

Serummarker für Matrixumbau und neutrophile Granulozyten als  
neue nicht-invasive diagnostische Marker  
zur Detektion der Lungenbeteiligung bei Mukoviszidose

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

vorgelegt von Lisa Zwaschka  
aus Lich

Gießen 2017

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Schwerpunkt Gastroenterologie

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

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Roeb

Gutachter: Prof. Dr. med. Tegtmeyer

Tag der Disputation: 14.08.2017

## Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Rath T\*, **Zwaschka L\***, Hage L, Kügler M, Menendez K, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E (2014): Identification of Neutrophil Activation Markers as Novel Surrogate Markers of CF Lung Disease. PLoS ONE 9 (12). \* geteilte Erstautorschaft

Abstractveröffentlichungen:

**Zwaschka L**, Hage L, Rath T, Schulz R, Nährlich L, Zachoval R, Roderfeld M, Roeb E (2013): Etablierung einer nicht invasiven Diagnostik für die Detektion der Leberbeteiligung bei Mukoviszidose. Der Gastroenterologe 8: 270. Posterpreis der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie 2013.

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	5
2.	Literaturübersicht.....	7
2.1	Die zystische Fibrose.....	7
2.1.1	Definition .....	7
2.1.2	Epidemiologie.....	7
2.1.3	Historische Daten .....	8
2.1.4	Erbgang .....	9
2.1.5	Pathophysiologie .....	9
2.1.6	Diagnosestellung.....	13
2.1.6.1	Schweißtest .....	13
2.1.6.2	Genetik .....	14
2.1.6.3	Elektrophysiologie.....	15
2.1.6.4	Algorithmus bei klinischem Verdacht auf zystische Fibrose .....	16
2.1.6.5	Lungenfunktion .....	17
2.2	Serummarker für Matrixumbau und Neutrophile.....	17
2.2.1	Extrazelluläre Matrix.....	17
2.2.2	Matrix Metalloproteinasen .....	17
2.2.2.1	Aufbau der Matrix Metalloproteinasen.....	18
2.2.2.2	Matrix Metalloproteinasen im Kontext von Krankheiten....	19
2.2.3	Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen.....	19
2.2.4	Chitinase 3-like-Protein .....	20
2.2.5	Hyaluronsäure .....	21
2.2.6	Prokollagen III Peptid .....	21
2.2.7	Immunreaktives Trypsin .....	22
2.2.8	Inflammation.....	22
2.3	Die zystische Fibrose – Eine Multisystemerkrankung.....	22
2.3.1	Die zystisch-Fibrose-assoziierte Lungenerkrankung.....	22
2.3.1.1	Pulmonale Exazerbation .....	23
2.3.1.2	Krankheitsstadien und Scoresysteme .....	24
2.3.2	Die zystische-Fibrose-assoziierte Leberbeteiligung .....	27
3.	Fragestellung und Hypothese .....	28
4.	Material und Methoden .....	29
4.1	Patienten .....	29

4.2	Routinelaborparameter und Bestimmung experimenteller Matrix- und Neutrophilenmarker .....	31
4.3	Statistische Analysen .....	31
4.4	Graphische Darstellung der Ergebnisse .....	31
5.	Ergebnisse .....	33
5.1	Patientencharakteristika .....	33
5.1.1	Demographische und klinische Daten der adulten CF-Patientenkohorte .....	33
5.1.2	Demographische und klinische Daten der pädiatrischen CF-Patientenkohorte .....	35
5.2	Lungenfunktion und Biomarkerexpression .....	37
5.2.1	Analyse der adulten CF-Patientenkohorte .....	37
5.2.1.1	Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei adulten CF-Patienten mit Lungenbeteiligung .....	38
5.2.1.2	Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei adulten CF-Patienten mit Lungenbeteiligung .....	39
5.2.1.3	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf FEV1, VC und FEV1/VC .....	40
5.2.1.4	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten ohne und mit CFLD .....	43
5.2.1.5	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten ohne und mit PI .....	47
5.2.2	Analyse der pädiatrischen CF-Patientenkohorte .....	47
5.2.2.1	Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung .....	48
5.2.2.2	Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung .....	49
5.2.2.3	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf FEV1, VC und FEV1/VC .....	50
5.2.2.4	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten ohne und mit CFLD .....	52

5.2.2.5	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten ohne und mit PI .....	53
5.2.2.6	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF Patienten mit pulmonaler Exazerbation .....	53
6.	Diskussion .....	56
6.1	Diagnostik der CF-Lungenbeteiligung .....	56
6.2	Volkswirtschaftliche Bedeutung einer schnellen und einfachen Diagnostik .....	61
6.3	Limitationen der Studie .....	61
6.4	Ausblick .....	62
7.	Zusammenfassung .....	64
8.	Summary .....	65
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	66
10.	Abbildungsverzeichnis .....	69
11.	Tabellenverzeichnis .....	70
12.	Literaturverzeichnis .....	71
13.	Anhang .....	90
14.	Danksagung .....	93
15.	Ehrenwörtliche Erklärung .....	94

