurden für diese Studie auch eine Analyse des Blutes durchgeführt und verschiedene Serummarker bestimmt. Letzteres war zum Teil nicht durchführbar, da in der Regel jährlich nur eine Blutentnahme bei den Patienten erfolgte. Dies ist darin begründet, dass bei pädiatrischen Patienten sehr strenge Maßstäbe für schmerzhaftes Diagnostikverfahren wie Blutentnahmen gelten.

## 3.2 Geräte und Materialien

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Geräte und Materialien verwendet.

### 3.2.1 Geräte

- |                                |                                       |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| - Eismaschine AF-10            | Fa. Scotsman, Vernon Hills/USA        |
| - Gefrierschrank (-80°C)       | Fa. Sanyo-Biomedical, Bad Nenndorf    |
| - Analysenwaage Mod. FA 1500-2 | Fa. Faust, Schaffhausen/Schweiz       |
| - Zentrifuge GS-6 KR           | Fa. Beckman                           |
| - Zentrifuge Mikro 200 R       | Fa. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen |

- pH-Meter G32 Fa. Metrohn-Herisau, Schweiz
- Pipetten Typ Research Fa. Eppendorf, Hamburg
- Pipetten Typ Pipetman Fa. Gilson, Middleton/USA
- Multipette Fa. Slamed Ing. GmbH Laboratory Instruments, Frankfurt am Main
- Multipette® Plus Fa. Eppendorf, Hamburg
- Pipetboy Comfort Fa. Integra Biosciences GmbH, Fernwald
- Thermomixer 5436 Fa. Eppendorf, Hamburg
- Thermomixer Comfort Fa. Eppendorf, Hamburg
- Vortex Mixer Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau
- IKA-Combimag-RCO Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau
- Nikon Coolpix 5400 Fa. Nikon, Japan
- Perfusor Spritze Fa. Braun, Melsungen
- Filtriergerät Fa. NUNC, Wiesbaden
- ELISA Reader Fusion Fa. Packard BioScience, Meriden/USA

### 3.2.2 Chemikalien und Reagenzien

- Bovines Serumalbumin (BSA) Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching
- Tween 20 pure Fa. Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
- Substrate Reagent Pack Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Streptavidin-HRP Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
- Natriumchlorid (NaCl) Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid (KCl) Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Fa. Merck, Darmstadt
- Aqua dest Interne Ionenaustauscheranlage der Fa. Millipore Corporation Massachusetts/USA

- PBS (10fache Konzentration)  
hergestellt aus:
  - 80 g NaCl
  - 2 g KCl
  - 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 11,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
 aufgelöst in ca. 900 ml Aqua dest und danach auf 1 l aufgefüllt
- PBS (einfache Konzentration): 100 ml PBS (10fache Konzentration) aufgelöst in 900 ml Aqua dest; pH-Wert auf 7,4 eingestellt

### 3.2.3 Verbrauchsmaterialien

- Mikrotiterplatten Maxisorb Fa. NUNC GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Serologische Pipetten (5ml,10ml) Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
- Pipettenspitzen Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- ReagiergefäÙe Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- MikrozentrifugengefäÙe Fa. VWR™, Darmstadt
- ReaktionsgefäÙe Falcon (15ml, 50 ml) Fa. Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA
- Millipore Express Plus Membrane 0,22 µm Fa. Millipore Corporation, Massachusetts/USA

### 3.2.4. kommerzielle ELISA-Kits

- Human pro-MMP-1 Immunoassay Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human pro-MMP-2 Immunoassay Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human pro-MMP-9 Immunoassay Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human pro-MMP-8 Immunoassay Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human pro-MMP-13 Immunoassay Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human pro-MMP-9/TIMP-1 Immunoassay Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human TIMP-1 ELISA Kit Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- Human TIMP-2 ELISA Kit Fa. R&D Systems, Minneapolis/USA
- MicroVue YKL-40 EIA Kit Fa. Quidel® Corporation, San Diego/USA
- Human Procollagen III ELISA Kit Fa. Uschn Life Science, Wuhan/China
- Hyaluronic Acid ELISA Kit Fa. TECOmedical AG, Sissach/Schweiz

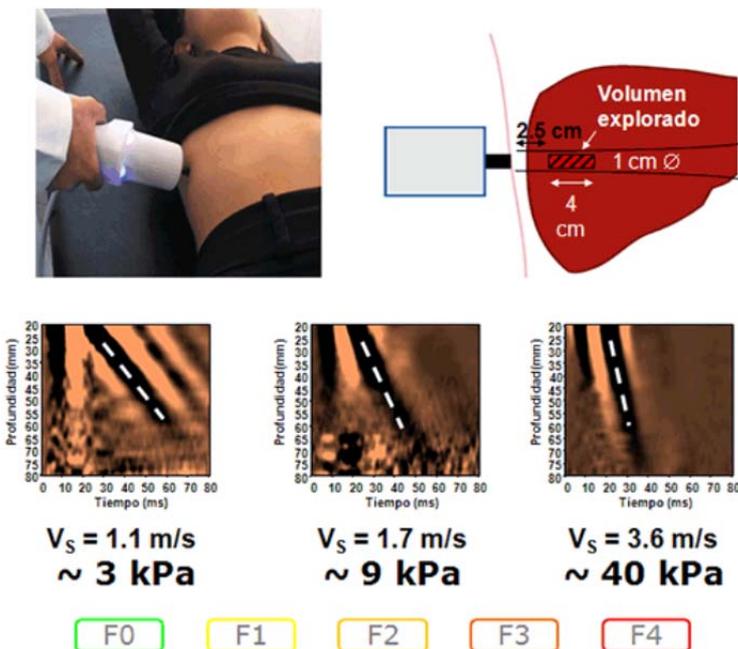
- M30-Apoptosense ELISA
- M65 ELISA

Fa. Peviva, Bromma/Schweden  
 Fa. Peviva, Bromma/Schweden

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Transiente Elastographie (TE)

Die Lebersteifigkeit mit Hilfe der TE wurde unter Nutzung desselben FibroScan® (Echosens, Paris, Frankreich) Gerätes bei allen Patienten untersucht. Die nicht-invasiven Messungen wurden von einem erfahrenen Untersucher geblindet zu dem klinischen Status der Patienten am rechten Leberlappen durch einen Interkostalraum mit einer Tiefe von 25 bis 65 mm von der Hautoberfläche durchgeführt. Bei Kindern, die ein Gewicht unter 15 kg aufwiesen, wurde die S-Ultraschallsonde, entwickelt für Lebersteifigkeitsmessungen bei Kindern, genutzt. Für jeden Patienten wurde der Lebersteifigkeitswert als Median von zehn erfolgreichen Messungen berechnet. Die TE wurde als valide betrachtet, wenn zehn erfolgreiche Messungen mit einer Erfolgsrate  $\geq 60\%$  und ein Interquartilbereich  $\leq 30\%$  vom Median erreicht wurden. Die Ergebnisse wurden in Kilopascal (kPa) ausgegeben. Die Untersuchungszeit belief sich auf rund fünf Minuten pro Patient.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der transienten Elastographie (modifiziert nach Castera et al. Journal of Hepatology 2008) [Ca(1)2008].

### 3.3.2 Klinische Routinelaborparameter

Einige klinische Laborparameter wurden im Rahmen der Routinebehandlung der in die Studie eingeschlossenen Patienten im Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Gießen (Direktor Prof. Katz, Prof. Renz) bestimmt. Es wurden folgende Parameter ermittelt: Hämoglobin, Thrombozytenzahl, Quick, INR, Gesamtprotein, Albumin, Gesamtbilirubin, Cholinesterase, GPT,  $\gamma$ GT, CRP und Ferritin.

### 3.3.3 Bestimmung von Biomarkern zum Nachweis einer Leberfibrose mittels ELISA

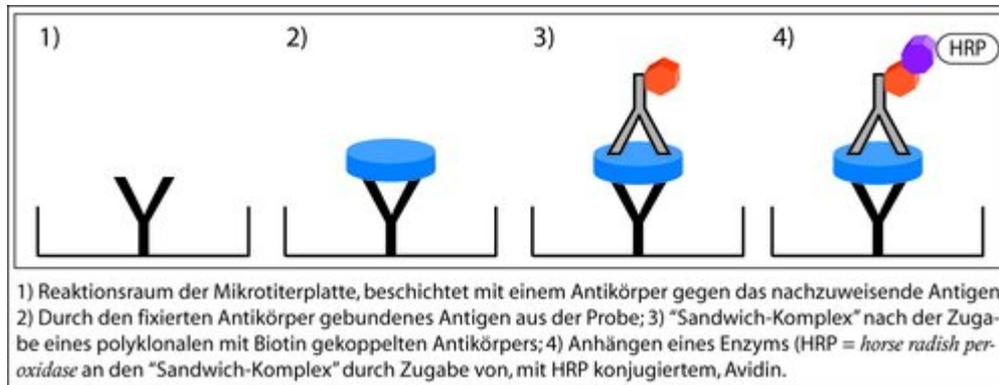
In den gewonnenen Serumproben des Patientenkollektivs wurden bestimmte Marker, die eine Fibrose in der Leber anzeigen können, gemessen wie TIMP-2, YKL-40, Hyaluronsäure und Prokollagen-III. Des Weiteren wurden auch MMP-1,-2,-8,-9 und -13, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1-Komplex, M30 und M65 in den Serumproben getestet. Diese Messungen wurden mittels ELISA durchgeführt. Es wurden Verdünnungen des Serums von 1:200 für TIMP-1 und TIMP-2, 1:13 für PIIP, 1:1 für HA und unverdünnt für YKL-40 verwendet. Weiterhin wurde Serumverdünnungen von 1:5 für MMP-1, 1:10 für MMP-2 und MMP-13, 1:50 für MMP-8, 1:1000 für MMP-9 und 1:20 für MMP-9/TIMP-1 Komplex angewendet. Bei M30 und M65 wurde das Serum ebenfalls unverdünnt verwendet.

Es wurden in dieser Studie zwei verschiedene ELISA-Prinzipien angewandt.

#### 3.3.3.1 Der Sandwich-ELISA

Beim Sandwich-ELISA wurde zuerst ein so genannter „Fangantikörper“ (capture antibody) an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) gebunden. Darauf folgte die Zugabe des zu untersuchenden Antigens. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde ungebundenes Antigen durch Waschen mit einem Waschpuffer entfernt und es blieb nur das an den Antikörper gebundene Antigen zurück. Danach wurde ein Detektionsantikörper (detection antibody) hinzugefügt. Dieser hat ebenfalls an das Antigen gebunden, es entstand ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex und vervollständigte somit das Sandwich. Antikörper, die nicht gebunden, also überschüssig waren, wurden durch Waschschritte entfernt. An den Detektionsantikörper war ein Enzym gebunden. Meistens handelte es sich um die Meerrettich-Peroxidase. Andere Enzyme wie Alkalische Phosphatase oder seltener Glucoseoxidase wurden ebenfalls verwendet. Es wurde ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben, welches vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wurde. Dessen Nachweis konnte im Anschluss durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz erfolgen. Für quantitative Nachweise wurde photometrisch die optische Extinktion gemessen und mit einer Kalibrierungskurve abgeglichen. Eine andere Möglichkeit der Durchführung dieses ELISA

bestand darin, die Kombination eines ungekoppelten Detektionsantikörpers und eines zusätzlichen sekundären Antikörpers, an den ein Enzym gebunden war, zu verwenden [ana 2012], [ant 2012], [En 1971], [Go 2003].



**Abb. 5:** Das Prinzip des Sandwich-ELISA (nach <http://www.uscnk.de/typo3temp/pics/77e704ecc5.jpg>) (letzter Zugriff: 19.10.2015) [us 2015] (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Chris Sun – cloud-clone.com)

### 3.3.3.2 Kompetitiver ELISA

Bei dieser Form des ELISA wird ein markiertes Kompetitor-Antigen verwendet, welches eine synthetische Verbindung darstellt, die dem zu untersuchenden Antigen strukturell ähnlich ist und sich auch an den Antikörper binden kann. Zuvor wird ein unmarkierter Antikörper an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) gebunden. Dann wird das zu untersuchende Antigen zugegeben und inkubiert. Wenn sich die Reaktion dann im Gleichgewicht befindet, wird das Kompetitor-Antigen zugegeben und tritt nun mit dem zu untersuchenden Antigen in Konkurrenz um einen Bindungsplatz am Antikörper. Das Signal ist indirekt proportional zur Konzentration des zu untersuchenden Antigens [ana 2012], [ant 2012], [En 1971], [Go 2003].

### 3.3.4 Ethikvotum

Die Studie wurde entsprechend der Helsinki Erklärung von 1975 ausgeführt. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen überprüft und genehmigt (AZ 75/09) (siehe Anhang).

### 3.3.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm SPSS 19.0 (IBM, Armonk, NY 2010) durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mittels des Kolmogorov-Smirnow-Tests [Ja 2013] überprüft und mit Hilfe von Histogrammen visualisiert. Aufgrund der

fehlenden Normalverteilung wurden Unterschiede zwischen TE-Werten und Serummarkern mittels Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben gemessen [We 2008]. Die Expression der Serummarker wird in Box-and-Whisker-Plots gezeigt. Die oberste und unterste Grenze der Box repräsentieren jeweils die 75. und die 25. Perzentile. Die Linie zeigt den Medianwert, die Fehlerbalken repräsentieren Maximum und Minimum. Werte, die 1,5-3fach Interquartilbereich von der Box abweichen, wurden als Ausreißer definiert (o). Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Die diagnostischen Leistungen von TE und Fibrose-Biomarkern wurden mit Hilfe von Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven gemessen [We 2008]. Die ROC-Kurve stellt eine Aufzeichnung der Sensitivität gegen (1-Spezifität) für alle möglichen Cut-off-Werte für die Vorhersage der Fibroestadien dar. Der am häufigsten genutzte Index der Genauigkeit ist die Fläche unter der ROC-Kurve (area under the ROC curve – AUROC) mit Werten dicht an 1,0, die eine hohe diagnostische Genauigkeit anzeigen. Basierend auf ROC-Analysen wurden optimale Cut-off-Werte für TE und Fibrose-Biomarker gewählt, um die Summe von Sensitivität und Spezifität zu maximieren und positive und negative Vorhersagewerte für diese Cut-off-Werte zu berechnen.

## **4. Ergebnisse und Auswertung**

### 4.1 Patientencharakteristika

Bei 30 pädiatrischen Patienten (40%) wurde anhand der mittels Untersuchung, Labor und Sonographie erfassten Kriterien eine CFLD diagnostiziert. Patienten mit einer CFLD hatten signifikant höhere Werte von GPT und  $\gamma$ GT und eine erniedrigte Prothrombinzeit verglichen mit den Patienten, die keine CFLD aufwiesen (Tabelle 1). Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine größere Anzahl von Mädchen im vorliegenden Patientenkollektiv eine Leberbeteiligung entwickelt hatte, als Jungen (Abb. 6). Bei den übrigen klinischen Daten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

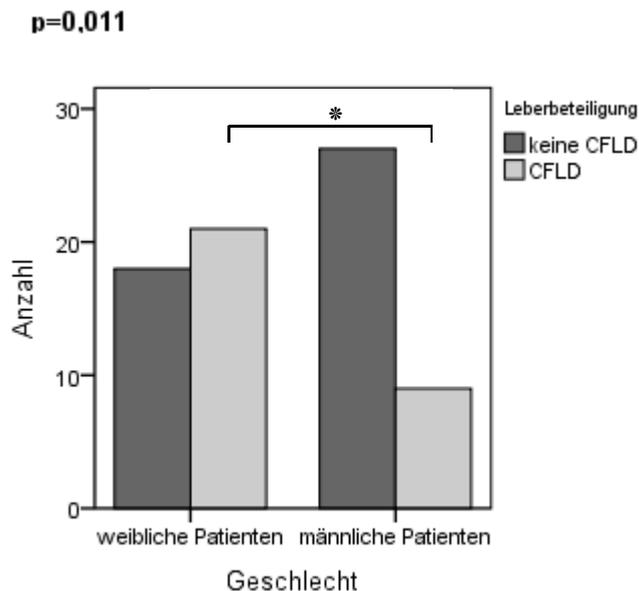
**Tabelle (1)**

Demographische und klinische Daten der Kohorte der pädiatrischen Patienten mit CF.

Charakteristik	Kinder mit Mukoviszidose (n=75)	
	Keine CFLD (n=45)	CFLD (n=30)
Demographische und klinische Daten		
männlich (n/%)	27/60%	9/30%
Alter (Jahren)		
Mittelwert (Median)+- SD	10,9 (11) +-4,9	10,6 (11,5) +-4,3
BMI SDS		
Mittelwert (Median) +- SD	-0,60 (-0,59) +-1,1	-0,62 (-0,54) +-0,99
Pankreasinsuffizienz (n)		
Exokrin	38	28
Exo- und Endokrin	0	1
Leberultraschall		
US1	27	10
US2	15	11
US3	3	2
US4	0	6
US5	0	1
<i>Biochemie</i>		
Alanin Aminotransferase (U/l)		
Mittelwert (Median) ±SD	24 (22) ±10,4	42,4 (33) ±23*
Bereich	10-60	16-88
γ-Glutamyl Transpeptidase (U/l)		
Mittelwert (Median) ±SD	15,6 (13) ±9,4	34,8 (20) ±42*
Bereich	7-47	6-164
Bilirubin (mg/dl)		
Mittelwert (Median) ±SD	0,35 (0,3) ±0,23	0,58 (0,4) ±0,46
Bereich	0,1-0,9	0,2-1,8
Gesamtprotein (g/l)		
Mittelwert (Median)	73,5 (73,0) ±5,3	76,6 (75,0) ±6,5
Bereich	65-88	68-91
Albumin (g/dl)		
Mittelwert (Median) ±SD	4,5 (4,5) ±0,34	4,3 (4,4) ±0,29
Bereich	4,1-4,8	3,5-4,8
Prothrombinzeit (%)		
Mittelwert (Median) ±SD	91 (90) ±11,2	83 (80) ±12,6*
Bereich	68-114	59-108
Thrombozytenzahl (*10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )		
Mittelwert (Median) ±SD	354 (333) ±104	305 (285) ±102
Bereich	241-757	71-475
Hämoglobinwert (g/dl)		
Mittelwert (Median) ±SD	13,7 (13,9) ±1,2	13,5 (13,4) ±1,1
Bereich	9,6-15,9	10,2-16
INR		
Mittelwert (Median) ±SD	1,04 (1,1) ±0,19	1,1 (1,1) ±0,1
Bereich	0,9-1,3	0,9-1,4
Cholinesterase (U/l)		
Mittelwert (Median)	10016,9 (9953,0) ±2188,1	10093,3 (9847,0) ±2725,4
Bereich	3045-13630	3539-14894
C-reaktives Protein (mg/l)		
Mittelwert (Median)	4,0 (0,0) ±9,3	2,5 (0,0) ±3,9
Bereich	0,0-58,1	0,0-13,7
Ferritin (mg/l)		
Mittelwert (Median)	28,1 (24,0) ±10,8	26,3 (24,0) ±8,1
Bereich	16-56	16-45

CFLD, Leberbeteiligung (cystic fibrosis associated liver disease); BMI SDS, Bodymassindex Wert der Standardabweichung. \* signifikant unterschiedlich, p&lt;0,05.

Häufigkeit der CF-assoziierten Leberbeteiligung (CFLD) in Abhängigkeit vom Geschlecht



**Abb. 6:** Häufigkeit der CF-assoziierten Leberbeteiligung (CFLD) in Abhängigkeit vom Geschlecht. Weibliche Mukoviszidosepatienten zeigten eine signifikant häufigere Leberbeteiligung, als männliche Mukoviszidosepatienten ( $p^*=0,011$ ).

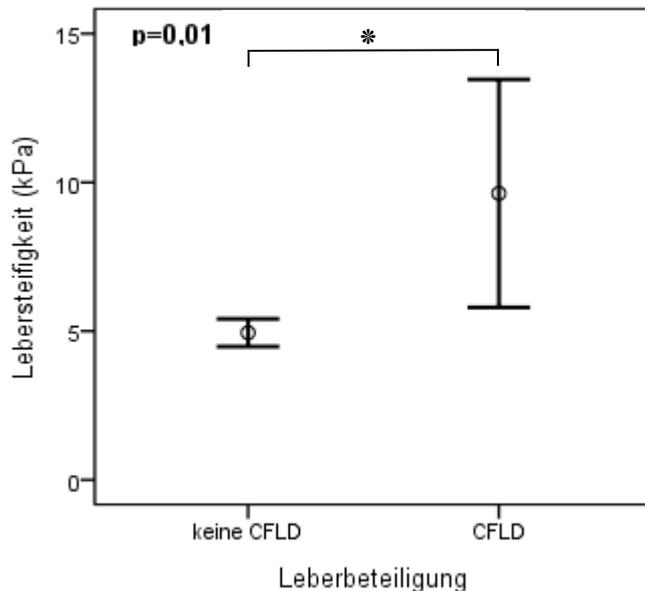
Es konnte somit demographisch festgestellt werden, dass Mädchen signifikant häufiger im vorliegenden Patientenkollektiv an Leberbeteiligung litten, als Jungen.

Danach wurden die Ergebnisse der TE im vorliegenden Patientenkollektiv untersucht.

#### 4.2 Erhöhte Lebersteifigkeit bei pädiatrischen CF-Patienten mit Leberbeteiligung

Die Lebersteifigkeit, die mit Hilfe der TE-Messungen ermittelt wurde, bewegte sich beim vorliegenden Patientenkollektiv in einer Spanne von 3 kPa bis 48 kPa. Bei Kindern mit CFLD war die Lebersteifigkeit signifikant erhöht (Abb. 7,  $n=75$ ; CFLD: 9,6 kPa vs. keine CFLD: 4,7 kPa,  $p=0,01$ .)

Lebersteifigkeit bei Patienten mit Mukoviszidose und damit assoziierter Leberbeteiligung



**Abb. 7:** Lebersteifigkeit bei Patienten mit Mukoviszidose und damit assoziierter Leberbeteiligung. Die Patienten mit einer Leberbeteiligung zeigten eine signifikant erhöhte Lebersteifigkeit (CFLD: 9,6 kPa vs. keine CFLD: 4,7 kPa,  $p=0,01$ ). Der signifikante Unterschied wurde hervorgehoben ( $*p < 0,05$ ). Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall, O Mittelwert der Lebersteifigkeit.

Im Anschluss haben wir Serum des vorliegenden Patientenkollektivs untersucht. Es wurden sowohl Patienten mit und ohne Leberbeteiligung untersucht. Bei einigen Fibrose-Biomarkern konnten Tendenzen festgestellt werden, andere hatten im vorliegenden Kollektiv keinen Einfluss auf die Leberbeteiligung.

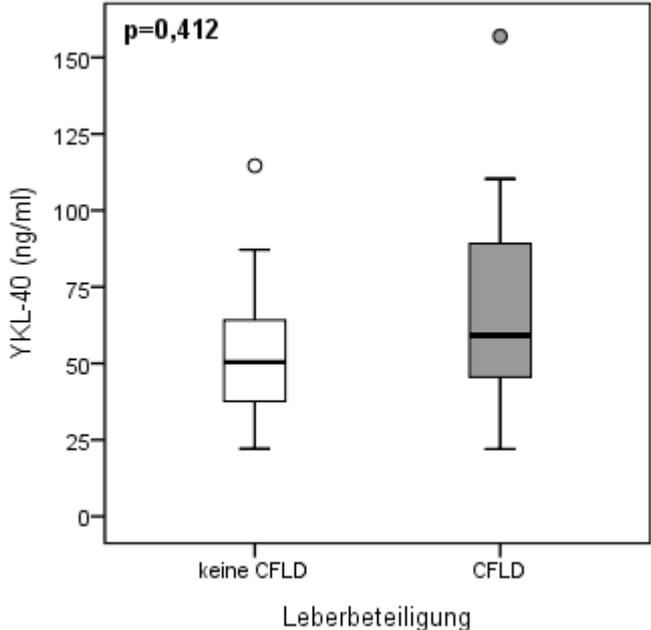
#### 4.3 Expression von Fibrose-Biomarkern bei CF-Patienten mit Leberbeteiligung

Serum für eine Fibrose-Biomarkeranalyse war bei 29 Kindern mit CF verfügbar. Hier von hatten 11 Patienten eine CFLD und 18 Patienten keine CFLD.

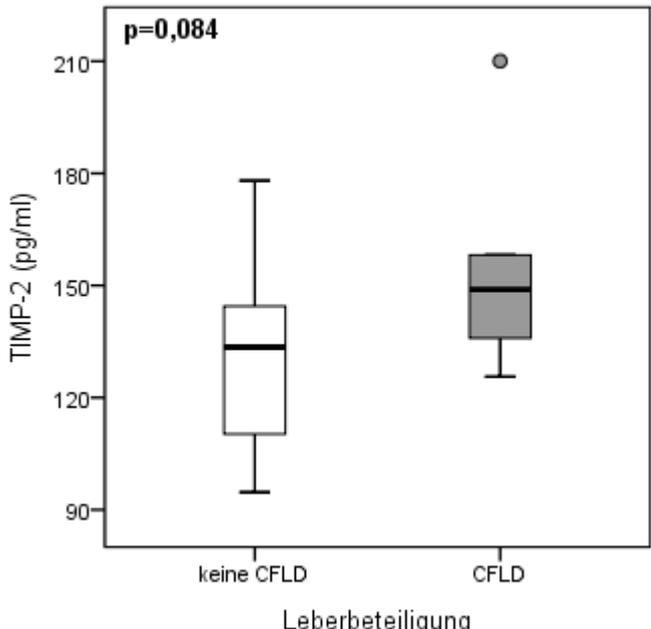
YKL-40 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Individuen mit CFLD und solchen ohne CFLD (Abb. 8A, CFLD: 59,2 ng/ml vs. keine CFLD: 50,4 ng/ml,  $p=0,412$ ). Kinder mit CFLD zeigten eine Tendenz zur erhöhten TIMP-2 Expression verglichen mit Kindern ohne CFLD (Abb. 8B). Jedoch erreichte diese Erhöhung keine statistische Signifikanz (CFLD: 149 pg/ml vs. keine CFLD: 133,5 pg/ml,  $p=0,084$ ). TIMP-1 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne CFLD (Abb. 8C). HA war nicht signifikant unterschiedlich zwischen Patienten mit und ohne CFLD

(Abb. 9, CFLD: 26,6 ng/ml vs. keine CFLD: 17,5 ng/ml,  $p=0,642$ ). PIIP und MMP-9 blieben in der vorliegenden Patientenkohorte unverändert, sowohl bei Patienten mit als auch ohne CFLD (Abb. 10A und B).

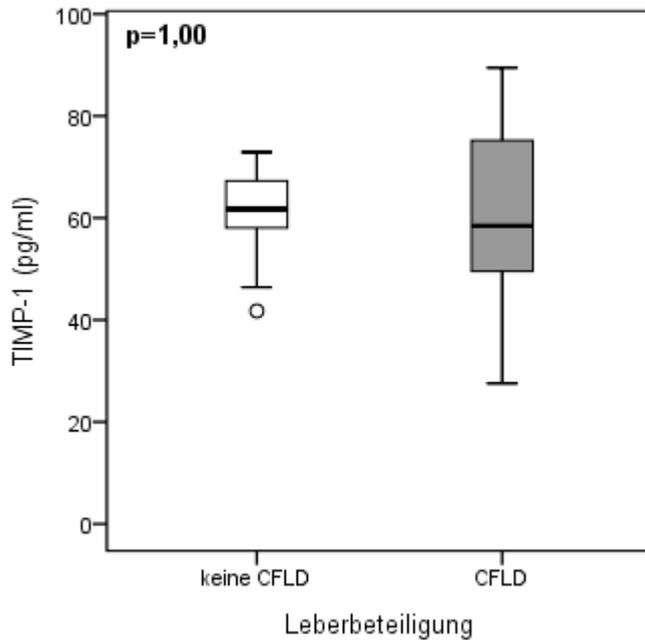
A Expression von YKL-40



B Expression von TIMP-2

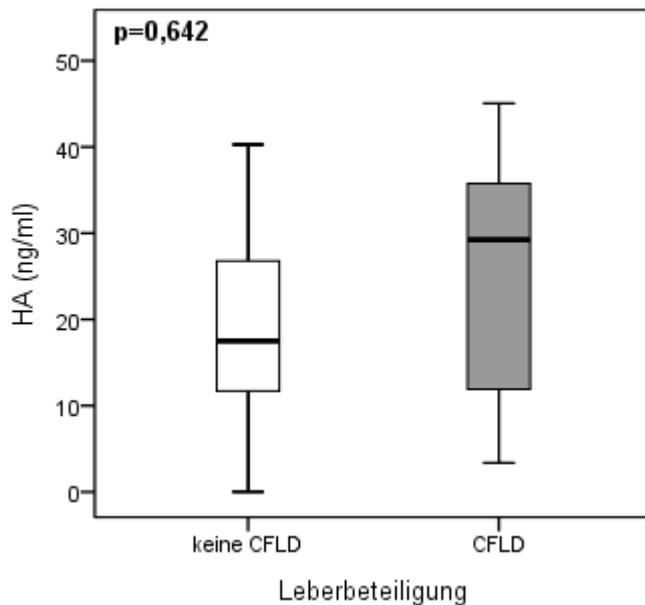


### C Expression von TIMP-1



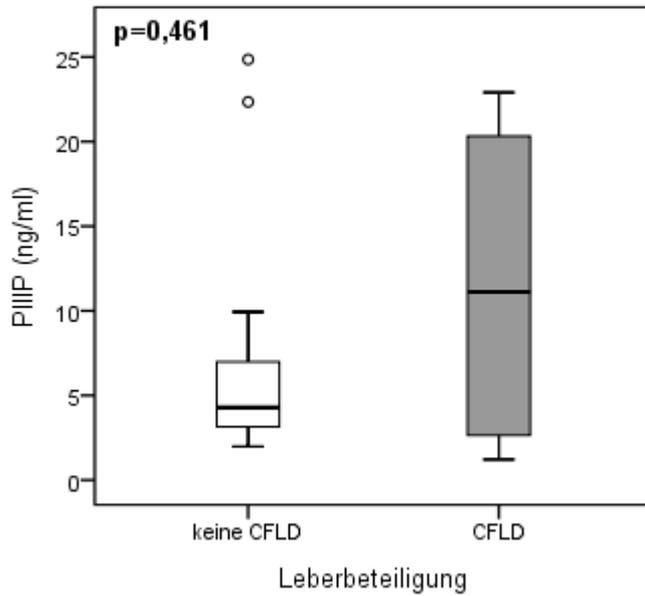
**Abb. 8:** Expression von YKL-40 (A), TIMP-2 (B) und TIMP-1 (C) bei Patienten mit Mukoviszidose und damit assoziierter Leberbeteiligung. Die YKL-40- und die TIMP-1-Expression zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit CFLD (n=11) und Patienten ohne CFLD (n=18). TIMP-2 war tendenziell erhöht bei Kindern mit CFLD, allerdings erreichte die Erhöhung dieses Wertes nicht den Wert der statistischen Signifikanz.

### Expression von Hyaluronsäure

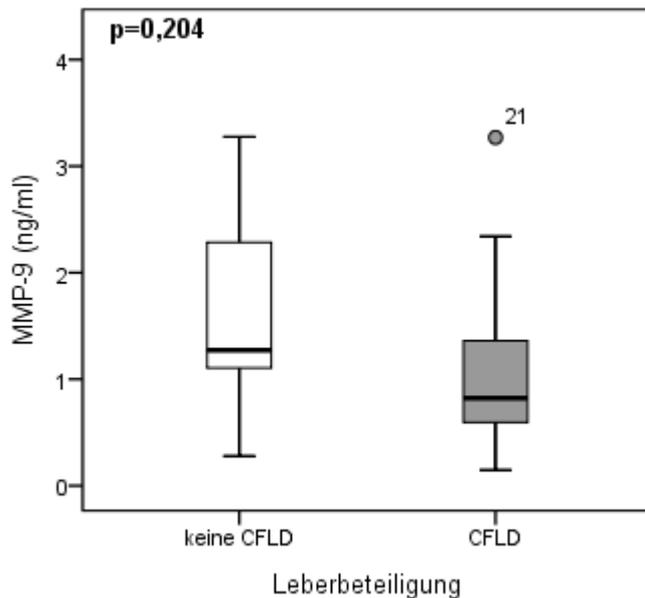


**Abb. 9:** Expression von Hyaluronsäure (HA) im Serum von Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD). HA zeigte den Trend zur Erhöhung bei Mukoviszidosepatienten mit einer CFLD (n=11) im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne CFLD (n=18). Allerdings erreichte diese Erhöhung keine statistische Signifikanz.

### A Expression von Procollagen III



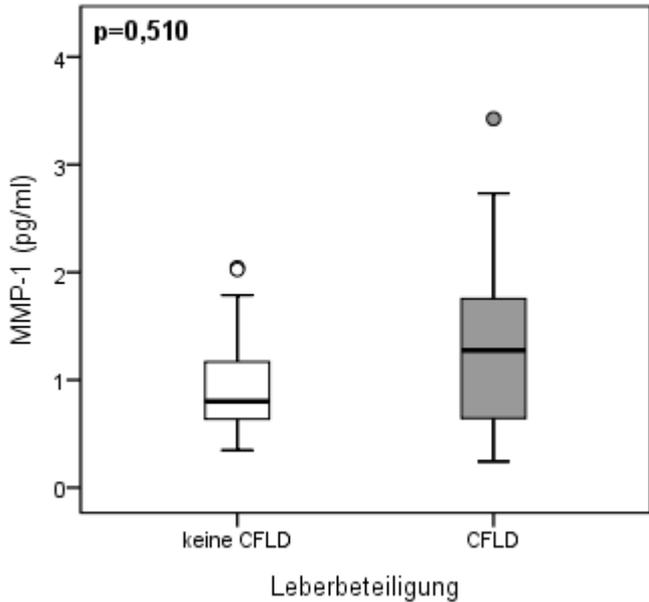
### B Expression von Matrixmetalloproteinase-9



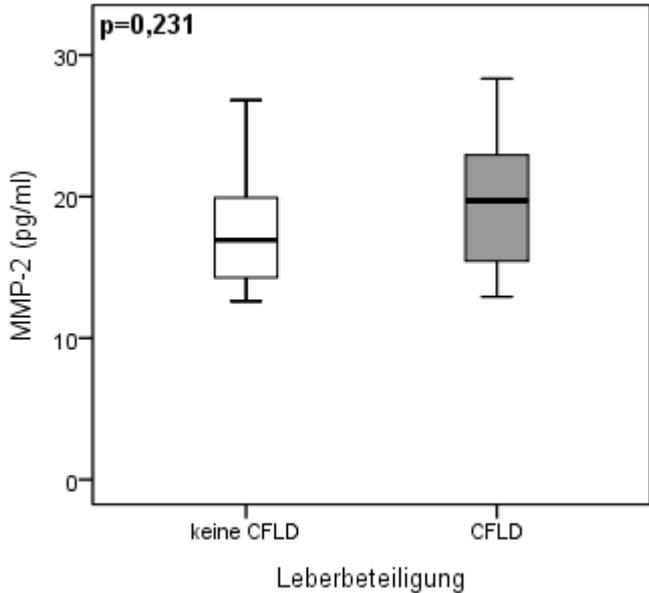
**Abb. 10:** Expression von Procollagen III (PIIP) (A) und der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) (B) im Serum von Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD). PIIP und MMP-9 blieben in der vorliegenden Patientenkohorte unverändert sowohl bei Patienten mit CFLD (n=11) als auch ohne CFLD (n=18).

Außerdem wurden noch weitere mögliche Fibrose-Biomarker untersucht und evaluiert: MMP-1, -2, -8 und -13, M30 und M65.

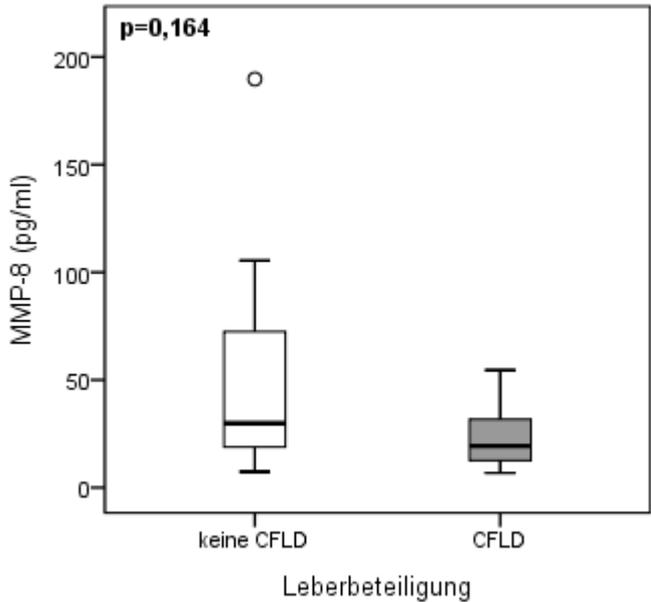
A Expression von Matrixmetalloproteinase-1



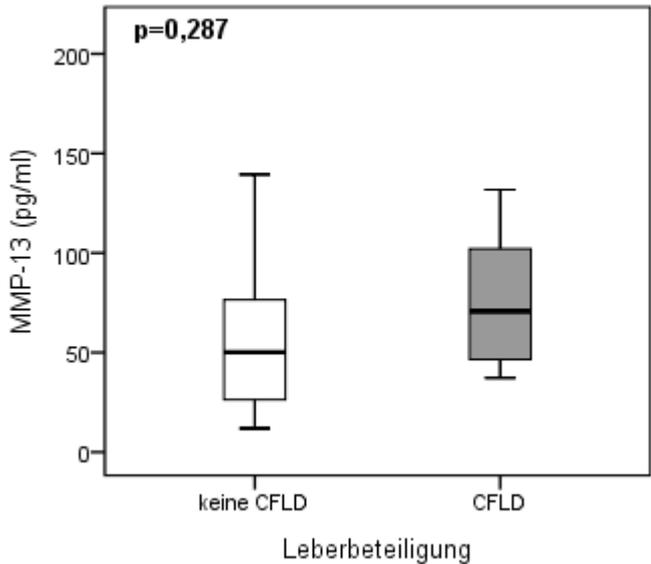
B Expression von Matrixmetalloproteinase-2



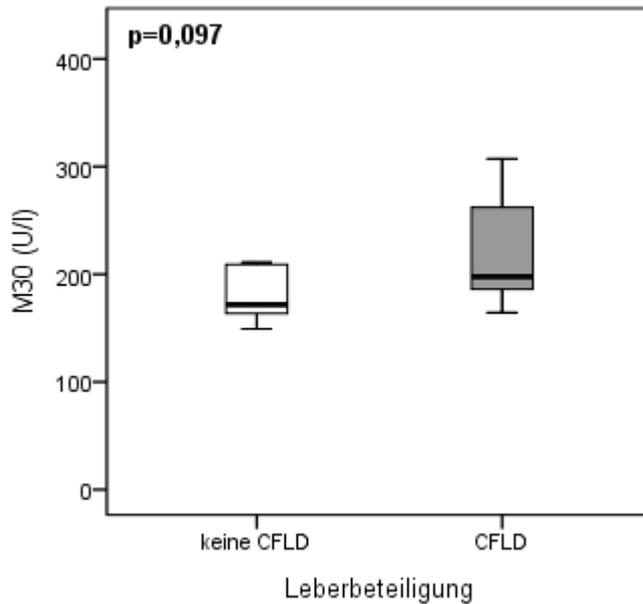
C Expression von Matrixmetalloproteinase-8



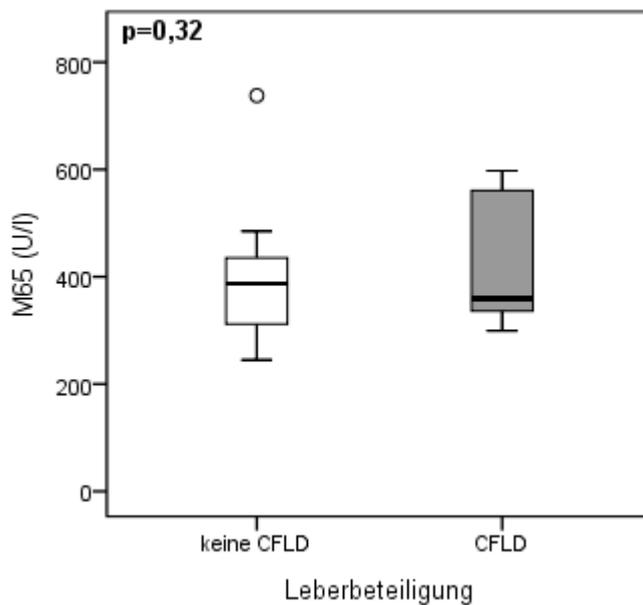
D Expression von Matrixmetalloproteinase-13



### E Expression von M30



### F Expression von M65



**Abb. 11:** Expression von Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) (A) der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) (B), der Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8) (C), der Matrixmetalloproteinase-13 (MMP-13) (D), M30 (E) und M65 (F) im Serum von Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD). Bei all diesen Fibrose-Biomarkern konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auch bei den potentiellen Biomarkern MMP-1, -2, -8, -13, M30 und M65 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen pädiatrischen Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD) und solchen ohne assoziierte Leberbeteiligung ermittelt werden (Abb. 11).

Weiterhin wurde der diagnostische Wert der TE bestimmt um festzustellen, ab welchem Wert in der TE in kPa man von einer Leberbeteiligung ausgehen kann. Außerdem wurde der optimale Wert für TIMP-2 bestimmt. Die diagnostische Aussagekraft konnte durch Kombination der beiden Komponenten verbessert werden.

#### 4.4 Diagnostische Aussagekraft von TE und Fibrose-Biomarkern zur Feststellung einer Leberbeteiligung bei CF

Um den diagnostischen Wert der TE und der Fibrose-Biomarker im Serum für die Feststellung einer CFLD direkt zu vergleichen, wurde ihre diagnostische Genauigkeit unter Nutzung von ROC-Kurven bestimmt.

Die höchste diagnostische Genauigkeit wurde für TIMP-2 (AUROC: 0,697) und TE (AUROC: 0,683) (Tabelle 2, Abb. 12) berechnet. Ein Cut-off-Wert von 5,5 kPa war bei TE optimal für die Diagnose einer CFLD (Tabelle 3). Betrachtet man die Biomarker zum Nachweis einer CFLD, hatte TIMP-2 einen optimalen Cut-off-Wert von 139 pg/ml (Tabelle 3). Zudem verbesserten sich die diagnostische Sensitivität und der negative prädiktive Wert der TE an diesem Cut-off-Wert erheblich, wenn dieser mit dem entsprechenden Fibrose-Biomarker für die Diagnose einer CFLD kombiniert wurde (Tabelle 3).

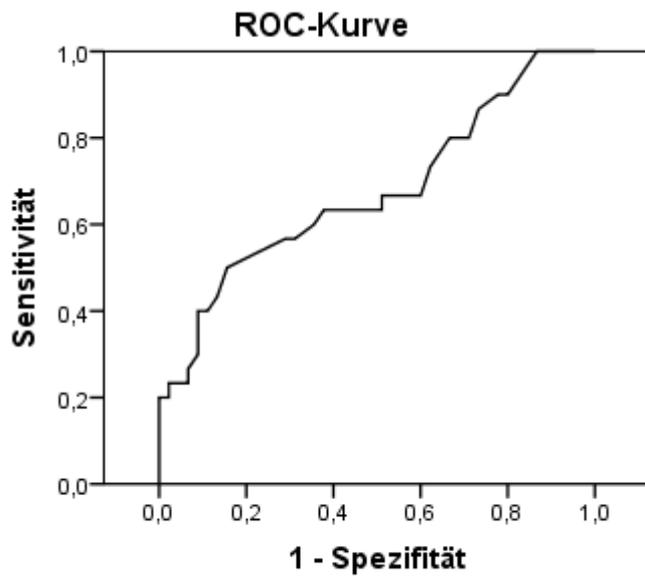
#### **Tabelle 2**

Diagnostische Genauigkeit der TE und der Fibrose-Biomarker für die Feststellung einer Leberbeteiligung bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten (n=75).

	ROC-Analyse		
	AUROC	95% CI	p-Wert
Transiente Elastographie	0,683	0,557-0,810	0,007
YKL-40	0,596	0,370-0,822	0,393
HA	0,556	0,307-0,804	0,621
TIMP-1	0,500	0,244-0,756	1,000
TIMP-2	0,697	0,503-0,891	0,080

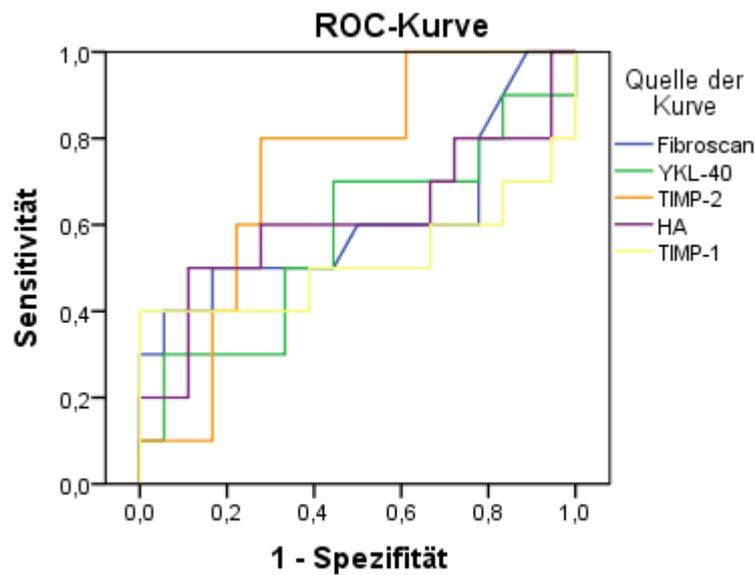
95% CI: 95% Konfidenzintervall

A



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

B



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

**Abb. 12:** Diagnostische Aussagekraft der transienten Elastographie (A+B) und experimenteller Fibrose-Biomarker (B) für den Nachweis einer Mukoviszidose assoziierten Lebererkrankung (CFLD). Die höchste diagnostische Aussagekraft für den Nachweis einer CFLD wurde für TIMP-2 (AUROC: 0,697) und für die transiente Elastographie (TE, Fibroscan: AUROC: 0,683) berechnet.

**Tabelle 3**

Diagnostische Leistungsfähigkeit der transienten Elastographie und der Fibrose-Biomarker für den Nachweis einer Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten (CFLD).

	Diagnostische Leistungsfähigkeit Cut-off	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPW (%)	NPW (%)
TE	5,5 kPa	53,3 (34,6-71,2)	77,8 (62,5-88,3)	61,5 (40,7-79,1)	71,4 (56,5-83)
TIMP-2	139 pg/ml	72,7 (39,3-92,7)	72,2 (46,4-89,3)	61,5 (32,3-84,9)	81,3 (53,7-95)
TE+ TIMP-2	5,5 kPa 139 pg/ml	95,2 (74,1-99,8)	47,8 (27,4-68,9)	62,5 (43,7-78,3)	91,7 (59,8-96)

## 5. Diskussion

Die CFLD, eine relevante Leberbeteiligung bei Zystischer Fibrose, hat je nach Studie eine kumulative Inzidenz von 27 % bis 35 % [Co 2002], [Li 1999]. Annähernd 5-10 % der Kinder mit CFLD entwickeln eine fortgeschrittene Fibrose und Zirrhose während der ersten Dekade ihres Lebens. Anschließend entwickeln die meisten dieser Fraktion während der zweiten Lebensdekade eine portale Hypertension (PHT) und die damit verbundenen Komplikationen [Co 2002], [Li 1999]. Unter den gegebenen Umständen werden dringend nicht-invasive diagnostische Tests für den Nachweis einer CFLD benötigt. Bezug nehmend auf die speziellen Anforderungen bei Kindern, sollten diese Tests ein schnelles aber präzises Screening in der täglichen Praxis ermöglichen und eine kosteneffektive longitudinale Verlaufskontrolle berücksichtigen. Die momentan angewandten Screeningmethoden weisen gravierende Limitationen auf wie geringe Sensitivität (Leberenzyme, Ultraschall), Invasivität und Stichprobenfehler (Leberbiopsie), Exposition durch Röntgenstrahlung (CT) und/oder hohe Kosten (MRI, ARFI) [Co 2006].

Innerhalb unserer Studie wurden vergleichsweise der diagnostische Wert der TE und eine Gruppe von experimentellen Fibrose-Biomarkern in einer der größten bisher publizierten Kohorten von pädiatrischen CF-Patienten analysiert. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass

- (a) die Lebersteifigkeit bei Kindern mit CFLD im Vergleich zu CF-Patienten, die keine CFLD haben, erhöht ist,
- (b) die TE eine hohe diagnostische Genauigkeit für das Vorliegen einer CFLD hat,
- (c) die diagnostische Sensitivität erhöht werden kann, wenn die TE mit Fibrose-Biomarkern zur Diagnose einer CFLD kombiniert wird.

Es wurden insgesamt 75 pädiatrische CF-Patienten, mit einem maximalen Alter von 18 Jahren untersucht. Damit handelt es sich um eine der bisher größten publizierten Studien an einer pädiatrischen Kohorte mit CF [Ra 2012]. Malbrunot-Wagner et al. untersuchten ein Jahr zuvor 18 Kinder mittels TE unter anderem mit der Fragestellung des Vorhandenseins von Ösophagusvarizen [Malb 2011]. Witters et al. untersuchten insgesamt 66 CF-Patienten mit Hilfe der TE, darunter waren allerdings 10 Patienten, die älter als 18 Jahre waren [Wit 2009]. Andere Studien schlossen zum Teil erwachsene Patienten mit ein oder untersuchten pädiatrische Patienten mit unterschiedlichen chronischen Lebererkrankungen. Menten et al. evaluierten z.B. 68 pädiatrische CF-Patienten, aber auch erwachsene Patienten und verglichen diese mit einer Kontroll-

gruppe von 31 Kindern [Me 2010]. Breton et al. untersuchten 20 CF-Kinder und weitere 52 Kinder mit anderen chronischen Lebererkrankungen [Bre 2009]. De Lédinghen et al. untersuchten zwar 116 Kinder allerdings mit unterschiedlichen Lebererkrankungen darunter nur 42 CF-Kinder [Lé 2007]. Neuere Studien evaluierten ein altersgemischtes Klientel, zum Beispiel 106 CF-Patienten im Alter ab 12 Jahren bis zum Erwachsenenalter (41 Jahre) [Fr 2013] oder 174 CF-Patienten im Alter zwischen 6 und 24 Jahren [Ci 2014].