## 1. Einleitung

Intensive Forschungen im Bereich der zystischen Fibrose (CF) haben dazu beigetragen, dass die Lebenserwartung von CF-Patienten in den letzten Jahren gestiegen ist [Hirche 2003]. Im Jahr 2000 waren bereits 43,6 Prozent der Patienten älter als 18 Jahre. [Bethesda 2001, Sens B 2001 Überblick, Sens B 2001 Qualität]. Die Lebenserwartung für 2010 geborene Kinder beträgt inzwischen 50 Jahre [MacKenzie 2014].

Frühe Diagnosestellung und rasche Therapieeinleitungen sind maßgeblich an dieser Entwicklung beteiligt [Naehrlich 2013]. Jedoch kommt es durch die verlängerte Überlebenszeit der Patienten zu neuen Herausforderungen in der Diagnosestellung und in der Therapie von CF-assoziierten Erkrankungen.

Bei der CF handelt es sich nach wie vor um eine letal verlaufende Multisystemerkrankung, deren Hauptmortalitäts- und Hauptmorbidityursache die Lungenbeteiligung darstellt [Boyle 2007, Dakin 2001]. 90% der CF-assoziierten Morbidität und Mortalität lassen sich auf die CF-Lungenbeteiligung zurückführen [Stern 2008].

Durch autosomal-rezessiv vererbte Mutationen des Chromosom 7, das für die CFTR-Kanäle codiert, kommt es zur Ausbildung von wasserarmen Sekreten mit einer extrem hohen Viskosität in den exokrinen Drüsen des Körpers [Fauci 2009].

In den Bronchien kommt es zu einer Mukostase und folglich zu einer Obstruktion und somit zur Einschränkung der mukoziliären Clearance. Auf dieser Grundlage basierend entstehen im Rahmen der Lungenbeteiligung bei CF häufig pulmonale Infektionen. Daraus können eine Destruktion von Lungengewebe, Remodelling und Fibrose resultieren [Ferkol 2006].

Bislang gibt es keine einheitlichen, validen Diagnosekriterien zur Detektion der pulmonalen Exazerbation (PEx) bei CF [Ferkol 2006, Kraynack 2011]. Aktuell wird die Diagnose einer PEx vor allem klinisch und mit Hilfe der Lungenfunktionsdiagnostik gestellt. Dieses Vorgehen ist relativ aufwendig. Zum einen ist das Ergebnis der Lungenfunktionsuntersuchung entscheidend von der Mitarbeit der Patienten abhängig. Zum anderen ist die klinische Untersuchung sehr untersucherabhängig und daher subjektiv [Dakin 2001, Kraynack 2011].

Zur Optimierung der pulmonalen Therapie bei CF ist eine frühzeitige und exakte Diagnosestellung essentiell. Einheitliche Richtlinien zur Detektion der CF-Lungenbeteiligung könnten diese Prozesse optimieren und somit das Outcome der Patienten verbessern.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Die zystische Fibrose

#### 2.1.1 Definition

Der Name Mukoviszidose setzt sich aus zwei lateinischen Begriffen zusammen. „Mucus“ bedeutet „Schleim“ und „viscidus“ bedeutet „klebrig“ oder „zähflüssig“. Die Erkrankung wird auch zystische Fibrose bzw. englisch cystic fibrosis (CF) genannt. Anhand der Begriffsbezeichnung wird bereits das Kernproblem der Erkrankung hervorgehoben: Extrem zäher Schleim befindet sich in den exokrinen Drüsen des Körpers von Betroffenen. Die CF ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erbkrankheit [Lowe 1949].

#### 2.1.2 Epidemiologie

Die CF ist die in der kaukasischen Bevölkerung am weitesten verbreitete lebenslimitierende autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Die Inzidenz beträgt 1:3200 Lebendgeburten. Weniger häufig tritt die CF in anderen ethnischen Gruppen auf. In der schwarzen Bevölkerung beträgt die Inzidenz 1:15000 Lebendgeburten, bei Hispanoamerikanern 1:9200 und bei Asiaten 1:10000 [Boyle 2007].