### 5.1 Transiente hepatische Elastographie

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, bei denen eine erhöhte Lebersteifigkeit bei Patienten mit einer CFLD festgestellt wurde, bestätigen die Ergebnisse anderer Studien und geben darüber hinaus neue Erkenntnisse in Bezug auf die Höhe des Cut-off-Wertes für die TE. Bei 72 pädiatrischen Patienten, darunter 20 Patienten mit CF, zeigten Breton et al., dass Patienten mit einer Lebererkrankung signifikant erhöhte FibroScan®-Werte (im Mittel  $\pm$  8,9 kPa, mit portaler Hypertension  $\pm$  26,5 kPa, ohne portale Hypertension 6,45 kPa) aufwiesen [Bre 2009]. Weiterhin hatten in einer Studie von Menten et al. CF-Patienten mit einem hohen Ultraschall Score, der hinweisend auf eine CFLD ist, eine signifikant höhere Lebersteifigkeit verglichen zu Patienten mit einem niedrigen sonographischen Score [Me 2010]. Somit ist naheliegend, dass die TE als Verlaufskontrolle bei Lebererkrankungen von Patienten mit CF genutzt werden könnte [Me 2010]. Außerdem demonstrierten Witters et al., dass CF-Patienten, Kinder und Erwachsene, mit CFLD eine erhöhte mittlere Lebersteifigkeit (8,8 kPa) verglichen mit Individuen ohne CFLD (5 kPa) [Wit 2009] aufwiesen. 2012 wurde eine Studie veröffentlicht, in der Erwachsene mit einer CFLD höhere Werte in der TE aufwiesen als Patienten ohne CFLD [Kar 2012]. Verglichen mit den Ergebnissen von Witters und Kollegen, fanden wir ähnliche Werte in unserem Patientenkollektiv mit einer mittleren Lebersteifigkeit von 9,6 kPa bei CF-Patienten mit CFLD gegenüber CF-Patienten ohne CFLD mit einer mittleren Lebersteifigkeit von 4,7 kPa [Ra 2012]. Vergleichbare Werte werden auch bei Rath et al. 2013 beschrieben. Hier wurde eine mittlere Lebersteifigkeit bei CFLD-Patienten von 9,95 kPa gemessen und bei Patienten ohne CFLD eine Lebersteifigkeit von 4,3 kPa [Ra 2013].

In der vorliegenden Studie wurde die größte Passgenauigkeit für die TE bei einem Cut-off-Wert von 5,5 kPa mit einer Sensitivität von 53,3 % und einer Spezifität von 77,8 % erzielt. Kombiniert man die TE mit dem Fibrosemarker TIMP-2 so erhält man eine signifikant höhere Sensitivität von 95,2 %. Somit kann durch die Kombination von TE und TIMP-2 die Sensitivität deutlich verbessert werden. Legt man den bereits etablierten

Cut-off-Wert von 7 kPa zugrunde, wird eine Sensitivität von 26,7-30 % und eine Spezifität von 91,1-93,3 % gemessen. Auch Ciucă et al. verwendeten einen Cut-off-Wert von 5 kPa [Ci 2014], während in anderen Studien bei Friedrich-Rust et al. ein optimaler Cut-off-Wert von 7,1 kPa gemessen wurde [Fr 2013]. In einer weiteren Studie an erwachsenen Patienten wurde ein Cut-off-Wert von 6,8 kPa [Ki 2013] verwendet. Ähnliche Cut-off-Werte wurden auch bei Rath et al. 2013 (6,3 kPa) [Ra 2013] und bei Karlas et al. (5,9 kPa) ermittelt [Kar 2012]. Insgesamt zeigen die bisher publizierten Studien vergleichbare Cut-off-Werte zu unseren eigenen Ergebnissen.

Eine aktuelle Arbeit aus dem Jahr 2016 konnte in einer Follow-up-Studie über einen Zeitraum von 6 Jahren retrospektiv zeigen, dass die TE ein geeignetes Instrument zur Messung einer Leberbeteiligung bei CF darstellt [Va 2016]. In dieser Studie wurden 150 CF-Patienten eingeschlossen im Alter von 9-24 Jahren. 20 dieser Patienten hatten bei der ersten TE-Messung bereits eine CFLD, während 5 weitere Patienten im Laufe des Follow-ups eine CFLD entwickelten. Im Falle einer CFLD wurde im Median ein Wert von 14 kPa (8,7-32,2 kPa) gefunden, vs. ohne CFLD 5,3 kPa (4,9-5,7 kPa). Das Ergebnis einer TE von >6,8 kPa zeigte eine Sensitivität von 91,5 % und eine Spezifität von 91,7 % für die Vorhersage des Vorliegens einer CFLD [Va 2016]. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

### 5.2 Fibrosemarker im Serum

Seit vielen Jahren wird nach geeigneten Biomarkern, die eine Leberfibrose frühzeitig anzeigen können, gesucht. Einige dieser Marker wie Hyaluronsäure, PIIINP, MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 [Ben 1992], [Oh 2001], wurden als mögliche Fibrose-Biomarker diskutiert. Bis jetzt werden diese allerdings nicht in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. YKL-40 könnte in Zukunft einer der Marker sein, welcher potentiell die Leberbiopsie als Goldstandard ersetzen kann [Oh 2001]. In der vorliegenden Studie wurden diese und weitere Marker auf ihre Aussagekraft hin überprüft. Diese sogenannten Klasse-I-Marker, die sich pathophysiologisch vom Metabolismus der ECM ableiten, stellen vielversprechende Fibrosemarker dar [Gar 2009]. Generell kann man sagen, dass ideale Fibrosemarker eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, einfach anwendbar und messbar sind sowie kostengünstig, genau und gut reproduzierbar im Rahmen einer Verlaufskontrolle sein sollten [Sc 2008]. Anders als bei speziellen diagnostischen Verfahren wie der TE, die meist nur größeren Kliniken und Zentren vorbehalten ist, sind Fibrose-Biomarker im Serum einfacher verfügbar und erfüllen somit die aufgeführten Kriterien als vielversprechende Möglichkeit der Messung einer potentiell-

len Leberfibrose [Ra 2013]. Daher haben wir mögliche Kandidaten als Fibrose-Biomarker identifiziert und quantifiziert.

### 5.2.1 Die Marker MMPs und TIMPs

MMPs und TIMPs als spezifische MMP-Inhibitoren spielen eine zentrale Rolle sowohl in der hepatischen Fibrogenese als auch in der hepatischen Fibrolyse. Es wurde gezeigt, dass TIMPs sowohl im Serum als auch im Lebergewebe eine entscheidende Rolle in der hepatischen Fibrogenese spielen [Da 2008], [Con 2009], [Rama 2009], [Mor 2011]. Man nimmt an, dass TIMPs vor allem über Hemmung des Abbaus der ECM und eine nachfolgende Akkumulation von fibrotischem Gewebe wirken [Hem 2007]. Die gesteigerte Expression von TIMP-1 und TIMP-2 konnte in Rattenmodellen mit Leberschädigung [Roe 1997] und in einigen Lebererkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden [Beny 1996]. Bei HCV Patienten korreliert TIMP-1 mRNA mit dem Grad der Leberfibrose [Ya 1999] und HCV selbst ist in der Lage die TIMP-1 Expression zu stimulieren [Lic 2003]. Darüber hinaus sind TIMP-2 Proteine im Serum und die TIMP-2 mRNA Expression in der Leber bei Patienten mit HCV ebenfalls erhöht [Lic 2003], [Bok 2000]. Das Hauptaugenmerk einer Studie von Lichtinghagen und Kollegen lag auf dem Nachweis von einer MMP-Expression im Serum und den Hepatozyten. Die Expression von TIMP-1 und -2 wurde zum Vergleich mit heran gezogen und es konnte gezeigt werden, dass zirkulierendes TIMP-1 zusammen mit den mRNA-Werten von MMP-2, -7 und -14 stark korreliert ( $R=0,5-0,8$ ) und damit ein Akkumulation von fibrotischem Gewebe verstärkt [Lic 2003]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Ausschluss von Patienten mit Zirrhose diese Korrelation verschlechtert [Lic 2003]. Es wurde in zahlreichen weiteren Studien nachgewiesen, dass TIMP-1 bei Leberfibrose hochreguliert wird [Ir 1992], [Ir 1996]. Böker et al. wiesen nach, dass TIMP-1 erst spät im Fibroseprozess ansteigt und dass es nur eine schwache Korrelation zwischen der Aktivität der Fibroproliferation und hepatischem oder zirkulierendem TIMP-1 gibt [Bok 2000]. Die Werte von zirkulierendem TIMP-1 waren im Mittel nicht signifikant unterschiedlich zu den Daten der Kontrollpersonen, Patienten mit Hepatitis C und Patienten mit Zirrhose. Patienten mit Zirrhose hatten aber zum Teil sehr hohe TIMP-1-Werte [Bok 2000]. Damit wurde in dieser Studie gezeigt, dass TIMP-1 erst bei fortgeschrittener Fibrose ansteigt [Bok 2000]. Auch Rath et al. zeigten, dass bei erwachsenen CF-Patienten TIMP-1 eine wichtige Rolle spielt. Patienten ohne CFLD zeigten niedrigere Werte von TIMP-1 im Serum, Patienten mit CFLD zeigten etwas höhere TIMP-1 Werte im Serum und die Patienten, die zusätzlich eine PHT aufwiesen, zeigten die höchsten TIMP-1 Spiegel [Ra 2012]. Da sich in unserem Patientenkollektiv nur ein Kind befand, welches eine PHT und eine Leberzirrhose aufwies, war eine entsprechende Untertei-

lung in die einzelnen Gruppen nicht sinnvoll. Damit ist zudem erklärbar, dass in unserem Patientenkollektiv keine signifikante Erhöhung von TIMP-1 festgestellt wurde. Das Krankheitsbild CF ist sehr heterogen, sodass die Schwere der Erkrankung individuell differiert. Es müssten Kinder mit schwerer Beeinträchtigung der Leber und Progression der Lebererkrankung in die Studie eingeschlossen werden um gegebenenfalls wie im Erwachsenenkollektiv einen signifikanten Anstieg von TIMP-1 zu detektieren.

In der vorliegenden Studie wurden tendenziell erhöhte TIMP-2 Werte im Serum bei Kindern mit CFLD im Vergleich zu denen ohne CFLD gemessen. Diese Werte erreichten allerdings keine statistische Signifikanz. Dennoch haben wir eine hohe diagnostische Genauigkeit für TIMP-2 im Hinblick auf den Nachweis einer CFLD bei pädiatrischen CF-Patienten ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde wahrscheinlich aufgrund der Größe der Stichprobe (29 pädiatrische Patienten) sowie der großen interindividuellen Standardabweichung nicht erreicht. Würde man das vorliegende Patientenkollektiv (n=75) über einen längeren Zeitraum untersuchen und dadurch eine höhere Anzahl an Serumproben gewinnen können, wäre die Ausgangslage für TIMP-2 als Biomarker besser.

In der Studie Rath et al. wurden signifikant erhöhte TIMP-2 Werte im Serum bei Erwachsenen mit CFLD und PHT im Vergleich zu Patienten mit CFLD und denen ohne Lebererkrankung gemessen [Ra 2012]. Ferner wies TIMP-2 eine hohe diagnostische Genauigkeit für die Feststellung einer PHT bei erwachsenen Patienten auf. Dass diese Ergebnisse bei pädiatrischen Patienten nicht statistisch relevant waren, war darin begründet, dass im vorliegenden Studienkollektiv ausschließlich ein Kind an einer PHT litt. Außerdem haben Kinder noch nicht so lange gelebt wie Erwachsene. Somit könnte sich allein durch den längeren Verlauf der Erkrankung bei Erwachsenen eine Leberfibrose, -zirrhose entwickeln einschließlich der damit verbundenen Komplikationen wie z. B. der PHT. Durch die fortgeschrittene Lebererkrankung könnten dann auch Biomarker wie TIMP-2 signifikant ansteigen. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass TIMP-2 signifikant höher ist bei Patienten mit Fibrose im Stadium F3 bzw. F4, als bei Patienten mit Fibrose im Stadium F0-F1 bzw. bei Kontrollpersonen [Ra 2011]. Dies zeigt, dass erst bei fortgeschrittener Fibrose der TIMP-2-Wert sehr stark ansteigt. Zudem hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass TIMP-2 progredient mit dem Fibrorestadium ansteigt [Ra 2011]. Also je höher das Fibrorestadium, desto höher der TIMP-2-Wert. Dies konnten auch Liang und Kollegen in ihrer Studie belegen [Lia 2012]. Sie berechneten für eine signifikante Leberfibrose (Stadium F2-F4) einen AUROC von 0,899 [Lia 2012]. Damit wurde klar gezeigt, dass TIMP-2 erst bei fortgeschrittener Fibrose ansteigt.

### 5.2.2 Der Marker YKL-40

Neben der TE wurden in den letzten Jahren mehrere potentiell leistungsfähige quantitative Fibrose-Biomarker im Serum identifiziert. Dazu gehört unter anderem YKL-40. YKL-40 gehört zur Familie der Chitinasen, trägt zum Umbau des Gewebes und zum Abbau von ECM bei und YKL-40-Serumwerte korrelieren linear zur Progressionsrate der hepatischen Fibrose bei HCV und HCV mit begleitender Schistosomiasis (Bilharziose) [Kam 2006]. Durch unsere Arbeitsgruppe wurden bereits erhöhte Serumkonzentrationen dieses Markers bei alkoholischer Lebererkrankung und bei durch HCV hervorgerufener Leberfibrose beschrieben [Ra 2011]. Die Höhe des YKL-40 im Serum korreliert gut mit den hepatischen YKL-40 mRNA Werten, ein Hinweis darauf, dass die Serumwerte innerhalb der Leber den Umbau der ECM widerspiegeln. Auch die Progressionsrate der Fibrose korreliert linear mit der serologischen Expression von YKL-40 [Ra 2011]. In dieser früheren Studie konnten wir zeigen, dass YKL-40 eine höhere diagnostische Genauigkeit bietet, als die TE für die Erkennung einer signifikanten und fortgeschrittenen Fibrose bei Patienten mit HCV [Ra 2011]. Die Serumkonzentrationen von YKL-40 sind bei den meisten Patienten mit moderater bis schwerer Leberfibrose oder -zirrhose erhöht - unabhängig von der Ätiologie der Lebererkrankung - und können somit Informationen zum aktuellen Stand der Fibrogenese in der Leber geben [Jo 2006].

Bei der vorliegenden ausschließlich pädiatrischen Studienpopulation konnte keine signifikant erhöhte YKL-40 Expression festgestellt werden. Fasst man Erwachsene und Kinder unserer Mukoviszidosezentren zusammen, konnte man eine signifikant höhere Expression von YKL-40 bei Patienten mit CFLD verglichen zu denen, die keine CFLD hatten, feststellen [Ra 2012]. Weiterhin wies YKL-40 (AUROC 0,668) die höchste diagnostische Genauigkeit in der Gesamtpopulation der Patienten für die Diagnose einer CFLD unter allen getesteten Fibrose-Biomarkern im Serum auf mit einem AUROC vergleichbar zu dem bei der TE (AUROC: 0,681) [Ra 2012]. Obwohl YKL-40 nicht sehr sensitiv ist, weist es eine hohe Spezifität für die Diagnose CFLD auf und in Kombination mit der TE war die diagnostische Genauigkeit für die CFLD erheblich gestiegen verglichen zu dem jeweiligen Einzeltestverfahren [Ra 2012]. Somit stellt YKL-40 einen vielversprechenden Fibrose-Biomarker dar, der weiter evaluiert werden sollte. Aufgrund unserer Beobachtungen könnte man spekulieren, dass die YKL-40-Serumwerte bei Patienten mit CFLD die Akkumulation von ECM in der Leber widerspiegeln und dass seine Bestimmung dazu beitragen kann, fragwürdige hepatische Fibrosebefunde gezielt zu verifizieren [Ra 2012].

Eine aktuelle Studie zeigt, dass in den USA für die Vorhersage einer Leberfibrose YKL-40 keinen Vorhersagewert bei Kindern und jungen Erwachsenen hatte. In dieser Studie wurden Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen eingeschlossen [LeeC 2013]. Es konnte hingegen in China gezeigt werden, dass YKL-40 für ein Screening geeignet scheint, da der Marker schon in frühen Stadien und bei subklinischer Krankheit detektierbar ist [Tao 2014]. Somit sind Studien zu YKL-40 nicht kongruent und die geeigneten Bedingungen bzw. die Einsetzbarkeit als Fibrosemarker muss noch genauer identifiziert werden.

Unsere Studie ist eine der ersten Studien, die YKL-40 bei Kindern in großer Anzahl getestet hat und die YKL-40 im Zusammenhang der Leberbeteiligung bei CF untersucht hat.

YKL-40 wurde bereits bei der CF-assoziierten Lungenerkrankung getestet und zeigte sich dort erhöht. In die betreffende Studie wurden auch pädiatrische Patienten eingeschlossen. Fazit der Studie war, dass YKL-40 als potentieller Biomarker für die Lungenbeteiligung bei CF herangezogen werden kann [Hec 2011]. In dieser Studie wurden ältere Patienten eingeschlossen (mittleres Alter 22 Jahre) [Hec 2011]. Es wurden insgesamt 338 CF-Patienten einbezogen. Von 59 CF-Patienten wurde Serum und Sputum gewonnen und dies wurde zur Messung von YKL-40 verwendet [Hec 2011]. In der hier vorliegenden Studie wurde YKL-40 in 29 Serumproben von pädiatrischen CF-Patienten gemessen [Ra 2012]. Bei Hector et al. wurden die Serumproben bzw. Sputumproben mit gesunden Individuen verglichen [Hec 2011]. In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich CF-Patienten untersucht und es wurden lediglich Patienten mit und ohne CFLD verglichen [Ra 2012]. Unsere neuesten Daten zeigten ebenfalls eine Erhöhung von YKL-40 bei CF-Patienten mit moderater bis schwerer Lungenbeteiligung [Ra 2014]. Wir belegten zudem an anderer Stelle, dass CF-Patienten mit schwererer Lungenbeteiligung älter waren, als Patienten mit nur milder Lungenbeteiligung. Außerdem wurde gezeigt, dass YKL-40 signifikant erst bei moderater bis schwerer Lungenbeteiligung ansteigt [Ra 2014]. In der hier vorliegenden Studie wurde aufgrund einer anderen Zielsetzung und Fragestellung keine Unterteilung der Lungenbeteiligung vorgenommen und das Ausmaß der Lungenbeteiligung nicht quantifiziert [Ra 2012].

YKL-40 spielt auch bei anderen Erkrankungen eine große Rolle. Zum einen kann YKL-40 als Akut-Phase-Protein bei Pneumonien, die durch Streptokokken hervorgerufen wurden, detektiert werden. Bei diesen Patienten ist die Serumkonzentration von YKL-

40 acht- bis zehnfach höher als bei Gesunden [Jo 2006]. Zum anderen zeigten sich auch bei rheumatoider Arthritis, Osteoarthritis und Spondylitis ankylosans erhöhte YKL-40-Werte in der Synovialflüssigkeit und im Serum. YKL-40 spielt ebenfalls bei Erkrankungen mit chronischer Entzündung wie Riesenzellarteriitis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn), Sarkoidose und systemischer Sklerose eine Rolle [Jo 2006]. Auch bei Patienten nach Herztransplantation scheint YKL-40 von Bedeutung zu sein [Jo 2006]. Außerdem wird YKL-40 bei Patienten mit Tumorerkrankungen erhöht exprimiert. Es wird diskutiert, YKL-40 als Tumormarker und als Ziel für antikarzinomatische Therapie zu nutzen [Jo 2006]. YKL-40 könnte darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Initiierung einer allergischen Entzündung spielen und als Akut-Phase-Biomarker für Erkrankungen mit Fibrose von Nutzen sein [Tao 2014].

### 5.2.3 Weitere Fibrose-Biomarker

Es wurden in unserer Studie noch folgende weitere Fibrose-Biomarker evaluiert wie verschiedene MMPs, HA, PIIIP, M30 und M65.

Auch MMP-2 ist am Auf- und Umbau der ECM beteiligt und stellt deshalb einen potentiell interessanten Marker zur Erkennung einer Leberfibrose dar. MMP-2 ist ein autokriner Proliferations- und Migrationsfaktor für HSCs [Ik 1999], [Beny 1999]. Dieser Marker war in der vorliegenden Studie nicht signifikant erhöht, was am quantitativen Umfang des Studienkollektivs gelegen haben könnte. In früheren Studien von Benten und Oh wurde MMP-2 als Fibrosemarker vorgeschlagen, wird aber in der klinischen Routine nicht verwendet. MMP-2 allein hat keine große Aussagekraft als Fibrose-Biomarker, genauso wie weitere MMPs und TIMPs. Wenn man allerdings mehrere Marker parallel untersucht, ist durchaus eine tendenzielle Aussagekraft zu finden [Ben 1992], [Oh 2001]. MMP-2 wird nicht leberspezifisch sezerniert, sodass eine Serumerhöhung von MMP-2 nicht unbedingt durch eine Leberschädigung hervorgerufen sein muss [Ben 1992], [Oh 2001]. Leroy et al. demonstrierten in ihrer Studie ebenfalls keine signifikante Erhöhung der MMP-2 Werte im Serum von HCV-Patienten [Ler 2004]. In einer anderen Studie konnte ausschließlich eine signifikante Erhöhung der MMP-2 Werte bei Patienten mit Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis C gefunden werden und auch nur bei dieser Patientengruppe existierte eine hohe Spezifität und Sensitivität in der diagnostischen Aussagekraft [El 2003]. Es wurde mit der histologischen Diagnose der HCV-Hepatitis verglichen.

Die vorliegende Studie ist eine der ersten Studien, die MMP-2 bei CF mit Leberbeteiligung und bei pädiatrischen Patienten untersucht hat. Bisher wurden die MMP-2 Ex-

pressionen ausschließlich im Zusammenhang mit pulmonalen Exazerbationen bei erwachsenen CF-Patienten evaluiert. In dieser Studie zeigte sich eine Verminderung von MMP-2 bei pulmonaler Exazerbation [Ro 2009]. Somit kann MMP-2 als Marker für weitere Untersuchungen durchaus heran gezogen und evaluiert werden.

MMP-9 (Gelatinase B) wird von Kupfferzellen in Primärkultur [Kni 1999], von IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -stimulierten Hepatozyten [Gia 2006], IL-1 $\alpha$ -stimulierten HSCs [Han 2004] und bei toxisch (Alkohol- oder Tetrachlorkohlenstoff- (CCl<sub>4</sub>)) induzierter Leberschädigung [Ro 2006] synthetisiert. Allerdings zeigte das Ergebnis der vorliegenden Studie keine signifikante Erhöhung von MMP-9 im Serum. Im Fall der CF geht es nicht um eine toxische Leberschädigung bzw. Hepatozytenschädigung durch ein Agens, sondern es geht vielmehr um die Leberschädigung durch einen fehlerhaften Kanal in den Gallengangsepithelien und die konsekutive Cholestase bzw. Anhäufung toxischer Gallenbestandteile. Auch MMP-9 ist nicht leberspezifisch, sodass hier eine Ungenauigkeit vorliegt, da MMP-9 ebenfalls in anderen Teilen des Organismus sezerniert wird.

MMP-13 ist in der Lage das umgebende Gewebe abzubauen, damit sich im Anschluss neu synthetisierte ECM etablieren kann [Hem 2007]. Sowohl MMP-1, als auch MMP-13 gehören zu den Kollagenasen, deren Schlüsselmerkmal es ist, Kollagen Typ I, II und III zu spalten, essentielle Elemente der ECM [Par 2004]. MMP-13 ist eine interstitielle Kollagenase und hochspezifische Protease, die fähig ist, unlösliches fibrilläres Typ I Kollagen abzubauen. Dies weist darauf hin, dass MMP-13 eine wichtige Rolle in der Leberfibrogenese spielt. Außerdem wird MMP-13 mRNA Expression in narbenassoziierten Makrophagen in der Leber während spontaner Regression der Leberfibrose induziert [Fal 2007]. Im experimentellen Modell konnten Endo et al. feststellen, dass MMP-13 auch über die Induktion von MMP-2 und -9 die spontane Regression der Leberzirrhose in Ratten mit zuvor induzierter Leberzirrhose beschleunigt [End 2011]. Somit konnte gezeigt werden, dass MMP-13 eine herausragende Rolle im Regressionsprozess der Leberfibrose spielt [End 2011].

Benyon et al. konnten belegen, dass HSCs in der frühen Phase der Leberschädigung vorübergehend MMP-3, MMP-13 und Uroplasminogen-Aktivator exprimieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dies zu einem deutlichen Anstieg der Expression von TIMP-1 führt. Dieser bewirkt weiter, dass es zu einer ausgeprägten globalen Hemmung des Abbaus von fibrillärem Kollagen in der Leber durch die Kollagenasen MMP-1/MMP-13 kommt [Beny 2001]. Die Aktivierung des Proenzym oder die Inaktivierung von MMP-1 kann bei steigender TIMP-1-Expression inhibiert werden, wie auch

schon Benyon et al. berichteten [Beny 2001], indem TIMP-1 TIMP-1/MMP-1-Komplexe ausbildet. TIMP-1 hemmt unter anderem MMP-1 [Mura 1997]. Prystupa et al. konnten zeigen, dass bei alkoholischer Leberzirrhose MMP-13 erhöht ist und damit ein guter Fibrosemarker bei dieser Erkrankung sein kann [Pr 2015]. In der genannten Studie wurden allerdings nur erwachsene Patienten mit Leberzirrhose untersucht. Daher lässt sich der Unterschied zur vorliegenden Studie, in der Kinder untersucht wurden, zumindest teilweise erklären. Im Studienkollektiv lag nahezu noch keine Leberfibrose vor. MMP-13 spielt darüber hinaus eine Rolle in der Entwicklung einer idiopathischen Lungenfibrose [Nk 2013]. Daher könnte eine mögliche Erhöhung dieses Markers neben MMP-1 ebenfalls von Bedeutung für die Diagnostik einer Leberfibrose/-zirrhose, aber auch für andere Erkrankungen, sein [Pr 2015], [Nk 2013].

In einigen Studien konnte bisher festgestellt werden, dass HA bei Lebererkrankungen eine Rolle spielt [Wya 2002] [Leb 2011]. Somit wurde HA auch in unserer Studie als potentieller Fibrose-Biomarker untersucht. Wyatt et al. demonstrierten, dass die HA-Konzentrationen als potentieller Fibrose-Biomarker bei Kindern mit klinischem oder ultrasonographischem Nachweis einer Lebererkrankung bei Individuen höher war, die eine stärkere Leberschädigung aufwiesen [Wya 2002]. Lebensztejn et al. zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung von HA bei pädiatrischen Patienten mit nichtalkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD) [Leb 2011].

In der vorliegenden Studie konnte die Erhöhung von HA nicht bestätigt werden. Die HA-Konzentrationen blieben unverändert bei den Kindern, bei denen eine CFLD festgestellt wurde verglichen zu denen, bei denen keine CFLD festgestellt wurde. Es konnte nur eine Tendenz zur Erhöhung von HA bei Kindern mit CFLD festgestellt werden, ohne Signifikanz. Dies könnte daran liegen, dass die Leberschädigung beim vorliegenden Kollektiv mit einem mittleren Alter von 11 Jahren noch nicht in so hohem Ausmaße vorhanden war. Außerdem könnte die Größe der Serum-Stichprobe (n=29) ein weiterer Grund für dieses Ergebnis gewesen sein. Größere Stichproben sollten im Langzeitverlauf untersucht werden.

Leroy et al. [Ler 2004] zeigten, dass bei Patienten mit HCV sowohl PIIINP (Anzeichen für Fibrogenese) erhöht, als auch MMP-1 (Anzeichen für Fibrolyse) verringert waren. Bei Leroy et al. wurde festgestellt, dass weitere Fibrose-Biomarker signifikant erhöht waren (z.B. TIMP-1, -2, MMP-2 und -9). Das untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus 194 erwachsenen Patienten mit chronischer HCV-Infektion und 194 erwachsenen Kontrollpersonen zusammen. Diese Personen waren im Mittel 43 Jahre alt. [Ler 2004].

In der vorliegenden Untersuchung wurden pädiatrische CF-Patienten bis zu einem Alter von 18 Jahren untersucht. Es wurden demnach völlig unterschiedliche Studienkollektive untersucht. Außerdem evaluierten Leroy et al. eine größere Anzahl von Patienten, die bereits an schwerer Leberfibrose oder Leberzirrhose litten. Dadurch ist erklärbar, dass PIIINP, TIMP-1 und TIMP-2, MMP-2 und -9 stärker angestiegen waren [Ler 2004]. In der vorliegenden Untersuchung war nur ein Kind an Leberzirrhose mit portaler Hypertension erkrankt.

PIIIP und MMP-1 wurden von uns ebenfalls untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit einer CFLD und der Gruppe ohne CFLD festgestellt werden. Auch hier könnte die kleine Stichprobengröße (n=29) ursächlich sein. Es ist möglich, dass aufgrund der unterschiedlichen Ursachen der Leberfibrose verschiedene Marker unterschiedlich verändert sein können und den Vorgang der Fibrogenese verschieden beeinflussen. Bei HCV sind Viren die Ursache, bei CFLD sind es genetische Ursachen, die zu einer Veränderung des Sekretes in den Gallengängen führen.

M30 und M65 stellen potentielle Fibrose-Biomarker dar. M30 stellt ein Fragment von CK-18 dar. Joka et al. demonstrierten für verschiedene Lebererkrankungen erhöhte M30-Werte im Lebergewebe unter Verwendung des M30-ELISAs, die durch Caspasen in Hepatozyten bei Patienten mit verschiedenen akuten und chronischen Lebererkrankungen entstehen [Jok 2012]. Diese Caspaseaktivität spiegelt Apoptose wieder. Weiterhin verwendeten sie M65 als Marker für den Gesamtzelltod, Nekrose und Apoptose. Joka et al. konnte nachweisen, dass M65-Werte signifikant zwischen den Fibrorestadien unterscheiden konnten und auch M30 und M65 konnten mit hoher Spezifität und Sensitivität relevante sowie fortgeschrittene Fibrorestadien nachweisen [Jok 2012].

Lebensztejn et al. demonstrierten, dass das Fragment CK-18 (M30), ein Apoptosemarker, bei Kindern mit diagnostizierter Fibrose bei NAFLD höher war, als bei Kindern mit NAFLD ohne Fibrose. Außerdem wurde eine signifikante Korrelation mit dem Fibrosestatus von CK-18 (M30) ermittelt ( $r=0,32$ ,  $p=0,023$  [Leb 2011]).

Canbay et al. legten ebenfalls dar, dass die CK-18-Bestimmung im Serum sowohl M30, als auch M65, einen guten Nachweis einer akuten und chronischen Leberschädigung geben kann und diese schon frühzeitig anzeigt, auch bei Patienten mit im Normbereich liegenden Leberwerten [Can 2014]. Außerdem kann diese Bestimmung über die Aktivität der Krankheit und die Schwere der Leberschädigung Aufschluss geben [Can 2014].

Es wurde aufgezeigt, dass M30- und M65-Werte im Serum nach Ansprechen auf eine antivirale Therapie bei HBV-Patienten sanken [Far 2011]. Darüber hinaus wurde ebenso nachgewiesen, dass diese Zelltodmarker M30 und M65 bei akutem Leberversagen für die Diagnose sehr hilfreich sein können insbesondere im Hinblick auf den Krankheitsverlauf [Can 2014].

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Werte dieser beiden Marker festgestellt werden. Dies könnte darin begründet sein, dass bei CF-Patienten keine Apoptose der Hepatozyten stattfindet, denn bei CF liegt die Ursache der Leberschädigung in den Gallengangsepithelien und nicht in den Hepatozyten.

### 5.3 Kombinierte diagnostische Ansätze

Eine Kombination von TIMP-2 mit der TE führte bereits zu einer erhöhten diagnostischen Sensitivität und einem gesteigerten negativen prädiktiven Wert für die Diagnose einer CFLD bei Kindern [Ra 2012]. Wir konnten somit erstmals TIMP-2 als potentiell leistungsfähigen Fibrose-Biomarker für die Diagnose einer CFLD identifizieren. Biomarker sind von besonderer Relevanz, da die Messungen der Lebersteifigkeit mit Hilfe der TE noch nicht weit verbreitet und aufgrund der erheblichen Anschaffungskosten meist auf größere Kliniken und Zentren begrenzt ist. Wir haben darauf aufbauend durch Überprüfung weiterer Marker demonstriert, dass durch die Kombination der TE mit TIMP-4 und Endoglin die diagnostische Genauigkeit verbessert werden und damit die Sensitivität und der negative prädiktive Wert gesteigert werden können [Ra 2013]. In einer neueren Studie wurden Micro-RNAs mit den Ergebnissen der Leberbiopsie bei CFLD verglichen [Coo 2015]. Diese könnten ebenfalls in Kombination mit der TE untersucht und damit überprüft werden, ob die diagnostische Genauigkeit der TE in Kombination mit Micro-RNAs weiter gesteigert werden kann.

In Zukunft könnten mittels Proteomanalyse oder -Genomics weitere Marker identifiziert werden, die in Kombination mit der TE verwendet und die diagnostische Aussagekraft und Genauigkeit weiter verbessern werden.

### 5.4 Limitationen der Studie

Eine mögliche Einschränkung der vorliegenden Studie könnte darin begründet sein, dass keine histopathologischen Untersuchungen der CFLD im vorliegenden Patientenkollektiv vorlagen. Jedoch wird die Leberbiopsie bei CFLD aufgrund der fokalen Natur der CFLD kontrovers diskutiert und stellt gerade bei Kindern keine Routineuntersuchung dar [Deb 2011], [So 1999].

#### 5.4.1 Die Leberbiopsie vs. Ultraschall (Standard) vs. TE

Dennoch zeigten Berichte neueren Datums, die die Dual-Pass-Biopsie zur Reduktion von Stichprobenfehlern genutzt haben, dass die Leberhistologie die Entwicklung einer klinisch signifikanten Lebererkrankung bei Kindern vorhersagen kann [Lew 2011]. Bei der Dual-Pass-Biopsie werden die Proben durch eine perkutane ultraschallgestützte Biopsie aus dem rechten Leberlappen von verschiedenen Stellen entnommen und danach direkt mit 10%-igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet [Lew 2011]. Ergebnisse einer retrospektiven Analyse legen nahe, dass eine signifikante Assoziation für die Vorhersage einer Fibrose oder Zirrhose auf der Basis von Ultraschall festgestellt werden kann, wohingegen normale oder ungeklärte Ultraschallbefunde nicht mit der Leberhistologie korrelieren [Mue 2008]. Es konnte also gezeigt werden, dass auffällige Ultraschallbefunde mit der Leberhistologie korrelierten [Mue 2008].

Konträr zu Mueller-Abt et al. liefern Daten einer großen prospektiv untersuchten Kohorte von Kindern mit CF den Beweis, dass Ultraschallbefunde, die eine Leberbeteiligung anzeigen im Allgemeinen anderen Manifestationen einer Lebererkrankung vorausgehen, und dass Ultraschallbefunde daher als ein früher Hinweis auf Lebererkrankungen eine wichtige Rolle für die Diagnose einer CFLD bzw. PHT spielen könnten [Len 2003]. Angesichts der oben dargestellten Betrachtungen und der Tatsache, dass eine immer größer werdende Zahl von Studien, die eine enge Beziehung zwischen dem Grad der hepatischen Fibrose und der Lebersteifigkeit postulieren, existiert, könnte man argumentieren, dass die Entnahme von Leberbiopsien nicht unbedingt notwendig ist. Es überwiegt eher für die derzeitige Studie das erhöhte Risiko bei der Entnahme von Leberbiopsien speziell vor dem Hintergrund, dass Kinder in die Studie eingeschlossen wurden. Die zweifelhafte zusätzliche diagnostische Information, die die Histologie bietet, wiegt dieses erhöhte Risiko nicht auf. Daher kann auf die Leberbiopsie verzichtet werden.

#### 5.4.2 Die Herangehensweise bei Studien innerhalb und außerhalb Europas

Bisher existiert noch keine Studie, die TE und Leberbiopsie bei pädiatrischen CF-Patienten mit CFLD vs. ohne CFLD vergleicht. Ähnliche Studien, die bei Kindern vorgenommen wurden und die TE untersuchten, stammen nahezu alle aus Europa (Belgien und Frankreich) [Malb 2011], [Wit 2009], [Me 2010], [Bre 2009]. Von diesen genannten Studien führten ausschließlich Breton et al. von insgesamt 72 Kindern 14 Leberbiopsien bei Notwendigkeit durch [Bre 2009]. Breton et al. untersuchten aber nicht nur Kinder mit CF (20 Patienten), sondern auch Kinder mit anderen Lebererkrankungen [Bre 2009]. De Lédinghen et al. untersuchten ebenfalls nicht nur Kinder mit CF, son-

dern auch mit anderen Lebererkrankungen. Bei letztgenannter Studie wurden wenn notwendig Leberbiopsien durchgeführt, insgesamt 33 Biopsien bei einem Studienkollektiv von 116 Kindern [Lé 2007].

Es wurden einige Patientenkohorten mit Erwachsenen und Kindern untersucht [Ci 2014], [Fr 2013]. Diese Studien stammen aus Europa (Rumänien und Deutschland). Hierbei wurden ebenfalls nahezu keine Leberbiopsien durchgeführt (bei Ciucă et al. erfolgten zwei Leberbiopsien bei sehr fragwürdigen Befunden). Bei diesen Studien wurde argumentiert, dass mit einer Leberbiopsie nicht immer eine klare Aussage getroffen werden kann [Wit 2009], [Me 2010], [Ci 2014]. Infolge der initial fokalen Veränderungen bei der CFLD kann es bei der Leberbiopsie zu einem erheblichen Stichprobenfehler und aufgrund der fleckförmigen Verteilung der Läsionen in der Leber zur Unterschätzung der Schwere und Ausdehnung der CFLD oder sogar zu falsch negativen Resultaten kommen [Br 2001], [Leeu 2014]. Die Prozedur der Leberbiopsie trägt Risiken wie Blutungen und Infektionen oder auch einen Pneumothorax, der zwar nicht die häufigste Komplikation darstellt, aber im Zusammenhang mit CF besonders gefürchtet wird [Po 1997], [Br 2001], [Ca 2010], [Str 2010]. Die Durchführung einer Leberbiopsie ist daher ein ethisches Problem und kann Kindern bei dieser unsicheren Aussagekraft nicht zugemutet werden.

Bei Kindern müssen bei einer Leberbiopsie spezielle Betrachtungen vorgenommen werden [Ov 2012]. Wegen häufig fehlender Patientenkooperation kann diese Untersuchung meist nur in Allgemeinanästhesie erfolgen und es dürfen nur spezielle Biopsienadeln je nach Körpergröße des Patienten verwendet werden [Ov 2012]. Dies macht die Leberbiopsie bei Kindern teuer und komplizierter [Ov 2012]. Bei der Standardleberbiopsie wird nur 1/50000-tel der Leber untersucht. Dadurch ist das Risiko eines Stichprobenfehlers hoch und kann bis zu 20-30 % betragen, gerade bei pädiatrischen Patienten mit PBC oder CFLD, da bei diesen Erkrankungen zunächst fokale Veränderungen in der Leber auftreten und diese in einem so kleinen Biopsievolumen falsch dargestellt werden können [Ov 2012]. Die Bedeutung der Leberbiopsie bleibt bei Kindern umstritten, weil zahlreiche Lebererkrankungen selten sind und die Pathogenese vielfach nicht verstanden ist [Ov 2012]. Es wird ebenfalls immer mehr daran gearbeitet nicht-invasive Verfahren zu entwickeln, die eine Lebererkrankung diagnostizieren können [Ov 2012]. Dazu gehören Serumtests, Enzymanalysen, die Sequenzierung von DNA und herkömmliche Bildgebungstechniken [Ov 2012]. Außerdem werden neue bildgebende Verfahren entwickelt. Dies lässt vermuten, dass man von der invasiven Methode der Leberbiopsie Abstand nehmen möchte [Ov 2012]. Auch andere Studien

sind zu dem Schluss gekommen, dass eine Leberbiopsie nicht routinemäßig eingesetzt werden sollte bzw. muss, da eine gute Korrelation zwischen der TE und dem Fibrosegrad der Leber immer häufiger postuliert wird [Fr 2008], [Bre 2009], [Me 2010]. Das Risiko eines Stichprobenfehlers ist relativ hoch [Br 2001], [Leeu 2014] und mit der Leberbiopsie kann nicht in jedem Fall eine klare Aussage getroffen werden [Wit 2009], [Me 2010], [Ci 2014].

In den USA und Australien wurden Studien mit Kindern durchgeführt und bei nahezu allen Patienten eine Leberbiopsie entnommen [Coo 2015], [Leu(2) 2015]. Bei diesen Studien wurde allerdings keine TE zum Vergleich durchgeführt, sondern Micro-RNAs mit einem weiteren Ultraschallverfahren (ARFI) verglichen [Coo 2015], [Leu(2) 2015]. Die Arbeiten aus Übersee umfassen in beiden Fällen die Biopsie. Dies stellt einen fragwürdigen ethischen Aspekt dar, wie weiter oben erklärt.

Ferner wäre es wünschenswert, eine höhere Anzahl an Serumproben von Kindern zur Expressionsanalyse von Fibrose-Biomarkern einzuschließen. Jedoch repräsentiert das Abnehmen von Blut ein invasives Verfahren bei Kindern und wird nur dann vorgenommen, wenn es unausweichlich ist. Daher musste die serologische Analyse auf 29 Kinder begrenzt werden. Diese Anzahl war dennoch groß genug, valide statistische Berechnungen durchzuführen.

#### 5.4.3 Limitationen der TE

Obwohl das Probenvolumen in der TE annähernd 100-fach größer ist als das einer Leberbiopsie [Gom 2006], können trotzdem Stichprobenfehler vorkommen und zur Heterogenität der Ergebnisse in der vorliegenden Studie beigetragen haben. Bei sehr schlanken Patienten mit engen Interkostalräumen ist die TE-Messung nur sehr schwer möglich [Pra 2013] und bei Patienten mit Aszites kommt es zu unsicheren Wert- bzw. Fehlmessungen [Fou 2006]. Es wurde eine XL-Probe für übergewichtige Patienten entwickelt, bei dieser sind die Schwellenwerte aber niedriger als bei der Standard M-Probe [My 2012].

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die TE-Werte 1,3-3 mal höher sind im Stadium der akuten Entzündung und/oder bei moderater ALT-Erhöhung bei Virushepatitis [Tap 2012]. Diese TE-Werte normalisieren sich dann mit der Normalisierung der Laborwertauffälligkeiten (Abfall der Aminotransferasen) nach akuter Exazerbation bei chronischer Hepatitis. Daher kann es sein, dass eine viral begründete ALT-Erhöhung die Ergebnisse der TE beeinflusst [Ca(1) 2008].

Andere Einschränkungen für die akkurate Messung der Lebersteifigkeit schließen sinusoidale Stauung [Lebr 2008], extrahepatische Cholestase [Mil 2008], das Alter [Ket 2007] und die Verfettung der Leber (kontroverse Meinungen) [Fra 2007], [Kim 2007] mit ein.

### 5.5 Prävalenz und Inzidenz der CFLD in den verschiedenen Studien

In der vorliegenden Studienkohorte wurde ein hoher Prozentsatz von pädiatrischen Patienten mit CFLD (40 %) beobachtet. In der Literatur variiert die Prävalenz der CFLD stark zwischen den einzelnen Studien und liegt zwischen 2 % und 68 % bei Kindern und Adoleszenten [Co 2002], [Li 1999], [Sco 1991], [La 2004]. Auch in Autopsiestudien zeigte sich eine recht hohe Inzidenz von unter anderem 42 % bei Maurage et al. [Mau 1989]. In der genannten Studie wurden 38 Autopsien von CF-Patienten untersucht. Bei zehn der vorgenommenen Autopsien zeigte sich eine fokale biliäre Zirrhose und bei sechs Patienten eine multilobuläre Zirrhose [Mau 1989]. Die Inzidenz der CFLD ist somit ähnlich der in der hier untersuchten Patientenkohorte, wobei in unserer Patientenkohorte nur ein CF-Patient eine Leberzirrhose aufwies. Maurage et al. fanden heraus, dass bei Patienten, die einen Mekoniumileus hatten, das Risiko an einer CFLD zu erkranken, höher war [Mau 1989]. Andere Studien (siehe unten) konnten dies bestätigen. Wir haben diesen Punkt aufgrund der nicht zur Verfügung stehenden neonatologischen Befunde nicht untersucht.

#### 5.5.1 Prävalenz der CFLD in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht in einzelnen Studien

Scott-Jupp et al. fanden in ihrer Studie, in der sie 1100 CF-Patienten untersuchten, eine Prävalenz der CFLD von 4,2 %, wobei das Alter eine Rolle spielt. Die Prävalenz stellte sich in dieser Studie mit dem Alter progressiv wachsend dar. Während Kinder im Alter zwischen 0 und 5 Jahren lediglich eine Prävalenz von 0,3 % aufwiesen, stieg die Prävalenz bis zu 8,7 % im Alter von 16-20 Jahren an um danach bei Patienten über 20 Jahren wieder auf 4,1 % abzufallen [Sco 1991]. Des Weiteren fand diese Arbeitsgruppe heraus, dass das mittlere Alter des Ausbruchs der Lebererkrankung bei 9,8 Jahren (Median 10,5 Jahren) lag [Sco 1991]. Außerdem wurde festgestellt, dass das Auftreten einer CFLD einen Peak in der Pubertät hat und dass männliche Patienten häufiger von der CFLD betroffen sind [Sco 1991].

In der vorliegenden Studie konnte nicht belegt werden, dass männliche Patienten häufiger betroffen sind, als weibliche. Im untersuchten Studienkollektiv waren sogar mehr weibliche ( $p=0,011$ ), als männliche CF-Patienten von der CFLD betroffen.

Lindblad et al. untersuchten 124 Patienten über im Median acht Jahre regelmäßig und teilten die Patienten wie folgt ein: eine Gruppe ohne Leberbeteiligung, eine zweite Gruppe mit Laborauffälligkeiten, die auf eine Leberbeteiligung hindeuten und eine Gruppe mit multilobulärer Zirrhose [Li 1999]. Hier wurde eine Leberbeteiligung bei 21-34 % der Patienten gefunden (zweite und dritte Gruppe zusammengefasst), wobei im Alter von 20-25 Jahren die Leberbeteiligung noch auf 34-43 % angestiegen ist [Li 1999]. Bei der Erstdiagnose einer CFLD bestand im Median eine Leberbeteiligung von 35 % bei einem Alter von 12 Jahren (Median) [Li 1999]. Das bedeutet, dass wie auch schon bei Scott-Jupp und Kollegen gezeigt, die meisten Patienten die Leberbeteiligung vor dem 18. Lebensjahr entwickeln und somit auch hier bei Lindblad et al. ein Peak des Ausbruchs einer CFLD vor oder während der Pubertät aufzuweisen war [Sco 1991], [Li 1999]. 31 Patienten des gesamten Studienkollektivs waren <18 Jahre alt [Li 1999]. Während der Beobachtungszeit starben 15 Patienten und es wurde von drei dieser verstorbenen Patienten eine Autopsie durchgeführt, bei der man eine geringe Leberfibrose feststellen konnte [Li 1999]. Bei dieser Arbeitsgruppe wurde also eine höhere Prävalenz festgestellt als bei Scott-Jupp et al. Diese höhere Prävalenz korreliert mit unseren Daten bei denen 40 % der CF-Patienten eine CFLD aufwiesen [Ra 2012].

#### 5.5.2 Herangehensweisen bei der Diagnosefindung CFLD im Vergleich

Diese unterschiedlichen Ergebnisse der CFLD Prävalenz kommen dadurch zustande, dass bisher keine einheitlichen Kriterien für die Diagnose einer CFLD existieren bzw. festgelegt wurden. In den Studien variieren die Kriterien sehr stark. Bei Scott-Jupp et al. bestanden die Kriterien aus der Anamnese, aus einer abdominalen Untersuchung durch erfahrene Ärzte zur Feststellung einer ggf. vorliegenden Hepato- oder Splenomegalie und aus einer Laboruntersuchung um Veränderungen der Leberenzyme festzustellen [Sco 1991]. Radiologische und Ultraschallkriterien wurden erst hinzugezogen, wenn eine symptomatische biliäre Erkrankung wie z.B. eine Kolik vorlag [Sco 1991]. Bei Lindblad et al. wurden als Kriterien zwar ebenfalls das Labor, ein Leberfunktions-test (biochemische Lebererkrankung genannt) und auch die abdominelle Untersuchung zur Feststellung einer Hepato- bzw. Splenomegalie herangezogen, aber auch die Ultraschalluntersuchungen und zum Teil Leberbiopsien. Die Patienteneinteilung nach der Ultraschalluntersuchung erfolgte in zwei Gruppen, normal und pathologisch (Hyper-echogenität und/oder irreguläre Echogenität) [Li 1999]. Eine zweite Gruppe von Patienten mit klinischer Lebererkrankung wie multilobulärer Zirrhose mit Hepato- und Splenomegalie, mit ggf. Ösophagusvarizen, Hypersplenismus und biopsiebeweisender Zirrhose wurde definiert [Li 1999]. Bei Lindblad und Kollegen konnte kein Zusammenhang der Diagnose CFLD mit dem Genotyp festgestellt werden. Es wurde lediglich festge-

stellt, dass eine hohe Anzahl der Patienten mit multilobulärer Zirrhose homozygot für  $\Delta F508$  waren. Ein Zusammenhang mit dem Geschlecht konnte prinzipiell nicht festgestellt werden. Eine hohe Anzahl von Frauen wies jedoch eine multilobuläre Zirrhose auf [Li 1999]. In unserer Studie wurde ebenfalls eine höhere Anzahl von weiblichen Patienten mit CFLD gefunden (siehe Ergebnisse).

Colombo et al. untersuchten 177 CF-Patienten ohne CFLD prospektiv über einen Zeitraum von 14 Jahren [Co 2002]. Diese Patientenkohorte wurde alle drei Monate untersucht, es wurde eine klinische Untersuchung, eine Untersuchung der Entwicklung und eine Laboruntersuchung durchgeführt [Co 2002]. Jährlich erfolgten bei diesen Patienten ein Röntgen-Thorax, ein Lungenfunktionstest, Sputumkulturen und eine Ultraschalluntersuchung des Abdomens [Co 2002]. In dieser Studie wurden folgende Kriterien für eine CFLD definiert. Zwei dieser mussten an zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen mit Abstand von einem Jahr vorliegen [Co 2002]. Das erste Kriterium wurde als klinische Hepatomegalie (vergrößerte Leberspanne und härtere Konsistenz, der Leberrand war mehr als 2 cm unter dem Rippenbogen in der Medioklavikularlinie tastbar), die mit Ultraschall verifiziert wurde, definiert. Das zweite Kriterium bestand in erhöhten Leberenzymen wie der AST, ALT und  $\gamma$ GT (es mussten zwei dieser erhöht sein) und das dritte Kriterium stellten Ultraschallunregelmäßigkeiten dar wie heterogene Echogenität, knotige Veränderungen, irreguläre Leberränder oder Splenomegalie [Co 2002]. Aus verschiedenen Gründen wurden Biopsien bei elf Patienten durchgeführt. Bei diesen zeigten sich Zirrhose und schwere Leberfibrose in der Biopsie [Co 2002]. Während des Beobachtungszeitraums entwickelten 48 der 177 Patienten eine CFLD, entsprechend einer Inzidenz von 27 % [Co 2002]. Das mediane Alter bei der Diagnose war sieben Jahre und die Inzidenz bei CF-Patienten mit Mekoniumileus, männlichen Patienten und Patienten mit schwerer Mutation (mit Pankreasinsuffizienz, Mekoniumileus und das vollständige Fehlen der CFTR-Funktion) war erhöht [Co 2002]. Verglichen zu den anderen beiden Studien [Sco 1991] und [Li 1999] zeigte sich in dieser Studie kein Peak des Auftretens einer CFLD in der Pubertät [Co 2002]. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich kein Unterschied im Alter der Diagnosestellung einer CFLD, Median für CFLD 11,5 Jahre vs. ohne CFLD 11 Jahre. Die Diagnosekriterien für eine CFLD nach Debray et al. 2011 wurden auch von uns angewandt [De 2011].

Lamireau et al. untersuchten die Prävalenz der CFLD, indem sie 241 vorwiegend pädiatrische CF-Patienten ohne CFLD über einen Zeitraum von ca. zehn Jahren beobachteten. Genauso wie bei Colombo et al. wurden die Patienten alle drei Monate mittels klinischer Untersuchung, Untersuchung der Entwicklung, des Sputums, des Labors (u.a. Leberenzyme und Gerinnungsparameter) und Lungenfunktionstest evaluiert [La

2004], [Co 2002]. Es wurden jährlich Röntgen-Thorax und abdomineller Ultraschall durchgeführt [La 2004], [Co 2002]. Die Kriterien, die einer Diagnose einer CFLD zugrunde gelegt wurden, sind ähnlich. In zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen, die ausschließlich sechs Monate auseinanderliegen dürfen, muss eine Bedingung der folgenden präsent sein: klinische Hepatomegalie, Erhöhung des Leberenzym ALT und/oder Ultraschallabnormitäten und/oder Zeichen einer portalen Hypertension [Co 2002], [La 2004]. 85 der untersuchten Patienten entwickelten im medianen Alter von drei Jahren eine CFLD, das bedeutet eine mittlere Prävalenz von 35 % [La 2004]. Genauso zeigte sich eine gesteigerte Prävalenz bei männlichen Patienten (Tendenz, keine statistische Signifikanz) und bei Patienten mit Mekoniumileus [Co 2002], [La 2004]. Nur bei Lamrieau et al. zeigte sich darüber hinaus eine gesteigerte Prävalenz bei Patienten mit Pankreasinsuffizienz [La 2004]. Es konnte in dieser Studie ebenfalls kein Peak des Auftretens einer CFLD in der Pubertät festgestellt werden, sondern die Entwicklung der CFLD fand hauptsächlich in der ersten Lebensdekade statt. Es zeigte sich im Alter von zwei Jahren eine Prävalenz von 18 %, im Alter von fünf Jahren eine Prävalenz von 29 % und ab einem Alter von zwölf Jahren eine Prävalenz von 41 %, die dann im weiteren Verlauf stabil blieb [La 2004]. In unserer Patientenkohorte konnte das gesteigerte Auftreten einer CFLD bei Pankreasinsuffizienz nicht bestätigt werden. 38 Patienten von 45 Patienten der Gruppe ohne CFLD hatten eine Pankreasinsuffizienz und 28 von 30 Patienten mit CFLD hatten eine Pankreasinsuffizienz [Ra 2012].

Sowohl Colombo et al., als auch Lamrieau et al. begannen 1990 bei Patienten mit CFLD mit der Behandlung durch UDCA. Beide Studien konnten keine Aussage über die Effektivität der Therapie machen.

Es konnte eindrucksvoll belegt werden, dass verschiedene Studien verschiedene Kriterien zur Diagnose verwendet hatten und somit eine große Diskrepanz der Prävalenz zwischen den einzelnen Studien vorlag. Es besteht grundsätzlich die Gefahr, dass das Vorkommen einer CFLD über- bzw. unterschätzt wird, je nachdem, welche Kriterien für die Diagnose CFLD definiert werden.

Die hohe Prozentzahl von CFLD in unserer Studie könnte darüber hinaus Ausdruck einer verzerrten Auswahl sein, da Patienten mit einer zum Teil schon bekannten CFLD eine höhere Bereitschaft aufweisen, an Studien teilzunehmen, die neue diagnostische Anwendungen für ihr Krankheitsbild, die CFLD, evaluieren. Dieser Eindruck konnte weitestgehend bestätigt werden.

## 5.6 Ausblick

Seit einiger Zeit wird nach geeigneten nicht-invasiven Methoden zur Erkennung einer Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten gesucht. Gerade bei Kindern sollte darauf besonders Wert gelegt werden. Sowohl bildgebende Verfahren, als auch Serummarker wurden und werden evaluiert.

Seit 2009 wurde die transiente Elastographie, die bereits zur Erkennung anderer Lebererkrankungen zuverlässig eingesetzt wurde, zur Diagnostik einer CFLD erprobt und erste vielversprechende Ergebnisse wurden publiziert [Wit 2009].

Weitere darauf folgende Studien konnten bestätigen, dass erhöhte TE-Werte eine CFLD anzeigen [Me 2010], [Bre 2009], [Ci 2014], [Kit 2013], [Va 2016]. Auch die vorliegende Studie bekräftigt diese Resultate [Ra 2012].

Zurzeit werden weitere bildgebende nicht-invasive Verfahren evaluiert wie die Acoustic Radiation Force Impulse Elastographie (ARFI) sowie Realtime Gewebe Elastographie (RT-E) [Kar 2012], [Man 2012], [Mon 2012], [Fr 2013], [Sta 2014]. Bei diesen Verfahren handelt es sich um ultraschallbasierte Verfahren, die sowohl quantitativ, als auch qualitativ die Elastizität von Geweben darstellen.

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal eine große Anzahl von möglichen Fibrose-Biomarkern, die eine CFLD anzeigen und deren diagnostische Genauigkeit, erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-2 eine hohe diagnostische Aussagekraft für das Vorliegen einer CFLD aufweist. Zusätzlich konnte die diagnostische Aussagekraft gesteigert werden, wenn man die Messwerte der TE mit diesem Fibrose-Biomarker kombinierte.

Inzwischen hat man weitere neuere potentielle Fibrose-Biomarker identifiziert, die eine CFLD anzeigen können. Dazu gehören vor allem Micro-RNAs (miR) wie miR-122, miR-21 und miR-25. Diese werden ebenfalls im Serum gemessen [Coo 2015]. Außerdem wurden noch zwei weitere mögliche Fibrose-Biomarker beschrieben. Sowohl TIMP-4 als auch Endoglin sind erhöht bei Patienten mit CFLD und können im Zusammenhang mit der TE die Sensitivität für die nicht-invasive Diagnose einer CFLD steigern [Ra 2013]. Somit konnte gezeigt werden, dass die diagnostische Aussagekraft durch die Kombination der TE mit einem Fibrose-Biomarker gesteigert werden kann. In Zukunft sollte dementsprechend zur Diagnostik einer CFLD die Kombination von TE und Fibrose-Biomarker herangezogen werden um eine möglichst hohe Sicherheit in der Diagnostik zu erreichen.

Der Evaluierung weiterer Fibrose-Biomarker sollte weiterhin große Bedeutung zukommen, da es sich hierbei um eine recht einfache nicht-invasive Methode zur Erkennung einer CFLD handelt.

Externe Faktoren wie die Einnahme verschiedener Medikamente zur Behandlung der CF sowie die Therapie mit UDCA könnten darüber hinaus einen Einfluss auf die Messwerte der TE und die Expression der Fibrose-Biomarker haben. Dies sollte in Studien evaluiert werden.

Letztendlich wäre es wünschenswert eine Studie an einem großen multizentrischen Studienkollektiv über einen längeren Zeitraum durchzuführen.

## 6. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Erhebung ist die erste Studie, die die diagnostische Genauigkeit der TE mit einer Gruppe von experimentellen Fibrose-Biomarkern für den Nachweis einer CFLD in einer der weltweit größten Kohorten von pädiatrischen CF-Patienten evaluiert hat. YKL-40 wurde bei pädiatrischen CF-Patienten bisher im Zusammenhang mit Leberbeteiligung bei CF nicht systematisch untersucht.

Unsere Ergebnisse belegen, dass Kinder mit CFLD eine höhere Lebersteifigkeit aufweisen als jene, die keine CFLD haben (CFLD: 9,6 kPa vs. keine CFLD: 4,7 kPa,  $p=0,01$ ). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die TE eine hohe diagnostische Genauigkeit für die Feststellung einer CFLD bei Kindern aufweist (AUROC: 0,683,  $p=0,007$ ). Die vorliegenden Daten liefern den ersten Nachweis, dass TIMP-2 eine hohe diagnostische Genauigkeit für eine CFLD aufweist (AUROC: 0,697,  $p=0,080$ ), und dass die Kombination von TIMP-2 mit der TE besser geeignet ist eine CFLD nachzuweisen, als der jeweils einzelne Test (Sensitivität 95,2 %, Spezifität 47,8 %, PPW 62,5 %, NPW 91,7 %).

Es sollten prospektive Multicenter-Studien und Langzeitstudien mit Kindern durchgeführt werden, um das Ergebnis zu verifizieren und die TE im Langzeitverlauf zu evaluieren. Außerdem sollten auch potentielle neue Fibrosemarker untersucht werden. Ziel ist hier die Identifikation neuer Marker mit spezifischer diagnostischer Aussagekraft für die Leberbeteiligung bei Kindern und Erwachsenen. Ein weiteres Ziel dieser Studien ist es, dass die Leberbiopsie, die zurzeit noch den Goldstandard darstellt, nur in seltenen Fällen oder bei strittigen Befunden durchgeführt werden muss.

Auch die TE sollte im Langzeitverlauf sowie bei anderen Lebererkrankungen getestet werden, um deren Leistungsfähigkeit in real life Studien zu überprüfen. Darüber hinaus sollte die TE mit neuen Untersuchungsverfahren wie z.B. ARFI verglichen werden um die technischen Möglichkeiten der nicht-invasiven Diagnostik auszudehnen.

## 7. Zusammenfassung

Die Mukoviszidose, auch zystische Fibrose (CF) genannt, ist die häufigste autosomal-rezessive Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung. Sie beruht auf einem Gendefekt im CFTR-Gen und damit auf der Expression eines fehlerhaften CFTR-Kanals in allen exokrinen Drüsen. Etwa 18-37 % aller CF-Patienten entwickeln eine Leberbeteiligung (CFLD), welche zu einer periportalen Fibrose bis hin zu einer fokalen biliären und weiter zu einer multilobulären Zirrhose führen kann. Bisher mangelte es an sensitiven nicht-invasiven Methoden zur Diagnose einer CFLD.

Das Ziel dieser prospektiven Studie war es, die diagnostische Aussagekraft der TE und einzelner Fibrose-Biomarker wie z.B. TIMP-2 und YKL-40 zur Feststellung einer CFLD zu prüfen. Bei allen 75 pädiatrischen Patienten, aus denen das Studienkollektiv (Alter: 2-18 Jahre) bestand, wurde die TE zur Ermittlung der Lebersteifigkeit in Kilopascal (kPa) durchgeführt. Darüber hinaus wurden bei 29 Patienten Fibrose-Biomarker im Serum, u.a. HA, YKL-40, TIMP-2 und MMP-1, -2, -8, -9 und -13, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1-Komplex mittels ELISA bestimmt und analysiert.

Die Ergebnisse belegen, dass Kinder mit CFLD eine höhere Lebersteifigkeit aufweisen, als Patienten, die keine CFLD haben (CFLD: 9,6 kPa vs. keine CFLD: 4,7 kPa). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die TE eine hohe diagnostische Genauigkeit für die Feststellung einer CFLD bei Kindern aufweist (AUROC 0,683). Die vorliegenden Daten liefern den Beweis, dass TIMP-2 eine hohe diagnostische Genauigkeit für den Nachweis einer CFLD aufweist (AUROC 0,697), und dass die Kombination von diesem Biomarker mit der TE noch besser geeignet ist eine CFLD nachzuweisen, als jeder einzelne Test (Sensitivität 95,2 %, negativer prädiktiver Wert 91,7 %).

Unsere Erhebung ist die erste Studie, die die diagnostische Genauigkeit der TE in Kombination mit einer Gruppe von experimentellen Fibrose-Biomarkern für den Nachweis einer CFLD in einer der größten bisher publizierten Kohorten von CF-Patienten evaluiert hat. Die TE stellt somit ein valides Messverfahren zur frühzeitigen Diagnostik einer CFLD bei Kindern dar. Weiterhin kann TIMP-2 als vielversprechender Fibrose-Biomarker im Serum für die Diagnose einer CFLD bei Kindern angesehen werden.

In weiteren Studien sollte beurteilt werden, ob die TE zur Verlaufskontrolle geeignet ist. Die TE und die ermittelten Fibrose-Biomarker sollten in großen Studienkollektiven mit pädiatrischen Mukoviszidosepatienten im Langzeitverlauf evaluiert werden.

## 8. Summary

Mucoviscidosis, also known as cystic fibrosis (CF), is the most common autosomal-recessive disorder in the Caucasian population. This disease is based on a genetic defect in the CFTR-Gene and thereby on the expression defective CFTR-Channel in all exocrine glands. About 18-37 % of all CF-patients develop a liver involvement (CFLD), which can cause periportal fibrosis. To end up, it might come to a progression to focal biliary cirrhosis in further progress and at the end to multilobular cirrhosis. So far, sensitive non-invasive methods for diagnosis of CFLD are lacking.

Aim of this prospective study was to evaluate the diagnostic accuracy of TE and specific fibrosis biomarkers such as TIMP-2 or YKL-40 for assessment of CFLD. To every one of the 75 pediatric patients, in which the study collective consists (age: 2-18 years), measurement of liver stiffness in kilopascal (kPa) were performed. In addition, fibrosis biomarkers of 29 patients were analysed in serum including HA, YKL-40, TIMP-2 and MMP-1, -2, -8, -9 and -13, TIMP-1 and also MMP-9/TIMP-1-complex by use of ELISA.

The results provide the evidence, that liver stiffness measured by TE is higher in children with CFLD, compared to those without (CFLD: 9.6 kPa vs. no CFLD: 4.7 kPa). Furthermore, the study shows, that TE exhibit a high diagnostic accuracy for assessment of CFLD in children (AUROC 0,683). Finally, the current data provide the first evidence, that TIMP-2 exhibit a high diagnostic accuracy as proof of CFLD (AUROC 0,697), and that the combination of this biomarker with TE is in addition better adapted for proof of CFLD as only every single test (sensitivity 95,2 %, negative predictive value 91,7 %).

The current investigation is the first study, which evaluates the diagnostic accuracy of TE compared to a group of experimental fibrosis biomarkers for evidence of CFLD in one of the largest cohorts of CF-patients, which is published so far. Thus, TE demonstrates a valid measurement method of early diagnosis of CFLD in children. Furthermore, TIMP-2 could be considered as a promising serumbiomarker of fibrosis for diagnosis of CFLD in children.

In further studies should be evaluated, if TE is suitable for follow up. TE and measured fibrosis-biomarkers should be evaluated in long term follow up in a larger cohort of pediatric CF-patients.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
APRI	aspartate aminotransferase to platelet ratio index – Aspartat-Aminotransferase/Thrombozyten Ratio Index
ARFI	akustische Stärkestrahlungsimpuls-Bildgebung
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUROC	area under the ROC curve – Gebiet unter der ROC-Kurve
bzw.	beziehungsweise
cAB	capture antibody – „Fangantikörper“
cAMP	cyclic adenosinmonophosphate – zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	cystic fibrosis – zystische Fibrose = Mukoviszidose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFLD	cystic fibrosis associated liver disease – Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten
CK-18	Cytokeratin-18
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
cm	Zentimeter
dAB	detection antibody – „Detektionsantikörper“
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxy Ribonuclein Acid – Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extracellular Matrix – extrazelluläre Matrix
EGF	Endothelial Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
FBC	focal biliary cirrhosis – fokale biliäre Zirrhose
Ggf.	gegebenenfalls
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonationen
HCV	Hepatitis C Virus
HRP	Horseradish peroxidase – Meerrettichperoxidase
HSC	Hepatic stellate cell – hepatische Sternzelle
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IQR	Interquartilrange – Interquartilbereich

kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
lat.	lateinisch
MBC	multilobular biliary cirrhosis – multilobuläre biliäre Zirrhose
miR	Micro-RNA
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRI	Magnetresonance Imaging – Magnetresonanz Bildgebung
MT-1 MMP	membrane transient-1 Matrix Metalloproteinase – membranständige Matrix Metalloproteinase
mVal/l	Millival pro Liter
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease – nichtalkoholische Fettlebererkrankung
norUDCA	norUrsodesoxycholsäure
NPW	negativer prädiktiver Wert
PHT	portale Hypertension
PPV	positiver prädiktiver Wert
RNA	Ribonuclein Acid – Ribonukleinsäure
ROC	receiver operating characteristic
SD	Standard Deviation – Standardabweichung
TGF- $\beta$	Transforming Growth Faktor $\beta$
TIMP	tissue inhibitor of Metalloproteinases – Inhibitor der Metalloproteinasen
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
UDCA	Ursodesoxycholsäure
US	Ultrasound – Ultraschall
USA	United States of America – Vereinigte Staaten von Amerika
z.B.	zum Beispiel
$\gamma$ GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
$\mu$ l	Mykroliter

## 10. Darstellungsverzeichnis

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Der CFTR-Kanal (nach <http://pflege-und-medizin.de/Atmung/Mucoviszidose/muc.jpg>) (letzter Zugriff 19.10.2015) [pf 2015] (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Volker Schmieden) (Seite 3)
- Abbildung 2: Aufbau des Gerätes der transienten Elastographie (FibroScan®, Echo-sens, Paris, Frankreich) (modifiziert nach <http://www.medizin2.uk-wuerzburg.de/typo3temp/pics/4dbbed2632.jpg>) (letzter Zugriff 22.10.2012) [med 2012] (Seite 26)
- Abbildung 3: Ultraschallsonde des Gerätes (modifiziert nach <http://www.medizin2.uk-wuerzburg.de/uploads/pics/fibro1.jpg>) (letzter Zugriff 22.10.2012) [med 2012] (Seite 26)
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der transienten Elastographie (modifiziert nach Castera et al. Journal of Hepatology 2008) [Ca(1)2008] (Seite 39)
- Abbildung 5: Das Prinzip des Sandwich-ELISA (nach <http://www.uscnk.de/typo3temp/pics/77e704ecc5.jpg>) (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Chris Sun – cloud-clone.com) (letzter Zugriff 19.10.2015) [us 2015] (Seite 41)
- Abbildung 6: Häufigkeit der CF-assoziierten Leberbeteiligung (CFLD) in Abhängigkeit vom Geschlecht. Weibliche Mukoviszidosepatienten zeigen eine signifikant häufigere Leberbeteiligung, als männliche Mukoviszidosepatienten ( $p^*=0,011$ ). (Seite 45)
- Abbildung 7: Lebersteifigkeit bei Patienten mit Mukoviszidose und damit assoziierter Leberbeteiligung. Die Patienten mit einer Leberbeteiligung zeigten eine signifikant erhöhte Lebersteifigkeit (CFLD: 9,6 kPa vs. keine CFLD: 4,7 kPa,  $p=0,01$ ). Der signifikante Unterschied wurde hervorgehoben ( $*p < 0,05$ ). Fehlerbalken: 95% Konfidenzintervall, O Mittelwert der Lebersteifigkeit. (Seite 46)
- Abbildung 8: Expression von YKL-40 (A), TIMP-2 (B) und TIMP-1 (C) bei Patienten mit Mukoviszidose und damit assoziierter Leberbeteiligung. Die YKL-40-

und die TIMP-1-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit CFLD und Patienten ohne CFLD. TIMP-2 war erhöht bei Kindern mit CFLD, allerdings erreichte die Erhöhung dieses Wertes nicht den Wert der statistischen Signifikanz. (Seite 47-48)

Abbildung 9: Expression von Hyaluronsäure (HA) im Serum von Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD). HA zeigte den Trend zur Erhöhung bei Mukoviszidosepatienten mit einer CFLD im Vergleich zu Mukoviszidosepatienten ohne CFLD. Allerdings erreichte diese Erhöhung keine statistische Signifikanz. (Seite 48)

Abbildung 10: Expression von Procollagen III (PIIIP) (A) und der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) (B) im Serum von Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD). PIIIP und MMP-9 bleiben in der vorliegenden Patientenkohorte unverändert, sowohl bei Patienten mit CFLD, als auch ohne CFLD. (Seite 49)

Abbildung 11: Expression von Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) (A) Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) (B), Matrixmetalloproteinase 8 (MMP-8) (C), Matrixmetalloproteinase 13 (MMP-13) (D), M30 (E) und M65 (F) im Serum von Mukoviszidosepatienten mit assoziierter Leberbeteiligung (CFLD). Bei all diesen Fibrose-Biomarkern konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (Seite 50-52)

Abbildung 12: Diagnostische Aussagekraft der transienten Elastographie (A+B) und einiger experimenteller Fibrose-Biomarker (B) für den Nachweis einer Mukoviszidose assoziierten Lebererkrankung (CFLD). Die höchste diagnostische Aussagekraft für den Nachweis einer CFLD wurde für TIMP-2 (AUROC: 0,728) und für die transiente Elastographie (TE, Fibroscan: AUROC: 0,676) berechnet. (Seite 54)

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der Kohorte der pädiatrischen Mukoviszidosepatienten. (Seite 44)

Tabelle 2: Diagnostische Genauigkeit der transienten Elastographie und der Fibrose-Biomarker für die Feststellung einer Leberbeteiligung bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten (n=75). (Seite 53)

Tabelle 3: Diagnostische Leistungsfähigkeit der transienten Elastographie und der Fibrose-Biomarker für den Nachweis einer Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten (CFLD). (Seite 55)

## 11. Literaturverzeichnis

[Ac 2007] ACCURSO FJ: Update in cystic fibrosis 2007. Am J Respir Crit Care Med 2008; 177(10): 1058-1061.

[Ak 2007] AKATA D, AKHAN O: Liver manifestations of cystic fibrosis. Eur J Radiol 2007; 61(1): 11-17.

[Al 1993] ALVARO D, CHO WK, MENNONE A BOYER JL: Effect of secretin on intracellular ph regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. J Clin Invest 1993; 92(3): 1314-1325.

[Alt 2015] ALTINBAŞ A, ÇOBAN Ş, BAŞAR Ö, YÜKSEL O: Utility of M30, an apoptotic serum marker, in liver diseases. Turk J Med Sci. 2015; 45(1): 6-10.

[An 1938] ANDERSON DH: Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. Am J Dis Child 1938; 56 (2): 334-344.

[An 1946] ANDERSON DH, HODGES RG: Celiac syndrome: genetics of cystic fibrosis of pancreas with consideration of etiology. Am J Dis Child 1946; 72: 62-80.

[ana 2012] <http://www.analytik.de/content/view/3863/686/> (letzter Zugriff: 11.10.2012)

[And 1991] ANDERSON MP, RICH DP, GREGORY RJ, SMITH AE, WELSH MJ: Generation of cAMP activated chloride currents by expression of CFTR. Science 1991; 251(4994): 679-682.

[ant 2012] <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/665/ELISA/> (letzter Zugriff: 11.10.2012)

[Ba 1997] BALISTRERI WF: Bile acid therapy in paediatric hepatobiliary disease: the role of ursodesoxycholic acid. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997; 24(5): 573-589.

[Ban 2000] BANTEL H, RUCK P, SCHULZE-OSTHOFF K: In situ monitoring of caspase activation in hepatobiliary diseases. Cell Death Differ 2000; 7(5): 504-505.

[Ban 2001] BANTEL H, RUCK P, GREGOR M, SCHULZE-OSTHOFF K: Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol* 2001; 80(3): 230-239.

[Bar 2009] BARTLETT JR, FRIEDMAN KJ, LING SC, PACE RG, BELL SC, BOURKE B, CASTALDO G, CASTELLANI C, CIPOLLI M, COLOMBO C, COLOMBO JL, DEBRAY D, FERNANDEZ A, LACAILLE F, MACEK M JR, ROWLAND M, SALVATORE F, TAYLOR CJ, WAINWRIGHT C, WILSCHANSKI M, ZEMKOVÁ D, HANNAH WB, PHILLIPS MJ, COREY M, ZIELENSKI J, DORFMAN R, WANG Y, ZOU F, SILVERMAN LM, DRUMM ML, WRIGHT FA, LANGE EM, DURIE PR, KNOWLES MR; GENE MODIFIER STUDY GROUP: Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 2009; 302(10): 1076-83.

[Be 2010] BEUERS U, HOHENESTER S, MAILLETTE DE BUY WENNIGER LJ, KREMER AE, JANSEN PL, ELFERINK RP: The biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* 2010; 52(4): 1489-1496.

[Bed 1996] BEDOSSA P, POYNARD T: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24(2):289-93.

[Beh 2007] BEHARRY S, ACKERLEY C, COREY M, KENT G, HENG YM, CHRISTENSEN H, LUK C, YANTISS RK, NASSER IA, ZAMAN M, FREEDMAN SD, DURIE PR: Long-term docosahexaenic acid therapy in a congenic murine model of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(3): G839-G848.

[Behr 2013] BEHRENS CB, LANGHOLZ JH, EILER J, JENEWEIN R, NAEHRLICH L, FUCHS K, HARTH S, KROMBACH GA, ALZEN GF: A pilot study of the characterization of hepatic tissue strain in children with cystic-fibrosis-associated liver disease (CFLD) by acoustic radiation force impulse imaging. *Pediatr Radiol* 2013; 43(5): 552-557.

[Ben 1987] BENTSEN KD, HORN T, RISTELI J, RISTELI L, ENGSTRÖM-LAURENT A, HØRSLEV-PETERSEN K, LORENZEN I: Serum aminoterminal Type III procollagen peptide and the 7S domain of the Type IV collagen in patients with alcohol abuse. *Liver* 1987; 7(6): 339-346.

[Ben 1990] BENTSEN KD, HENRIKSEN JH, BENDTSEN F, HØRSLEV-PETERSEN K, LORENZEN I: Splanchnic and renal extraction of circulating Type III procollagen aminoterminal propeptide in patients with normal liver function and in patients with alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11(6): 957-963.

[Ben 1992] BENTSEN KD: Type III procollagen peptide: studies on the circulating peptide as a marker of fibrogenesis with special reference to the liver. Thesis. Lægeforeningsforlag, København 1992.

[Beny 1996] BENYON RC, IREDALE JP, GODDARD S, WINWOOD PJ, ARTHUR MJ: Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110(3): 821-831.

[Beny 1999] BENYON RC, HOVELL CJ, DA GAÇA M, JONES EH, IREDALE JP, ARTHUR MJ: Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 1999; 30(4): 977-986.

[Beny 2001] BENYON RC, ARTHUR MJ: Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(3): 373-384.

[Bh 1998] BHASKAR KR, TURNER BS, GRUBMAN SA, JEFFERSON DM, LAMONT JT: Dysregulation of proteoglycan production by intrahepatic biliary epithelial cells bearing defective ( $\Delta$ F508) cystic fibrosis transmembrane regulator. *Hepatology* 1998; 27(1): 7-14.

[Bo 2007] BOYLE MP: Adult cystic fibrosis. *JAMA* 2007; 298(15): 1787-1793.

[Bod 2015] BODEWES FA, VAN DER DOEF HP, HOUWEN RH, VERKADE HJ: Increase of Serum  $\gamma$ -Glutamyltransferase Associated With Development of Cirrhotic Cystic Fibrosis Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 61(1): 113-118.

[Bok 2000] BÖKER KH, PEHLE B, STEINMETZ C, BREITENSTEIN K, BAHR M, LICHTINGHAGEN R: Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver and serum/plasma in chronic active hepatitis C and HCV-induced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(33): 812-819.

[Br 2001] BRAVO AA, SHETH SG, CHOPRA S: Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344(7): 495-500.

[Bre 2009] BRETON E, BRIDOUX-HENNO L, GUYADER D, DANIELÉLOU H, JOUAN H, BEUCHÉE A, NOUSBAUM JB, DABADIE A: Value of transient elastography in noninvasive assessment in children's hepatic fibrosis. *Arch Pediatr* 2009; 16(7): 1005-1010.

[Ca(1) 2008] CASTERA L, FORNS X, ALBERTI A: Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48(5): 835-847.

[Ca(2) 2008] CASTERA L: Non-invasive diagnosis of steatosis and fibrosis. *Diabetes Metab* 2008; 34(6 Pt 2): 674-679.

[Ca 2010] CASTERA L, PINZANI M: Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango? *Gut* 2010; 59(7): 861-866.

[Can 2014] CANBAY A, FELDSTEIN A, KRONENBERGER B, SCHULZE-OSTHOFF K, BANTEL H: Cytokeratin 18 as marker for non-invasive diagnosis and prognosis of acute and chronic liver diseases. *Z Gastroenterol* 2014; 52(3): 290-295.

[Cas 2001] CASTALDO G, FUCCI A, SALVATORE D et al: Liver expression in cystic fibrosis could be modulated by genetic factors different from the cystic fibrosis transmembrane regulator genotype. *Am J Med Genet* 2001; 98(4): 294-297.

[Cau 1997] CAULÍN C, SALVESEN GS, OSHIMA RG: Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 138(6): 1379-1394.

[Cast 2008] CASTELLANI C, CUPPENS H, MACEK M JR, CASSIMAN JJ, KEREM E, DURIE P, TULLIS E, ASSAEL BM, BOMBIERI C, BROWN A; CASALS T, CLAUSTRÉS 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, STUHRMANN M, TZETIS M, ZIELENSKI J, ELBORN JS: Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibr* 2008; 7(3): 179-196.

[Cast 2009] CASTELLANI C, SOUTHERN KW, BROWNLEE K, DANKERT ROELSE J, DUFF A, FARRELL M, MEHTA A, MUNCK A, POLLITT R, SERMET-GAUDELUS I, WILCKEN B, BALLMANN M, CORBETTA C, DE MONESTROL I, FARRELL P, FEILCKE M, FÉREC C, GARTNER S, GASKIN K, HAMMERMANN J, KASHIRSKAYA N, LOEBER G, MACEK M JR, MEHTA G, REIMAN A, RIZZOTTI P, SAMMON A, SANDS D, SMYTH A, SOMMERBURG O, TORRESANI T, TRAVERT G, VERNOOIJ A, ELBORN S.: European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 2009; 8(3): 153-173.

[Ce 2001] DE CEUNINCK F, GAUFILLIER S, BONNAUD A, SABATINI M, LESUR C, PASTOUREAU P: YKL-40 (Cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increased glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(4): 926-931.

[Ch 1999] CHINET T, FOUASSIER L, DRAY-CHARIER N, IMAM-GHALI M, MOREL H, MERGEY M, DOUSSET B, PARC R, PAUL A, HOUSSET C: Regulation of electrogenic anion secretion in normal and cystic fibrosis gallbladder mucosa. *Hepatology* 1999; 29(1): 5-13.

[Cha 2006] CHAUDRY G, NAVARRO OM, LEVINE DS, OUDJHANE K: Abdominal manifestations of cystic fibrosis in children. *Pediatr Radiol* 2006; 36(3): 233-240.

[Che 2000] CHENG K, ASHBY D, SMYTH RL: Ursodesoxycholic acid for cystic fibrosis-related liver disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2): CD000222.

[Chen 2005] CHEN AH, INNIS SM, DAVIDSON AG, JAMES SJ: Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine excretion is increased in children with cystic fibrosis and is associated with plasma homocysteine, S-adenosylhomocysteine, and S-adenosylmethionine. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(3): 686-691.

[Cho 1998] CHO J-J, LEE Y-S: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serum Procollagen type III peptide in rats with hepatic fibrosis. *J Vet Med Sci* 1998; 60(11): 1213-1220.

[Ci 2014] CIUCĂ IM, POP L, TĂMAȘ L, TĂBAN S: Cystic fibrosis liver disease - from diagnosis to risk factors. *Rom J Morphol Embryol*. 2014; 55(1): 91-95.

[Co(1) 1992] COLOMBO C, CASTELLANI MR, BALISTRERI WF, SEREGNI E, ASSAISSO ML, GIUNTA A: Scintigraphic documentation of an improvement in hepatobiliary excretory function after treatment with ursodesoxycholic acid in patients with cystic fibrosis and associated liver disease. *Hepatology* 1992; 15(4): 677-684.

[Co(2) 1992] COLOMBO C, CROSIGNANI A, ASSAISSO ML, BATTEZZATI PM, PODDA M, GIUNTA A, ZIMMER-NECHEMIAS L, SETCHELL KD: Ursodesoxycholic acid therapy in cystic fibrosis associated liver disease: a dose-response study. *Hepatology* 1992; 16(4): 924-930.

[Co 1994] COLOMBO C, APOSTOLO MG, FERRARI M, SEIA M, GENONI S, GIUNTA A, SERENI LP: Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1994; 124(3): 393-399.

[Co 1996] COLOMBO C, BATTEZZATI PM, PODDA M, BETTINARDI N, GIUNTA A: Ursodesoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: a double-blind multicenter trial. The Italian Group for the study of Ursodesoxycholic Acid in Cystic fibrosis. *Hepatology* 1996; 23(6): 1484-1490.

[Co 2002] 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(6): 1374-1382.

[Co 2004] COLOMBO C, BATTEZZATI PM: Liver involvement in cystic fibrosis: primary organ damage or innocent bystander? *J Hepatol* 2004; 41(6): 1041-1044.

[Co 2006] COLOMBO C, RUSSO MC, ZAZZERON L, ROMANO G: Liver disease in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006 43(Suppl 1): S49-55.

[Co 2007] COLOMBO C: Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13(6): 529-536.

[Cob 2007] COBBOLD JF, MORIN S, TAYLOR-ROBINSON D: Transient elastography for the assessment of chronic liver disease: Ready for the clinic? *World J Gastroenterol* 2007; 13(36): 4791-4797.

[Com 2007] COMEAU AM, ACCURSO FJ, WHITE TB, CAMPBELL PW 3<sup>rd</sup>, HOFFMAN G, PARAD RB, WILFOND BS, ROSENFELD M, SONTAG MK, MASSIE J, FARRELL PM, O'SULLIVAN BP; Cystic Fibrosis Foundation: Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic fibrosis foundation workshop report. *Pediatrics* 2007; 119(2): e495-e518.

[Con 2009] CONSOLO M, AMOROSO A, SPANDIDOS DA, MAZZARINO MC: Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med* 2009; 24(2): 143-152.

[Coo 2015] COOK NL, PEREIRA TN, LEWINDON PJ, SHEPHERD RW, RAMM GA: Circulating microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of liver disease in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60(2): 247-254.

[Cy 1993] CYSTIC FIBROSIS GENOTYPE-PHENOTYPE CONSORTIUM: Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 329(18): 1308-1313.

[Cor 2004] CORBETT K, KELLEHER S, ROWLAND M, DALY L, DRUMM B, CANNY G, GREALLY P, HAYES R, BOURKE B: Cystic fibrosis-associated liver disease: a population-based study. *J Pediatr* 2004; 145(3): 327-332.

[Da 1984] DAVIS PB, DI SANT' AGNESE PA: Diagnosis and treatment of cystic fibrosis: an update. *Chest* 1984; 85(6): 802-809.

[Da 2006] DAVIS PB: Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(5): 475-482.

[Da 2008] DAS SK, VASUDEVAN DM: Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68(4): 260-9.

[Dav 1984] DAVIDSON AG, WONG LT, KIRBY LT, APPLGARTH DA: Immunoreactive trypsin in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3 Suppl 1: S79-S88.

[De 1999] DEBRAY D, LYKAVIERIS P, GAUTHIER F, DOUSSET B, SARDET A, MUNCK A, LASELVE H, BERNARD O: Outcome of cystic fibrosis-associated liver cirrhosis: management of portal hypertension. *J Hepatol* 1999; 31(1): 77-83.

[De 2011] DEBRAY D, KELLY D, HOUWEN R, STRANDVIK B, COLOMBO C: Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros* 2011; 10 (Suppl. 2): S29-S36.

[Del 2009] DEL POGGIO P, COLOMBO S: Is transient elastography a useful tool for screening liver disease? *World J Gastroenterol* 2009; 15(12): 1409-1414.

[Den 2009] DENZER UW, LÜTH S: Non-invasive diagnosis and monitoring of liver fibrosis and cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23(3): 453-460.

[Di 2001] DIWAKAR V, PEARSON L, BEATH S: Liver disease in children with cystic fibrosis. *Paediatr Res Rev* 2001; 2(4): 340-349.

[Dis 1953] DI SANT' AGNESE PA, DARLING RC, PERERA GA, SHEA E: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship to disease. *Pediatrics* 1953; 12(5): 549-563.

[Du 1994] DUDEN, Das große Fremdwörterbuch: Herkunft und Bedeutung der Fremdwörter, hrsg. vom wissenschaftlichen Rat der Dudenredaktion. [Bearb.: Günther Drosdowski. In Zusammenarb. mit Dieter Baer...]. - Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich: Dudenverlag, 1994 Seite 920 Stichwort „Muko...“, Seite 989 Stichwort „...ose“

[Duf 2005] DUFFIELD JS, FORBES SJ, CONSTANDINOU CM, CLAY S, PARTOLINA M, VUTHOORI S, WU S, LANG R, IREDALE JP: Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115(1): 56-65.

[EI 2003] EL-GINDY I, EL-RAHMAN AT, EL-ALIM MA, ZAKI SS: Diagnostic potential of serum matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients with HCV related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003; 10(1): 27-35.

[En 1971] ENGVALL E, PERLMANN P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. 1971; In: *Immunochemistry Bd. 8*, S.871-874.

[End 2011] ENDO H, NIIOKA M, SUGIOKA Y, ITOH J, KAMEYAMA K, OKAZAKI I, ALA-AHO R, KÄHÄRI VM, WATANABE T: Matrix metalloproteinase-13 promotes recovery from experimental liver cirrhosis in rats. *Pathobiology* 2011; 78(5): 239-252.

[Fa 2008] FARRELL PM, ROSENSTEIN BJ, WHITE TB, ACCURSO FJ, CASTELLANI C, CUTTING GR, DURIE PR, LEGRYS VA, MASSIE J, PARAD RB, ROCK MJ, CAMPBELL PW 3rd; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION: Guidelines for the diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 2008; 153(2): S4-S14.

[Fa 2009] FAVIA M, GUERRA L, FANELLI T, CARDONE RA, MONTERISI S, DI SOLE F, CASTELLANI S, CHEN M, SEIDLER U, RESHKIN SJ, CONESE M, CASAVOLA V: Na/H Exchanger Regulatory Factor 1 Overexpression-dependent Increase of Cytoskeleton Organization Is Fundamental in the Rescue of F508del Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Human Airway CFBE41o- Cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21(1): 73–86.

[Fal 2007] FALLOWFIELD JA, MIZUNO M, KENDALL TJ, CONSTANDINOU CM, BENYON RC, DUFFIELD JS, IREDALE JP: Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*, 2007; 178(8): 5288-5295.

[Far 2011] FARNIK H, LANGE CM, HOFMANN WP, BERGER A, ALLWINN R, WELKER MW, TROJAN J, SARRAZIN C, HERRMANN E, ZEUZEM S, KRONENBERGER B: Nucleos(t)ide analogue treatment reduces apoptotic activity in patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 2011; 52(3): 204-209.

[Fe 2006] FERKOL T, ROSENFELD M, MILLA CE: Cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *J Pediatr* 2006; 148(2): 259-264.

[Fei 1993] FEIGELSON J, ANAGNOSTOPOULOS C, POQUET M, PECAU Y, MUNCK A, NAVARRO J: Liver cirrhosis in cystic fibrosis. Therapeutic implications and long term follow up. *Arch Dis Child* 1993; 68(5): 653-657.

[Fer 2001] FERANCHAK AP, SOKOL RJ: Cholangiocyte biology and cystic fibrosis liver disease. *Sem Liv Dis* 2001; 21(4): 471-488.

[Fes 1978] FESSLER JH, FESSLER LI: Biosynthesis of procollagen. *Annu Rev Biochem* 1978; 47: 129-162.

[Fi 2003] FISCHER U, JÄNICKE RU, SCHULZE-OSTHOFF K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10(1): 76-100.

[Fic 2013] FICKERT P, POLLHEIMER MJ, SILBERT D, MOUSTAFA T, HALILBASIC E, KRONES E, DURCHSCHEIN F, THÜRINGER A, ZOLLNER G, DENK H, TRAUNER M: Differential effects of *nor*UDCA and UDCA in obstructive cholestasis in mice. *J Hepatol* 2013; 58(6): 1201-1208.

[Fo 2002] FOSTER JA, RAMSDEN WH, CONWAY SP, TAYLOR JM, ETHERINGTON C: The role of IDA scintigraphy in the follow-up of liver disease in patients with cystic fibrosis. *Nucl Med Commun* 2002; 23(7): 673-681.

[Fou 2006] FOUCHER J, CASTÉRA L, BERNARD PH, ADHOUTE X, LAHARIE D, BERTET J, COUZIGOU P, DE LÉDINGHEN V: Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(4): 411-412.

[Fr 2007] FRIEDRICH-RUST M, ZEUZEM S: Nicht-invasive Beurteilung des Leberfibrosestadiums mit der transienten Elastographie (FibroScan): aktueller Stand und Perspektiven. *Z Gastroenterol* 2007; 45(5): 387-394.

[Fr 2008] FRIEDRICH-RUST M, ONG M, 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(4): 960-974.

[Fr 2013] FRIEDRICH-RUST M, SCHLUETER N, SMACZNY C, EICKMEIER O, ROSEWICH M, FEIFEL K, HERRMANN E, POYNARD T, GLEIBER W, LAIS C, ZIELEN S, WAGNER TO, ZEUZEM S, BOJUNGA J: Non-invasive measurement of liver and pancreas fibrosis in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2013; 12(5): 431-439.

[Fra 2007] FRAQUELLI M, RIGAMONTI C, CASAZZA G, CONTE D, DONATO MF, RONCHI G, COLOMBO M: Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56(7): 968-973.

[Fri 1993] FRIEDMAN SL: The cellular basis of hepatic fibrosis – mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328(25): 1828-1835.

[Fri 1999] FRIEDMAN SL: Stellate cell activation in alcoholic fibrosis – an overview. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1999; 23(5): 904-910.

[Fri 2006] FRIEDMAN SL, BANSAL MB: Reversal of hepatic fibrosis – fact or fantasy? *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1): S82-S88.

[Fri 2010] FRIEDMAN SL: Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(8): 425-436.

[Ga 2001] GABOLDE M, HUBERT D, GUILLOUD-BATAILLE M, LENAERTS C, FEINGOLD J, BESMOND C: The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Med Genet* 2001; 38(5): 310-311.

[Gas 1988] GASKIN KJ, WATERS DLM, HOWMAN-GILES, DE SILVA M, EARL JW, MARTIN HC, KAN AE, BROWN JM, DORNEY SF: Liver disease and common bile-duct stenosis in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1988; 318(6): 340-346.

[Ge 2004] GEORGE J, TSUTSUMI M, TAKASE S: Expression of hyaluronic acid on N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis in rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(2): 307-319.

[Gi 1959] GIBSON LE, COOKE RE: A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23(3): 545-549.

[Gia 2006] GIANNELLI G, BERGAMINI C, MARINOSCI F, FRANSVEA E, NAPOLI N, MAUREL P, DENTICO P, ANTONACI S: Antifibrogenetic effect of IFN-alpha2b on hepatic stellate cell activation by human hepatocytes. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26(5): 301-308.

[Gie 2011] GIESELER RK, MARQUITAN G, SCHLATTJAN M, SOWA JP, BECHMANN LP, TIMMJ, ROGGENDORF M, GERKEN G, FRIEDMAN SL, CANBAY A: Hepatocyte apoptotic bodies encasing nonstructural HCV proteins amplify hepatic stellate cell activation: implications for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2011; 18(11): 760-767.

[Go 2003] GOLDSBY RA, KINDT TJ, OSBORNE BA, KUBY J: Enzyme-linked immunosorbent Assay. W.H. Freeman New York 2003; In: *Immunology*, 5<sup>th</sup> ed. S.148-150. ISBN: 0-7167-4947-5.

[Gom 2006] GÓMEZ-DOMÍNGUEZ E, MENDOZA J, RUBIO S, MORENO-MONTEAGUDO JA, GARCÍA-BUEY L, MORENO-OTERO R: Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(3): 513-518.

[Gr 2009] GRESSNER AM, GAO CF, GRESSNER OA: Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: a short survey. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(20): 2433-2440.

[Gu 2008] GUHA IN, PARKES J, RODERICK P, CHATTOPADHYAY D, CROSS R, HARRIS S, KAYE P, BURT AD, RYDER SD, AITHAL GP, DAY CP, ROSENBERG WM: Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European liver fibrosis panel and exploring simple markers. *Hepatology* 2008; 47(2): 455-460.

[Ha 1993] HAKALA BE, WHITE C, RECKLIES AD: Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1993; 268(34): 25803-25810.

[Han 2004] HAN YP, ZHOU L, WANG J, XIONG S, GARNER WL, FRENCH SW, TSUKAMOTO H: Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem* 2004; 279(6): 4820-4828.

[Har 2006] HARTLEY JL, BROWN RM, TYBULEWICZ A, HAYES P, WILSON DC, GILLETT P, MC KIERNAN P: Hyaluronic acid predicts hepatic fibrosis in children with hepatic disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43(2): 217-221.

[He 2010] HERRMANN U, DOCKTER G, LAMMERT F: Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24(5): 585-592.

[Hec 2011] HECTOR A, KORMANN MS, MACK I, LATZIN P, CASAULTA C, KIENINGER E, ZHOU Z, YILDIRIM AÖ, BOHLA A, RIEBER N, KAPPLER M, KOLLER B, EBER E, EICKMEIER O, ZIELEN S, EICKELBERG O, GRIESE M, MALL MA, HARTL D: The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One* 2011; 6(9): e24399.

[Hem 2007] HEMMANN S, GRAF J, RODERFELD M, ROEB E: Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46(5): 955-975.

[Hen 2002] HENRION-CAUDE A, FLAMANT C, ROUSSEY M, HOUSSET C, FLAHAULT A, FRYER AA, CHADELAT K, STRANGE RC, CLEMENT A: Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Hepatology* 2002; 36(4 Pt 1): 913-917.

[Her 2011] HERANDEZ-GEA V, FRIEDMAN SL: Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol: Mechanisms of Disease* 2011; 6: 425-456.

[Herb 1997] HERBST H, WEGE T, MILANI S, PELLEGRINI G, ORZECZOWSKI HD, BECHSTEIN WO, NEUHAUS P, GRESSNER AM, SCHUPPAN D: Tissue inhibitor of metallo-proteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997; 150(5): 1647-1659.

[Ho 2002] HÖRSTRUP JH, GEHRMANN M, SCHNEIDER B, PLÖGER A, FROESE P, SCHIROP T, KAMPF D, FREI U, NEUMANN R, ECKARDT KU: Elevation of serum and urine levels of TIMP-1 and tenascin in patients with renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(6): 1005-1013.

[Ik 1999] IKEDA K, WAKAHARA T, WANG YQ, KADOYA H, KAWADA N, KANEDA K: In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; 29(6): 1760-1767.

[Im 1995] IMAI K, YOKOHAMA Y, NAKANISHI I, OHUCHI E, FUJII Y, NAKAI N, OKADA Y: Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 1995; 270(12): 6691-6697.

[Ir 1995] IREDALE JP, GODDARD S, MURPHY G, BENYON RC, ARTHUR MJ: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Lond)* 1995; 89(1): 75-81.

[Ir 1992] IREDALE JP, MURPHY G, HEMBRY RM, FRIEDMAN SL, ARTHUR MJ: Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 282-287.

[Ir 1996] IREDALE JP, BENYON RC, ARTHUR MJ, FERRIS WF, ALCOLADO R, WINWOOD PJ, CLARK N, MURPHY G: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996; 24(1): 176-184.

[Ir 1997] IREDALE JP: Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(1): 43-54.

[Is 1998] ISHIHARA T, HAYASAKA A, YAMAGUCHI T, KONDO F, SAISHO H: Immunohistochemical study of transforming growth factor-beta 1, matrix metalloproteinase-2,9, tissue inhibitors of metalloproteinase-1,2 and basement membrane components at pancreatic ducts in chronic pancreatitis. *Pancreas* 1998; 17(4): 412-418.

[Ja 2013] JANSSEN J, LAATZ W: Statistische Datenanalyse mit SPSS Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests. 8. Auflage 2013, Springer Berlin Heidelberg Verlag 2013; S. 615 Kolmogorov Smirnov Test für eine Stichprobe.

[Jo 1992] JOHANSEN JS, WILLIAMSON MK, RICE JS, PRICE PA: Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992; 7(5): 501-512.

[Jo 1997] JOHANSEN JS, MØLLER S, PRICE PA, BENDTSEN F, JUNGE J, GARBARSCHE C, HENRIKSEN JH: Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? Scand J Gastroenterol 1997; 32(6): 582-590.

[Jo 2000] JOHANSEN JS, CHRISTOFFERSEN P, MØLLER S, PRICE PA, HENRIKSEN JH, GARBARSCHE C, BENDTSEN F: Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. J Hepatol 2000; 32(6): 911-920.

[Jo 2006] JOHANSEN JS: Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. Dan Med Bull 2006; 53(2): 172-209.

[Joh 2002] JOHNSON TS, HAYLOR JL, THOMAS GL, FISHER M, EL NAHAS AM: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental renal scarring. Exp Nephrol 2002; 10(3): 182-195.

[Jok 2012] JOKA D, WAHL K, MOELLER S, SCHLUE J, VASKE B, BAHR MJ, MANN MP, SCHULZE-OSTHOFF K, BANTEL H: Prospektive biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2012; 55(2): 455-464.

[Ka 2009] KANAMOTO M, SHIMADA M, IKEGAMI T, UCHIYAMA H, IMURA S, MORINE Y, KANEMURA H, ARAKAWA Y, NII A: Real time elastography for noninvasive diagnosis of liver fibrosis. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2009; 16(4): 463-467.

[Kam 2006] KAMAL SM, TURNER B, HE Q, RASENACK J, BIANCHI L, AL TAWIL A, NOOMAN A, MASSOUD M, KOZIEL MJ, AFDHAL NH: Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. Hepatology 2006; 43(4): 771-779.

[Kap 2012] KAPPLER M, ESPACH C, SCHWEIGER-KABESCH A, LANG T, HARTL D, HECTOR A, GLASMACHER C, GRIESE M: Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis liver disease – a retrospective long-term follow-up case-control study. Aliment Pharmacol Ther. 2012; 36(3):266-273. Epub 2012 Jun 7.

[Kar 2012] KARLAS T, NEUSCHULZ M, OLTMANN S, 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 (7): e42139.

[Ke 1989] KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A, BUCHWALD M, TSUI LC: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245(4922): 1073-1080.

[Ker 2008] KEREM E, HIRAWAT S, ARMONI S, YAAKOV Y, SHOSEYOV D, COHEN M, NISSIM-RAFINIA M, BLAU H, RIVLIN J, AVIRAM M, ELFRING GL, NORTHCUTT VJ, MILLER LL, KEREM B, WILSCHANSKI M: Effectiveness of PTC 124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. Lancet 2008; 372(9640): 719-727.

[Ket 2007] 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. J Hepatol. 2007; 46(4): 628-634.

[Ki 2006] KINNMAN N, LINDBLAD A, HOUSSET C, BUENTKE E, SCHEYNIUS A, STRANDVIK B, HULTCRANTZ R: Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in liver tissue from patients with cystic fibrosis. Hepatology 2000; 32(2): 334-340.

[Kim 2007] KIM KM, CHOI WB, PARK SH, YU E, LEE HC, CHUNG YH, LEE YS, SUH DJ: Diagnosis of hepatic steatosis and fibrosis by transient elastography in asymptomatic healthy individuals: a prospective study of living related potential liver donors. J Gastroenterol. 2007; 42(5): 382-388.

[Kis 2008] KISSELEVA T, BRENNER DA: Mechanisms of fibrogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 2008; 233(2): 109-122.

[Kit 2013] KITSON MT, KEMP WW, ISER DM, PAUL E, WILSON JW, ROBERTS SK: Utility of transient elastography in the non-invasive evaluation of cystic fibrosis liver disease. Liver Int 2013; 33(5): 698-705.

[Kn 1985] KNOWLTON RG, COHEN-HAGUENAUER O, VAN CONG N, FRÉZAL J, BROWN VA, BARKER D, BRAMAN JC, SCHUMM JW, TSUI LC, BUCHWALD M, et al: A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 1985; 318(6044): 380-382.

[Knä 1993] KNÄUPER V, WILHELM SM, SEPERACK PK, DECLERCK YA, LANGLEY KE, OSTHUES A, TSCHESCHE H: Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem J* 1993; 295( Pt 2): 581-586.

[Knä 1996] KNÄUPER V, LOPEZ-OTIN C, SMITH B, KNIGHT G, MURPHY G: Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271(3): 1544-1550.

[Knä 2002] KNÄUPER V, BAILEY L, WORLEY JR, SOLOWAY P, PATTERSON ML, MURPHY G: Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Letters* 2002; 532(1-2): 127-130.

[Kni 1999] KNITTEL T, MEHDE M, KOBOLD D: Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999; 30(1): 48-60.

[Kni 2000] KNITTEL T, MEHDE M, GRUNDMANN A, SAILE B, SCHARF JG, RAMADORI G : Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113(6): 443-453.

[Kno 1981] KNOWLES M, GATZY J, BOUCHER R: Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1981; 305(25): 1489-1495.

[Ko 2014] KOBELSKA-DUBIEL N, KLINCEWICZ B, CICHY W: Liver disease in cystic fibrosis. *Prz Gastroenterol.* 2014; 9(3): 136-141.

[Kr 2005] KRONENBERGER B, WAGNER M, HERRMANN E, MIHM U, PIIPER A, SARRAZIN C, ZEUZEM S: Apoptotic cytokeratin 18 neoepitopes in serum of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2005; 12(3): 307-314.

[Ku 2001] KUMAR D, TANDON RK: Use of ursodesoxycholic acid in liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(1): 3-14.

[KuN 1997] KU NO, LIAO J, OMARY MB: Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem.* 1997; 272(52): 33197-33203.

[La 2004] LAMIREAU T, MONNEREAU S, MARTIN S, MARCOTTE JE, WINNOCK M, ALVAREZ F: Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study. *J Hepatol* 2004; 41(6): 920-925.

[Le 1997] LEPAGE G, PARADIS K, LACAILLE F, SÉNÉCHAL L, RONCO N, CHAMPAGNE J, LENAERTS C, ROY CC, RASQUIN-WEBER A: Ursodesoxycholic acid improves the hepatic metabolism of essential fatty acids and retinol in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1997; 130(1): 52-58.

[Lé 2007] DE LÉDINGHEN V, LE BAIL B, REBOUSSOUX L, FOURNIER C, FOUCHER J, MIETTE V, CASTÉRA L, SANDRIN L, MERROUCHE W, LAVRAND F, LAMIREAU T: Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45(4): 443-450.

[Leb 2011] LEBENSZTEJN DM, WIERZBICKA A, SOCHA P, PRONICKI M, SKIBA E, WERPACHOWSKA I, KACZMARSKI M: Cytokeratin-18 and hyaluronic acid levels predict liver fibrosis in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Biochem Pol* 2011; 58(4): 563-566.

[Lebr 2008] LEBRAY P, VARNOUS S, CHARLOTTE F, VARAUT A, POYNARD T, RATZIU V: Liver stiffness is an unreliable marker of liver fibrosis in patients with cardiac insufficiency. *Hepatology* 2008; 48(6): 2089.

[Lee 2003] LEE HS, MIAU LH, CHEN CH et al: Differential role of p38 in IL-alpha induction of MMP-9 and MMP-13 in an established liver myofibroblast cell line. *J Biomed Sci* 2003; 10(6 Pt 2): 757-765.

[LeeC 2013] LEE CK, PEREZ-ATAYDE AR, MITCHELL PD, RAZA R, AFDHAL NH, JONAS MM: Serum biomarkers and transient elastography as predictors of advanced liver fibrosis in a United States cohort: the Boston children's hospital experience. *J Pediatr* 2013; 163(4): 1058-1064.e2.

[Leer 1999] LEERS MP, KÖLGEN W, BJÖRKLUND V, BERGMAN T, TRIBBICK G, PERSSON B, BJÖRKLUND P, RAMAEKERS FC, BJÖRKLUND B, NAP M, JÖRN-VALL H, SCHUTTE B: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187(5): 567-572.

[Leeu 2014] LEEUWEN L, FITZGERALD DA, GASKIN KJ: Liver disease in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2014; 15(1): 69-74.

[Len 2003] LENAERTS C, LAPIERRE C, PARTIQUIN H, BUREAU N, LEPAGE G, HAREL F, MARCOTTE J, ROY CC: Surveillance for cystic fibrosis-associated hepatobiliary disease: early ultrasound changes and predisposing factors. *J Pediatr* 2003; 143(3): 343-350.

[Leo 2008] LEONIS MA, BALISTRERI WF: Evaluation and management of end-stage liver disease in children. *Gastroenterology* 2008; 134(6): 1741-1751.

[Ler 2004] LEROY V, MONIER F, BOTTARI S, TROCME C, STURM N, HILLERET MN, MOREL F, ZARSKI JP: Circulating Matrix Metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(2): 271-279.

[Leu(1) 2015] LEUNG DH, YE W, MOLLESTON JP, WEYMANN A, LING S, PARANJAPE SM, ROMERO R, SCHWARZENBERG SJ, PALERMO J, ALONSO EM, MURRAY KF, MARSHALL BC, SHERKER AH, SIEGEL MJ, KRISHNAMURTHY R, HARNED R, KARMAZYN B, MAGEE JC, NARKEWICZ MR; Cystic Fibrosis Liver Disease Network (CFLD NET): Baseline Ultrasound and Clinical Correlates in Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr*. 2015; 167(4): 862-868.e2.

[Leu(2) 2015] 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 Nov; 62(5):1576-83.

[Lev 1976] LEVINE RA, HALL RC: Cyclic AMP in secretin choleresis. Evidence for a regulatory role in man and baboons but not in dogs. *Gastroenterology* 1976; 70(4): 537-544.

[Lew 2002] 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. *Am J Pathol*. 2002; 160(5): 1705-1715.

[Lew 2011] 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(1): 193-201.

[Li 1992] LINDBLAD A, HULTCRANTZ R, STRANDVIK B: Bile duct destruction and collagen deposition: a prominent ultrastructural feature of the liver in cystic fibrosis. *Hepatology* 1992; 16(2): 372-381.

[Li 1998] LINDBLAD A, GLAUMANN H, STANDVIK B: A two-year prospective study of the effect of ursodesoxycholic acid on urinary bile acid excretion and liver morphology in cystic fibrosis-associated liver disease. *Hepatology* 1998; 27(1): 166-174.

[Li 1999] LINDBLAD A, GLAUMANN H, STRANDVIK B: Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology* 1999; 30(5): 1151-1158.

[Lia 2012] LIANG B, LI Y, ZHAO A, XIE F, GUO Z: Clinical utility of serum matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 concentrations in the assessment of liver fibrosis due to chronic hepatitis B. *J Int Med Res* 2012; 40(2): 631-639.

[Lic 2003] LICHTINGHAGEN R, BAHR MJ, WEHMEIER M, MICHELS D, HABERKORN CI, ARNDT B, FLEMMING P, MANN S MP, BOEKER KH: Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105(3): 373-382.

[Lit 2000] LITTLEWOOD JM: Good care for people with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2000; 1(2): 179-189.

[Lot 2009] LOTTSPREICH F: Introduction to Proteomics. *Methods Mol Biol* 2009; 564: 3-10.

[Lu 2009] LUCIDARME D, FOUCHER J, LE BAIL B, VERGNIOL J, CASTERAL, DUBURQUE C, FORZY G, FILOCHE G, COUZIGOU P, DE LÉDINGHEN V: Factors of accuracy of transient elastography (FibroScan) for the diagnosis of liver fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2009; 49 (4): 1083-1089.

[Ma 1964] MATTHEWS LW, DOERSHUK CF, WISE M, EDDY G, NUDELMAN H, SPECTOR S: A therapeutic regimen for patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1964; 65: 558-575.

[Man 2012] MANCO M, ZUPONE CL, ALGHISI F, D'ANDREA ML, LUCIDI V, MONTI L: Pilot study on the use of acoustic radiation force impulse imaging in the staging of cystic fibrosis associated liver disease. *J Cyst Fibros* 2012; 11(5): 427-432.

[Mau 1989] MAURAGE C, LENAERTS C, WEBER A, BROCHU P, YOUSEF I, ROY CC: Meconium ileus and its equivalent as a risk factor for the development of cirrhosis: an autopsy study in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989 Jul; 9(1): 17-20.

[Mc 2003] MC KONE EF, EMERSON SS, EDWARDS KL, AITKEN ML: Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2003; 361(9370): 1671-1676.

[Mal 1999] MALINDA KM, PONCE L, KLEINMAN HK, SHACKELTON LM, MILLIS AJ: Gp38k, a protein synthesized vascular smooth muscle cells stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res* 1999; 250(1): 168-173.

[Malb 2011] MALBRUNOT-WAGNER AC, BRIDOUX L, NOUSBAUM JB, RIOU C, DIROU C, GINIES JL, MAURAGE C, CAGNARD B, PELATAN C, DABADIE A: Transient elastography and portal hypertension in pediatric patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2011; 10(5): 338-342.

[Me 2010] MENTEN R, LEONARD A, CLAPUYT P, VINCKE P, NICOLAE AC, LEBECQUE P: Transient elastography in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Radiol* 2010; 40(7):1231-1235.

[med 2012] <http://www.medizin2.uk-wuerzburg.de/schwerpunkte-der-klinik/infektiologie/leber-und-infektionsambulanz/sonographiefibroscan.html> (letzter Zugriff: 22.10.2012); <http://www.medizin2.ukwuerzburg.de/typo3temp/pics/4dbbed2632.jpg>; <http://www.medizin2.uk-wuerzburg.de/uploads/pics/fibro1.jpg> (letzter Zugriff: 22.10.2012)

[Meh 2005] MEHTA A: CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr Pulmonol* 2005; 39(4): 292-298.

[Meha 2010] MEHAL W, IMAEDA A: Cell death and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2010; 30(3): 226-231.

[Mi 2008] MISHRA A, GREAVES R, SMITH K, CARLIN JB, WOOTTON A, STIRLING R, MASSIE J: Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age-specific reference intervals. *J Pediatr* 2008; 53(6): 758-763.

[Mil 2008] MILLONIG G, REIMANN FM, FRIEDRICH S, FONOUNI H, MEHRABI A, BÜCHLER MW, SEITZ HK, MUELLER S: Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48(5): 1718-1723.

[Mo 2009] MOYER K, BALISTRERI WF: Hepatobiliary disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25(3): 272-278.

[Mor 2011] MORMONE E, GEORGE J, NIETO N: Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 2011; 193(3): 225-31.

[Moh 2003] MOHANTY AK, SINGH G, PARAMASIVAM M, SARAVANAN K, JABEEN T, SHARMA S, YADAV S, KAUR P, KUMAR P, SRINIVASAN A, SINGH TP: Crystal structure of a novel regulatory 40-kDa mammary gland protein (MGP-40) secreted during involution. *J Biol Chem* 2003; 278(16): 14451-14460.

[Mon 2012] MONTI L, MANCO M, LO ZUPONE C, LATINI A, D'ANDREA ML, ALGHISI F, LUCIDI V, TOMÀ P, BONOMO L: Acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging with Virtual Touch Tissue Quantification in liver disease associated with cystic fibrosis in children. *Radiol Med* 2012; 117(8): 1408-1418.

[Mu 2009] MULLER M, GENNISSON JL, DEFFIEUX T, TANTER M, FINK M: Quantitative viscoelasticity mapping of human liver using supersonic shear imaging: preliminary in vivo feasibility study. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35(2): 219-229.

[Mue 2008] MUELLER-ABT PR, FRAWLEY KJ, GREER RM, LEWINDON PJ: Comparison of ultrasound and biopsy findings in children with cystic fibrosis related liver disease. *J Cyst Fibros* 2008; 7(3): 215-221.

[Mur 2002] MURPHY FR, ISSA R, ZHOU X, RATNARAJAH S, NAGASE H, ARTHUR MJ, BENYON C, IREDALE JP: Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277(13): 11069-11076.

[Mura 1997] MURAWAKI Y, IKUTA Y, IDOBE Y, KITAMURA Y, KAWASAKI H: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the liver patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1997; 26(6): 1213-1219.

[My 2012] MYERS RP, POMIER-LAYRARGUES G, KIRSCH R, POLLETT A, BEATON M, LEVSTIK M, DUARTE-ROJO A, WONG D, CROTTY P, ELKASHAB M: Discordance in fibrosis staging between liver biopsy and transient elastography using the FibroScan XL probe. *J Hepatol* 2012; 56(3):564-570.

[Na 1990] NAGASE H, ENGHILD JJ, SUZUKI K, SALVESEN G: Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stomelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 1990; 29(24): 5783-5789.

[nl 2012] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000107.htm> Cystic fibrosis: MedlinePlus Medical Encyclopedia. Aktualisiert von Neil K. Kaneshiro, MD, MHA, Clinical Assistant Professor of Pediatrics, University of Washington School of Medicine. Auch geprüft durch David Zieve, MD, MHA Medical Director, A.D.A.M. Health Solutions, Ebix, Inc. (letzter Zugriff: 15.10.2012).

[Nk 2013] NKYIMBENG T, RUPPERT C, SHIOMI T, DAHAL B, LANG G, SEEGER W, OKADA Y, D'ARMIENTO J, GÜNTHER A: Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One 2013; 8(9): e73279.

[No 2008] NOBILI V, VIZZUTTI F, ARENA U, ABRALDES JG, MARRA F, PIETROBATTISTA A, FRUHWIRTH R, MARCELLINI M, PINZANI M: Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2008; 48(2): 442-448.

[No(1) 2009] NOBILI V, PARKES J, BOTTAZZO G, MARCELLINI M, CROSS R, NEWMAN D, VIZZUTTI F, PINZANI M, ROSENBERG WM: Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2009; 136(1): 160-167.

[No(2) 2009] NOBILI V, ALISI A, VANIA A, TIRIBELLI C, PIETROBATTISTA A, BEDOGNI G: The pediatric NAFLD fibrosis index: a predictor of liver fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. BMC Med 2009 7: 21.

[No 2010] NOBILI V, ALISI A, TORRE G, DE VITO R, PIETROBATTISTA A, MORINO G, DE VILLE DE GOYET J, BEDOGNI G, PINZANI M: Hyaluronic acid predicts hepatic fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. Transl Res 2010; 156(4): 229-234.

[No 2011] NOBILI V, MONTI L, ALISI A, LO ZUPONE C, PIETROBATTISTA A, TOMÀ P: Transient elastography for assessment of fibrosis in paediatric liver disease. Pediatr Radiol 2011; 41(10): 1232-1238.

[Nø 2003] NØJGAARD CAMILLA, JOHANSEN JS, CHRISTENSEN E, SKOVGAARD LT, PRICE PA, BECKER U; EMALD Group: Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003; 39(2): 179-186.

[Noa 1999] NO AUTHORS LISTED: Genetic testing for cystic fibrosis. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on genetic testing for cystic fibrosis. *Arch Intern Med* 1999; 159 (14): 1529-1539.

[Ob 1997] OBERTI F, VALSESIA E, PILETTE C, ROUSSELET MC, BEDOSSA P, AUBÉ C, GALLOIS Y, RIFFLET H, MAÏGA MY, PENNEAU-FONTBONNE D, CALÈS P: Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 113(5): 1609-1616.

[Oc 1996] O`CONNOR PJ, SOUTHERN KW, BOWLER IM: The role of hepatobiliary scintigraphy in cystic fibrosis. *Hepatology* 1996; 23(2): 281-287.

[Og 1992] OGATA Y, ENGHILD JJ, NAGASE H: Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992; 267(6): 3581-3584.

[Oh 2001] OH S, AFDHAL NH: Hepatic fibrosis: are any of the serum markers useful? *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3(1): 12-18.

[Op 1975] OPPENHEIMER EH, ESTERLY JR: Hepatic changes in young infants with cystic fibrosis: possible relation to focal biliary cirrhosis. *J Pediatr* 1975; 86(5): 683-689.

[Ov 2012] OVCHINSKY N, MOREIRA RK, LEFKOWITCH JH, LAVINE JE: Liver biopsy in modern clinical practice: a pediatric point-of-view. *Adv Anat Pathol*. 2012; 19(4): 250-262.

[Pa 2002] PAUMGARTNER G, BEUERS U: Ursodesoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002; 36(3): 525-531.

[Par 2004] PARKS WC, WILSON CL, LOPEZ-BOADO: Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Rev* 2004; 4(8): 617-629.

[Pat 1999] PATRIQUIN H, LENAERTS C, SMITH L, PERREAULT G, GRIGNON A, FILIATRAULT D, BOISVERT J, ROY CC, RASQUIN-WEBER A: Liver disease in cystic fibrosis: US-biochemical comparison in 195 patients. *Radiology* 1999; 211(1): 229-232.

[pf 2015] <http://pflege-und-medizin.de/Atmung/Mucoviszidose/muc.jpg> (letzter Zugriff: 19.10.2015) (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Volker Schmieden)

[Ph 2003] PHILLIPS PA, MC CARROLL JA, PARK S, WU MJ, PIROLA R, KORSTEN M, WILSON JS, APTE MV: Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 2003; 52(2): 275-282.

[Po 1997] POTTER CJ, FISHBEIN M, HAMMOND S, MCCOY K, QUALMAN S: Can the histologic changes of cystic fibrosis-associated hepatobiliary disease be predicted by clinical criteria? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25(1): 32-36.

[Pr 2015] PRYSTUPA A, SZPETNAR M, BOGUSZEWSKA-CZUBARA A, GRZYBOWSKI A, SAK J, ZALUSKA W: Activity of MMP1 and MMP13 and amino acid metabolism in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Med Sci Monit* 2015; 21: 1008-1014.

[Pra 2013] PRADHAN F, LADAK F, TRACEY J, CROTTY P, MYERS RP: Feasibility and reliability of the FibroScan S2 (pediatric) probe compared with the M probe for liver stiffness measurement in small adults with chronic liver disease. *Ann Hepatol* 2013; 12(1): 100-107.

[Qu 2008] QUINTON PM: Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* 2008; 372(9636): 415-417.

[Ra 2011] RATH T, RODERFELD M, GÜLER C, WENZEL C, GRAF J, BEITINGER F, ROEB E, ZACHOVAL R: YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46(11): 1369-1380.

[Ra 2012] 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. *Dig Liver Dis* 2012; 44(9): 780-787.

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

[Ra 2014] 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(12): e115847.

[Ram 2004] RAMADORI G, SAILE B: Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004; 84(2): 153-159.

[Rama 2009] RAMACHANDRAN P, IREDALE JP: Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2009; 8(4): 283-91.

[Ramo 1999] RAMOS-DESIMONE N, HAHN-DANTONA E, SIPLEY J, NAGASE H, FRENCH DL, QUIGLEY JP: Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13066-13076.

[Re 2002] RECKLIES AD, WHITE C, LING H: The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 2002; 365(Pt 1): 119-126.

[Reh 1997] REHLI M, KRAUSE SW, ANDREESEN R: Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics*. 1997; 43(2): 221-225.

[Ren 1998] RENKEMA GH, BOOT RG, AU FL, DONKER-KOOPMAN WE, STRIJLAND A, MUIJSERS AO, HREBICEK M, AERTS JM: Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998; 251(1-2): 504-509.

[Ri 1989] RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, ZIELENSKI J, LOK S, PLAVSIC N, CHOU JL, et al: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245(4922): 1066-1073.

[Ris 1988] RISTELIJ; NIEMI S, TRIVEDI P, MÄENTAUSTA O, MOWAT AP, RISTELI L: Rapid equilibrium radioimmunoassay for the amino-terminal propeptide of human Type III procollagen. *Clin Chem* 1988; 34(4): 715-718.

[Ro 2006] RODERFELD M, GEIER A, DIETRICH CG, SIEWERT E, JANSEN B, GARTUNG C, ROEB E: Cytokine blockade inhibits hepatic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and up-regulates matrix metalloproteinase-9 in toxic liver injury. *Liver Int* 2006; 26(5): 579-586.

[Ro 2009] RODERFELD M, RATH T, SCHULZ R, SEEGERW, TSCHUSCHNER A, GRAF J, ROEB E: Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: relation to pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros* 2009; 8(5): 338-347.

[Roc 2008] ROCKEY DC: Non-invasive assessment of liver fibrosis and portal hypertension with transient elastography. *Gastroenterology* 2008; 134(1): 8-14.

[Roe 1993] ROEB E, GRAEVE L, HOFFMANN R, DECKER K, EDWARDS DR, HEINRICH PC: Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. *Hepatology* 1993; 18(6): 1437-1442.

[Roe 1994] ROEB E, GRAEVE L, MULLBERG J, MATERN S, ROSE-JOHN S: TIMP-1 protein expression is stimulated by IL-1 beta and IL-6 in primary rat hepatocytes. *FEBS Letters* 1994; 349(1): 45-49.

[Roe 1995] ROEB E, ROSE-JOHN S, ERREN A, EDWARDS DR, MATERN S, GRAEVE L, HEINRICH PC: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in rat liver cells is increased by lipopolysaccharide and prostaglandin E2. *FEBS Letters* 1995; 357(1): 33-36.

[Roe 1997] ROEB E, PURUCKER E, BREUER B, NGUYEN H, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S, MATERN S: TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27(3): 535-544.

[Roh 1983] RHODE H, LANGER I, KRIEG T, TIMPL R: Serum and urine analysis of the aminoterminal procollagen peptide type III by radioimmunoassay with antibody Fab fragments. *Coll Relat Res* 1983; 3(5): 371-379.

[Rom 1989] ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M, ROZMAHEL R, COLE JL, KENNEDY D, HIDAHA N, et al: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245(4922): 1059-1065.

[Row 2005] ROWE SM, MILLER S, SORSCHER EJ: Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352(19): 1992-2001.

[Rowl 2015] ROWLAND M, GALLAGHER C, GALLAGHER CG, LAOIDE RÒ, CANNY G, BRODERICK AM, DRUMMOND J, GREALLY P, SLATTERY D, DALY L, MCEL-VANEY NG, BOURKE B: Outcome in patients with cystic fibrosis liver disease. *J Cyst Fibros* 2015; 14(1): 120-126.

[Roma 1999] ROMAN RM, FERANCHAK AP, SALTER KD, WANG Y, FITZ JG: Endogenous ATP regulates Cl<sup>-</sup> secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 1): G1391-G1400.

[Ru 2003] RUIZ V, ORDÓÑEZ RM, BERUMEN J, RAMÍREZ R, UHAL B, BECERRIL C, PARDO A, SELMAN M: Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285(5): L1026-L1036.

[Sa 2003] SANDRIN L, FOURQUET B, HASQUENOPH JM, YON S, FOURNIER C, MAL F, CHRISTIDIS C, ZIOL M, POULET B, KAZEMI F, BEAUGRAND M, PALAU R: Transient elastography: a new non-invasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12): 1705-1713.

[Sak 2004] SAKAKI H, MATSUMIYA T, KUSUMI A, IMAIZUMI T, SATOH H, YOSHIDA H, SATOH K, KIMURA H: Interleukin-1 beta induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oral Dis* 2004; 10(2): 87-93.

[Sc 1999] SCHUPPAN D, JAX C, HAHN EG: Serummarker der Leberfibrose. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1999; 124 (41): 1213-1218.

[Sc 2001] SCHUPPAN D, RUEHL M, SOMASUNDARAM R, HAHN EG: Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 351-372.

[Sc 2008] SCHUPPAN D, AFDHAL NH: Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371(9615): 838-851.

[Sch 2004] SCHIRMACHER P, FLEIG WE, DIENES HP; Deutsche Gesellschaft für Pathologie (DGP), Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Kompetenznetz Hepatitis (HepNet): Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis. *Z Gastroenterol* 2004; 42 (2): 175-187.

[Schu 2004] SCHUTTE B, HENFLING M, KÖLGEN W, BOUMAN M, MEEUX S, LEERS MP, NAP M, BJÖRKLUND V, BJÖRKLUND P, BJÖRKLUND B, LANE EB, OMARY MB, JÖRNVALL H, RAMAEKERS FC: Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 2004; 297(1): 11-26.

[Sco 1991] SCOTT-JUPP R, LAMA M, TANNER MS: Prevalence of liver disease in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1991; 66(6): 698-701.

[Se 2000] SELMAN M, RUIZ V, CABRERA S, SEGURA L, RAMÍREZ R, BARRIOS R, PARDO A: TIMP-1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3): L562-L574.

[Sei 2005] SEIDEL N, VOLKMANN X, LÄNGER F, FLEMMING P, MANNS MP, SCHULZE-OSTHOFF K, BANTEL H: The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *Hepatology* 2005; 42(1): 113-120.

[Sh 1992] SHAHIN M, SCHUPPAN D, WALDHERR R, RISTELI J, RISTELI L, SAVO-LAINEN ER, OESTERLING C, ABDEL RAHMAN HM, EL SAHLY AM, ABDEL RAZEK SM, et al: Serum procollagen peptides and collagen Type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease. *Hepatology* 1992; 15(4): 637-644.

[She 2012] SHEN J, CHAN HL-J, WONG GL-H, CHAN AW, CHOI PC, CHAN PC, CHIM AM, YEUNG DK, YU J, CHU WC, WONG VW: Assessment of non-alcoholic fatty liver disease using serum total cell death and apoptosis markers. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(11-12): 1057-1066.

[Sm 1988] SMEDSRØD B: Aminoterminal propeptide of Type III procollagen is cleared from the circulation by receptor-mediated endocytosis in liver endothelial cells. *Coll Relat Res* 1988; 8(4): 375-388.

[So 1999] SOKOL RJ, DURIE PR: Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28(Suppl1): S1-13.

[Som 2003] SOMERVILLE RP, OBLANDER SA, APTE SS: Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; 4(6): 216.

[Sp 2010] SPOREA I, SIRLI R, POPESCU A, DANILĂ M: Acoustic radiation force impuls (ARFI) – a new modality for the evaluation of liver fibrosis. *Med Ultrason* 2010; 12(1): 26-31.

[Spi 2005] SPIRÌ C, FIOROTTO R, SONG L, SANTOS-SACCHI J, OKOLICSANYI L, MASIER S, ROCCHI L, VAIRETTI MP, DE BERNARD M, MELERO S, POZZAN T, STRAZZABOSCO M: Glibenclamide stimulates fluid secretion in rodent cholangiocytes through a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent mechanism. *Gastroenterology* 2005; 129(1): 220-233.

[St 2005] STEWART L: The role of abdominal ultrasound in the diagnosis, staging and management of cystic fibrosis liver disease. *J R Soc Med* 2005; 98(Suppl 45): 17-27.

[Sta 2014] STAUFER K, HALILBASIC E, TRAUNER M, KAZEMI-SHIRAZI L: Cystic fibrosis related liver disease--another black box in hepatology. *Int J Mol Sci* 2014; 15(8): 13529-13549.

[Ste 1982] STERN RC, BOAT TF, DOERSCHUK CF: Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for cystic fibrosis syndrome. *Lancet* 1982; 1(8286): 1401-1404.

[Sti 2001] STICKEL F, URBASCHEK R, SCHUPPAN D, POESCHL G, OESTERLING C, CONRADT C, MCCUSKEY RS, SIMANOWSKI UA, SEITZ HK: Serum collagen Type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue-turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001; 46(9): 2025-2032.

[Sto 2008] STOREY S, WALD G: Novel agents in cystic fibrosis. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(7): 555-556.

[Str 2010] STRAUB BK, SCHIRMACHER P: Pathology and biopsy assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis (Basel, Switzerland)* 2010; 28(1): 197-202.

[Stro 1995] STRONGIN AY, COLLIER I, BANNIKOV G, MARMER BL, GRANT GA, GOLDBERG GI: Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* 1995; 270(10): 5331-5338.

[Su 1990] SUZUKIK, ENGHILD JJ, MORODOMI T, SALVESEN G, NAGASE H : Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29(44): 10261-10270.

[Ta 2001] TAKAI KK, HATTORI S, IRIE S: Type V collagen distribution in liver is reconstructed in coculture system of hepatocytes and stellate cells; the possible functions of Type V collagen in liver under normal and pathological conditions. *Cell Struct Funct* 2001; 26(5): 289-302.

[Tao 2014] TAO H, YANG JJ, SHI KH, HUANG C, ZHANG L, LV XW, LI J: The significance of YKL-40 protein in liver fibrosis. *Inflamm Res* 2014; 63(4): 249-254.

[Tap 2012] TAPPER EB, COHEN EB, PATEL K, BACON B, GORDON S, LAWITZ E, NELSON D, NASSER IA, CHALLIES T, AFDHAL N: Levels of alanine aminotransferase confound use of transient elastography to diagnose fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. Clin Gastroenterol Hepatol 2012; 10(8): 932-937. e1.

[Th 2010] THOMPSON AJ, PATEL K: Antifibrotic therapies: will we ever get there? Curr Gastroenterol Rep 2010; 12(1): 23-29.

[The 1994] THE FRENCH METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP: Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 1994; 20(1 Pt 1): 15-20.

[Ti 1981] TIMPL R, GLANVILLE RW: The aminopropeptide of collagen. Clin Orthop Relat Res 1981; (158): 224-242.

[Tr 1992] TRINCHET J-C, HARTMANN DJ, PATERON D, MUNZ-GOTHEIL C, CALLARD P, VILLE G, BEAUGRAND M: Serum Type I collagen and N-terminal peptide of Type III procollagen in patients with alcoholic liver disease: relationship to liver histology. Alcohol Clin Exp Res 1992; 16(2): 342-346.

[Tra 2000] TRAN A, BENZAKEN S, SAINT-PAUL MC, GUZMAN-GRANIER E, HASTIER P, PRADIER C, BARJOAN EM, DEMUTH N, LONGO F, RAMPAL P: Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000; 12(9): 989-993.

[us 2015] <http://www.uscnk.de/typo3temp/pics/77e704ecc5.jpg> (letzter Zugriff: 19.10.2015) (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Chris Sun – cloud-clone.com)

[Va 2016] 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 Med Biol. 2016 Jan 21; pii: S0301-5629(15)00675-4.

[Vo 1998] VOLCK B, PRICE PA, JOHANSEN JS, SØRENSEN O, BENFIELD TL, NIELSEN HJ, CALAFAT J, BORREGAARD N: YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. Proc Assoc Am Physicians 1998; 110(4): 351-360.

[Vol 2006] VOLKMANN X, CORNBERG M, WEDEMEYER H, LEHNER F, MANNS MP, SCHULZE-OSTHOFF K, BANTEL H: Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006; 43(6): 1311-1316.

[Vol 2008] VOLKMANN X, ANSTAETT M, HADEM J, STIEFEL P, BAHR MJ, LEHNER F, MANNS MP, SCHULZE-OSTHOFF K, BANTEL H: Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology* 2008; 47(5): 1624-1633.

[Wa 2000] WANG Z, JUTTERMANN R, SOLOWAY PD: TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275(34): 26411-26415.

[Wat 2000] WATANABE T, NIIOKA M, HOZAWA S, KAMEYAMA K, HAYASHI T, ARAI M, ISHIKAWA A, MARUYAMA K, OKAZAKI I: Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Hepatology* 2000; 33(2): 224-235.

[We 2008] WEIß C DR (Hrsg.), BERTHOLD R PROF DR (Hrsg.): *Basiswissen Medizinische Statistik 4. Überarbeitete Auflage* 2008; Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. S. 218 f. Der U-Test von Mann and Whitney, S. 282 f. Die ROC-Analyse.

[Wi 1995] 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. *J Pediatr* 1995; 127(5): 705-710.

[Wi 1999] 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 CF-related liver disease. *Pediatrics* 1999; 103(1): 52-57.

[Wi 2007] WILSCHANSKI M, DURIE P: Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut* 2007; 56(8): 1153-1163.

[Wi 2008] WILSCHANSKI M: Patterns of gastrointestinal disease associated with mutations of CFTR. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10(3): 316-323.

[Wi 2011] WILSCHANSKI M, MILLER LL, SHOSEYOV D, BLAU H, RIVLIN J, AVIRAM M, COHEN M, ARMONI S, YAAKOV Y, PUGATSCH T, COHEN-CYMBERKNOH M, MILLER NL, REHA A, NORTHCUTT VJ, HIRAWAT S, DONNELLY K, ELFRING GL, AJAYI T, KEREM E: Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2011; 38(1): 59-69.

[Wit 2009] 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. *J Cyst Fibros* 2009; 8(6): 392-399.

[Wy 2010] WYNN TA, BARRON L: Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010; 30(3): 245-257.

[Wya 2002] WYATT HA, DHAWAN A, CHEESEMAN P, MIELI-VERGANI G, PRICE JF: Serum hyaluronic acid concentrations are increased in cystic fibrosis patients with liver disease. *Arch Dis Child* 2002; 86(3):190-193.

[Ya 1993] YANG Y, RAPER SE, COHN JA, ENGELHARDT JF, WILSON JM: An approach for treating the hepatobiliary disease of cystic fibrosis by somatic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(10): 4601-4605.

[Yas 2004] YASUI H, ANDOH A, BAMBA S, INATOMI O, ISHIDA H, FUJIYAMA Y: Role of fibroblast growth factor-2 in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human intestinal myofibroblasts. *Digestion* 2004; 69(1): 34-44.

[Yat 1999] YATA Y, TAKAHARA T, FURUI K, ZHANG LP, JIN B, WATANABE A: Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J Hepatol* 1999; 30(3): 425-432.

[Ye 2008] YESHUA H, OREN R: Non-invasive assessment of liver fibrosis. *Ann Transplant* 2008; 13(2): 5-11.

[Yo 2000] YOSHIJI H, KURIYAMA S, MIYAMOTO Y et al: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000; 32(6): 1248-1254.

[Zi 2000] ZIELENSKI J: Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67(2): 117-133.

[Zi 1999] ZIELENSKI J, COREY M, ROZMAHEL R, MARKIEWICZ D, AZNAREZ I, CASALS T, LARRIBA S, MERCIER B, CUTTING GR, KREBSOVA A, MACEK M JR, LANGFELDER-SCHWIND E, MARSHALL BC, DECELIE-GERMANA J, CLAUSTRES M, PALACIO A, BAL J, NOWAKOWSKA A, FEREC C, ESTIVILL X, DURIE P, TSUI LC: Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 1999; 22(2): 128-129.

## 12. Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in folgenden Arbeiten veröffentlicht:

### Originalarbeiten:

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. Dig Liv Dis 2012 Sep; 44(9); 780-787.

Rath T, Hage L, **Kügler M**, Menendez Menendez K, Zachoval R, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E. Serum proteome profiling identifies novel and powerful markers of cystic fibrosis liver disease. PLoS One. 2013; 8(3): e58955.

Rath T, Zwaschka L, Hage L, **Kügler M**, Menendez K, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E. Identification of neutrophil activation markers in CF patients as novel surrogate markers of CF lung disease. PLoS One. 2014; 9(12): e115847.

### Abstractveröffentlichungen:

**Kügler M**, Menendez Menendez K, Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Geidel Ch, Nährlich L, Tschuschner A, Weiß M, Roeb E. Früherkennung der Leberbeteiligung bei Mukoviszidosepatienten mittels transientser Elastographie und Fibrose-Biomarkern. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2011, Leipzig. Z Gastroenterol 2011; 49 - P395

**Kügler M**, Menendez K, Rath T, Schulz R, Geidel Ch, Nährlich L, Tschuschner A, Weiß M, Roderfeld M, Roeb E. TIMP-2, ein Serum-Marker für portale Hypertension bei Mukoviszidosepatienten. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) 2012, Hamburg. Z Gastroenterol 2012; 50 - P3\_21

**Kügler M**, Menendez Menendez K, Rath T, Schulz R, Geidel Ch, Nährlich L, Tschuschner A, Weiß M, Roderfeld M, Roeb E. Portale Hypertension korreliert mit Fibrose-Biomarkern bei Patienten mit Zystischer Fibrose. Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie (MGG) 2012, Jena. Der Gastroenterologe Volume 7, Issue 2 March 2012 p 168

**Kügler M**, Menendez M, Rath T, Schulz R, Geidel C, Nährlich L, Roderfeld M, Roeb E. Transiente Elastografie und Serummarker ermöglichen die Diagnose einer Leberbeteiligung bei pädiatrischen Mukoviszidosepatienten. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2013, Nürnberg. Z Gastroenterol 2013; 51 - K301

## 13. Anhang

### 13.1 Einwilligungserklärung der Patienten zur Teilnahme an der Studie



Justus-Liebig  
Universität Giessen  
Standort Giessen

## UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIESSEN UND MARBURG



Philipps-Universität  
Marburg

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

**Prof. Dr. med. Elke Roeb**

Medizinische Klinik II, Gastroenterologie  
Paul-Meimberg-Str. 5  
35385 Gießen, GERMANY

☎ (0641) 99 42338

☎ (0641) 99-42339

eroeb@gmx.de

www.med.uni-giessen.de

Gießen, 29. Mai 2009

### **Studie**

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

## 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 / Prof. Schulz / Dr. Geidel / Dr. Rath 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 dass 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

## 13.2 Patienteninformation

UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
GIESSEN UND MARBURG

### **Patienteninformation zur Studie :**

#### **„Früherkennung und Verlauf der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose-Patienten mittels Elastographie (Fibroscan®)“**

Liebe Patienten und Eltern!

Im Rahmen unserer Doktorarbeit möchten wir Dich / Sie bitten, dass Du / Ihr Kind an der oben genannten Studie teilnimm(st). Die Studie hat zum Ziel, die mögliche Leberbeteiligung bei Mukoviszidose-Patienten genauer zu untersuchen.

Im Verlauf der Mukoviszidose kann es bei ca. 10- 15% der Patienten zu bindegewebigen Veränderungen der Leber (zunächst Fibrosierung, später sog. Zirrhose) kommen. Im frühen Krankheitsstadium der Fibrosierung sind von den Patienten in der Regel keine Symptome bemerkbar. Je fortgeschrittener die Fibrose jedoch ist, desto eher kann es zur Zirrhose und den damit verbundenen Komplikationen kommen.

Ziel der Studie ist es, mit einem neuartigen Untersuchungsgerät – dem Fibroscan® – Veränderungen der Leber frühzeitiger als bisher möglich, zu erkennen. Die Ergebnisse werden nur von Leberspezialisten interpretiert, denen die Erkrankung Ihres Kindes und deren klinischer Rahmen bekannt sind.

Darüber hinaus wäre es von Nutzen, wenn man Ihrem Kind eine geringe Menge Blut (4-5 ml) entnehmen könnte, welches ebenfalls für die Studie benötigt wird. Eine Blutentnahme wird allerdings nur im Rahmen der jährlichen Kontroll-Blutentnahmen durchgeführt, so dass kein extra „Piks“ erfolgen wird - außer ggf. bei jugendlichen Patienten, die dies selbst wünschen. Im Blut sollen Leberwerte (u. a. Enzyme) gemessen werden, deren Bestimmung sonst in der Routineblutuntersuchung so nicht erfolgt. Diese sollen dann mit den Ergebnissen der Fibroscan®-Untersuchung in Zusammenhang gebracht werden. Ziel ist, hierbei einen Marker zu entwickeln, der in Zukunft bereits frühzeitig eine beginnende Fibrosierung der Leber anzeigt.

Die Untersuchung mittels Fibroscan® ist schmerzlos und schnell durchführbar. Sie gleicht in ihrem Untersuchungsablauf einer Sonographie (Ultraschall). Dabei kommt es zu keinerlei Strahlenbelastung.

Selbstverständlich ist Dein / Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie freiwillig; Du kannst / Sie können Ihre Einwilligung jederzeit widerrufen, ohne dass Dir / Ihnen hieraus Nachteile entstehen.

Sollten weitere Fragen auftreten, so wird Dir / Ihnen Ihr behandelnder Arzt diese gern beantworten.

Wir danken für Ihre Mitarbeit.

Katrin Menéndez  
(Doktorandin)

Marion Kügler  
(Doktorandin)

Prof. Dr. E. Roeb  
(Leiterin Gastroenterologie  
Betreuerin der Doktorarbeit)

Dr. Ch. Geidel  
(Komm. Leiter der  
CF-Ambulanz)

13.3 Ethikvotum

JUSTUS-LIEBIG



UNIVERSITÄT  
GIESSEN

FACHBEREICH 11



MEDIZIN

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

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

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

Gaffkyst. 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.

1 650 3D



# CERTIFICAT DE FORMATION TRAINING CERTIFICATE

Nous certifions par la présente que  
*This certifies that*

**Marion KÜGLER**

est habilité(e) à  
*is authorized to*

**Use Fibroscan® 502**

DISPOSITIF ECHOSENS **FibroScan® 502 with Medium and Small Probes**  
FIBROSCOPY DEVICE

DATE DE FORMATION **04-20-2010** DATE DE DÉLIVRANCE **05-03-2010** ENREGISTREMENT N° **UK035041004**  
TRAINING DATE ISSUE DATE REGISTRATION NUMBER

FORMATEUR **Nathalie KRONE-SEYWALD**  
TRAINER

SIGNATURE DU FORMATEUR  
TRAINER SIGNATURE

*N. Krone-Seywald*

SIGNATURE DU RESPONSABLE  
MANAGER SIGNATURE

*[Signature]*



### 13.5 Durchführung des ELISA exemplarisch für TIMP-1

Herstellung der einzelnen Reagenzien jeweils pro Mikrotiterplatte:

- Capture Antibody (cAB):
  1. Aliquot á 62,5 µl cAB in 10,96 ml PBS lösen,
  2. Mikrotiterplatte mit dieser Lösung vorbeschichten, indem man 100 µl pro Well invers pipettiert,
  3. über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.
  
- Wash Buffer:
  1. 0,05 % Tween in PBS lösen, d. h. 1 ml Tween 20 pure in 2 l PBS lösen,
  2. Lösung steril mit Steritopfilter filtrieren.
  
- Reagent Diluent:
  1. 1 % BSA in PBS, d. h. 3 g BSA in 297 ml PBS lösen,
  2. Lösung steril mit Steritopfilter filtrieren.
  
- Proben:
  1. auf Trockeneis vorsortieren,
  2. Proben 1:200 verdünnen,
  3. 5 µl der jeweiligen Probe mit 995 µl Reagent Diluent verdünnen.
  
- Standard:
  1. 3 Aliquots á 20 µl,
  2. 60 µl Standard in 540 µl Reagent Diluent lösen → 600 µl – Standard G,
  3. in 6 Eppendorff-Gefäße je 250 µl Reagent Diluent vorgeben (Standard A-F),
  4. als Leerwert 500 µl Reagent Diluent vorgeben,
  5. aus Standard G 250 µl in Eppendorff-Gefäß für Standard F weiter pipettieren, danach vermischen,
  6. aus Standard F 250 µl in Eppendorff-Gefäß für Standard E weiter pipettieren, danach vermischen,
  7. dies analog für Standard A-D,
  8. Standard A-G ist nun eine Verdünnungsreihe, wobei in Standard G die höchste Konzentration an Standard ist und in Standard A die niedrigste Konzentration des Standards; Blank ist frei von Standard.

- Detection Antibody (dAB):
  - o Aus einem Aliquot á 62,5 µl dAB 9 µl herauspipettieren und in 10,94 ml Reagent Diluent lösen.
  
- Streptavidin-HRP:
  1. 1:200 verdünnen,
  2. 55 µl Streptavidin-HRP in 10,95 ml Reagent Diluent lösen.
  
- Substrat Solution:
  1. 1:1 Mix aus Duo-Set-Kit,
  2. 5,5 ml Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit Color Reagent B (Tetramethylbenzidin) vermischen,
  3. vor direktem Licht schützen.
  
- Stopplösung:
  - o 2 ml Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Durchführung der ELISA-Prozedur:

Ein Tag bevor der ELISA gemessen wurde, musste die benötigte Anzahl von Mikrotiterplatten vorbeschichtet werden. Hierzu verwendete man die hergestellte cAB-Lösung. In jedes Well der Mikrotiterplatte wurden 100 µl dieser Lösung pipettiert. Dies wurde mit einer Multipette durchgeführt. Um möglichst genau zu arbeiten, war es notwendig, invers zu pipettieren. Die vorbeschichtete Platte inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur.

Am Tag der ELISA-Messung wurde die Platte drei Mal mit dem hergestellten Waschpuffer gewaschen um die nichtgebundenen Anteile zu entfernen. Am Ende des Waschens wurde die Platte trocken geklopft. Danach wird Blockierlösung, Reagent Diluent, in jedes Well zugegeben, in dem 150 µl Reagent Diluent in jedes Well der Platte pipettiert wurden. Anschließend folgte eine mindestens einstündige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Wiederholung des o. g. Waschschriffes. Dann war die Platte fertig für das Auftragen der Serumproben.

In der Zwischenzeit tauten die Serumproben der Patienten auf Eis auf und sind 1:200 verdünnt worden. Darüber hinaus ist ebenfalls die Verdünnungsreihe des Standards hergestellt worden, von der zuerst jeweils 100 µl zur Kontrolle aufgetragen wurden. Danach pipettierte man 100 µl der verdünnten Serumproben der Patienten auf die

Mikrotiterplatte. Sowohl die Standards als auch die Serumproben wurden jeweils doppelt aufgetragen um ein möglichst genaues Ergebnis zu erlangen. Hierzu wurde ein Mittelwert aus beiden Messungen gebildet. Es folgte eine weitere Inkubationszeit. Die Platte wurde mit einer klebenden Folie abgedeckt und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert.

Danach wurden alle nicht gebundenen Teile entfernt und es folgte ein weiterer Waschschrift. Diesmal wurde die Platte vier Mal mit dem hergestellten Waschpuffer gewaschen und danach trocken geklopft.

Als nächster Schritt schloss sich das Auftragen von 100 µl der hergestellten dAB-Lösung in jedes Well der Platte an. Dies konnte wieder mit der Multipette und inversem Pipettieren durchgeführt werden. Die Platte wurde dann erneut mit einer klebenden Folie abgedeckt und wiederum zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte das erneute Entfernen aller nicht gebundenen Anteile und ein erneuter Waschschrift wie oben beschrieben.

Nun gab man 100 µl der hergestellten Streptavidin-HRP-Lösung mit der Multipette in jedes Well, deckte erneut mit klebender Folie ab und inkubierte die Platte weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Es folgte ein weiterer Waschschrift wie oben erklärt.

Im nächsten Schritt wurden 100 µl der hergestellten Substratlösung in jedes Well der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte danach 20 Minuten inkubiert, wobei vermieden werden sollte, sie direktem Licht auszusetzen.

Zum Schluss wurden in jedes Well der Platte 50 µl Stopplösung gegeben, gefolgt von einem vorsichtigen Klopfen, seitlich an die Platte, um zu mischen.

Danach wurde die Platte mittels eines ELISA-Readers gelesen und die optische Dichte der einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Bei einer Referenzwellenlänge von 540 nm oder 570 nm wurde die Platte zwecks Frage der Korrektur der Werte noch einmal gemessen.

## 14. 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 nicht veröffentlichten 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 eine geldwerte Leistung 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 oder indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, im August 2016

Marion Uta Kügler

## 15. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützten.

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Elke Roeb bedanken, die mir mit Rat und Tat bei allen Problemen und Fragen zur Seite gestanden hat. Ich möchte ihr auch für die Überlassung des Themas, ihr entgegengebrachtes Vertrauen und für ihre wertvollen Anregungen danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank an alle Mukoviszidosepatienten, die sich für die Studie zur Verfügung gestellt und damit diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Mein Dank gilt weiterhin auch dem Mukoviszidoseförderverein, insbesondere Prof. Dr. Lindemann.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Martin Roderfeld, dem Laborleiter der Gastroenterologie Arbeitsgruppe Prof. Dr. Roeb und dem gesamten Laborteam insbesondere Annette Tschuschner und Michaela Weiß (ehem. Teammitglied) für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Serumprobenanalysen.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei dem Team der Ambulanz in der Kinderklinik bedanken und bei Frau Seeger, der Sekretärin von Frau Prof. Dr. Roeb, für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Mit-Doktorandin Dr. med. Katrin Menendéz Menendéz, mit der ich gemeinsam Patienten für die Studie rekrutiert und die Laboruntersuchungen durchgeführt habe. Weiterhin gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. med. Timo Rath, ohne den ich dieses Thema für die Doktorarbeit nie bekommen hätte und für seine umfangreiche Unterstützung bei der statistischen Datenaufarbeitung.

Zu Beginn wurde eine statistische Beratung durchgeführt. Da möchte ich dem Statistikteam vor allem Herrn Dr. Bödecker ebenfalls für die fachkundige Beratung danken.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meinem Verlobten bedanken, die mich genauso in der Zeit der Entstehung der Doktorarbeit immer unterstützt und mich stets motiviert haben.