Dorothy Anderson beschrieb die CF 1938 als Erkrankung der frühen Kindheit [Anderson 1938]. Im Laufe der Zeit hat sich dies geändert. 2013 betrug das mediane Überleben von CF-Patienten bereits 40,7 Jahren [Bethesda 2014]. Die Prävalenz der Erkrankung bei Kaukasiern in Kalifornien betrug 2004 1:2577 Lebendgeburten [Feuchtbaum 2012]. Im Vergleich hierzu betrug die Prävalenz vor über 20 Jahren in Wisconsin nur 1:3419 Lebendgeburten [Korosok 1996]. Die Anzahl der gestellten Erstdiagnosen ist mittels Screening von Neugeborenen von 5,7% in Jahr 1998 auf 62% im Jahr 2013 gestiegen [Davis PB 2006, Spoonhower 2016]. 2013 betrug das mediane Alter bei Diagnosestellung 4 Monate [Bethesda 2014]. 10% der CF-Patienten sind bei Diagnosestellung jedoch bereits älter als 18 Jahre [Bethesda 2014]. In den letzten Jahren konnte durch Optimierung der Therapien eine Verbesserung der pulmonalen und nutritiven Situation von CF-Patienten erzielt werden [Mogayzel 2014]. Diese Entwicklungen verdeutlichen die steigende Bedeutung der CF und der CF-assoziierten Erkrankungen in den nächsten Jahren.

### 2.1.3 Historische Daten

1938, im Jahre der Erstbeschreibung [Andersen 1938], galt die CF als pädiatrische Erkrankung. Die betroffenen Patienten verstarben im Durchschnitt bereits 6 Monate nach der Diagnosestellung. Damals wie heute war die Lungeninfektion eine der Hauptmortalitätsursachen im Rahmen der CF. 1948, zehn Jahre später, begann man erhöhte Chloridkonzentrationen im Schweiß der Betroffenen zur Diagnosesicherung zu nutzen [di Sant`Agnese 1953]. Durch die Einführung dieses, noch heute in der klinischen Routine genutzten Schweißtests, konnten auch klinisch milder ausgeprägte CF-Formen entdeckt werden und die Diagnosestellung gelang in früheren Stadien. Im Jahre 1989 wurde das CF-Gen entdeckt [Kerem 1989, Tsui LC 1985], welches für einen cAMP-regulierten Chloridionen-Kanal, den CF transmembrane conductance regulator (CFTR) codiert [Davis 2006, Neocleous 2014].

Das mittlere Lebensalter von CF-Patienten betrug im Jahre 1980 nur 8,3 Jahre [Hirche 2003]. Damals waren mehr als 98% der Patienten jünger als 18 Jahre, sodass die CF auch damals noch fast ausschließlich als pädiatrische Erkrankung angesehen wurde. Die Lebenserwartung ist in den letzten Jahren gestiegen. 2000 betrug der Anteil der über 18-jährigen CF-Patienten 43,6% [Hirche 2003].

Eine frühe und sichere Diagnosestellung und Therapieeinleitung verbessert die Prognose der Patienten. In Deutschland finden lediglich 59% der Diagnosestellungen im ersten Lebensjahr der Erkrankten statt [Sens B 2012]. Die Lebenserwartung von CF-Patienten (Median des Überlebens) hat sich von wenigen Monaten in den 1950er Jahren auf heutzutage 40 Jahre verbessert [Sens B 2012].

In den letzten Jahren wurden Substanzen entdeckt, die zielgerichtet den der Erkrankung zugrunde liegenden Kanaldefekt modulieren können. Der bereits zugelassene Wirkstoff Ivacaftor stabilisiert die Öffnung des CFTR-Kanals bei CF-Patienten mit einer G551D-Mutation, wodurch sich die Kanalöffnungszeit erhöht. Ein ebenfalls zugelassener Wirkstoff ist Lumacaftor, welcher ein CFTR-Korrektor ist, der die korrekte Proteinfaltung bei CF-Patienten mit einer F508 $\Delta$ -Mutation unterstützt und somit den Ionentransport durch den Kanal erleichtert [Quon 2016]. Die Kombination von Lumacaftor und Ivacaftor erhöht die Aktivität und die Stabilität bestimmter F508 $\Delta$ -CFTR-Kanäle. Die Mehrzahl der F508 $\Delta$ -CFTR-Kanäle bleibt jedoch durch diese Kombination im unstabilisierten Zustand [Meng 2017]. Der Einsatz der Kombination aus Lumacaftor und Ivacaftor konnte bei Patienten mit einer homozygoten F508del-CFTR-Mutation eine um 42% langsamere Verschlechterung der FEV1 zeigen [Konstan 2017].

## 2.1.4 Erbgang

Die CF wird autosomal-rezessiv vererbt [Lowe 1949]. Daher erkranken nur Personen, die homozygot für das entsprechende Gen sind. Die Vererbung erfolgt geschlechtsunabhängig. Die statistische Wahrscheinlichkeit an CF zu erkranken beträgt 25%, in dem Falle, dass beide Eltern heterozygot für das entsprechende Gen sind. Durchschnittlich ist 1 von 2000-3000 Neugeborenen an CF erkrankt [WHO 2004].

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Erbgang einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung.

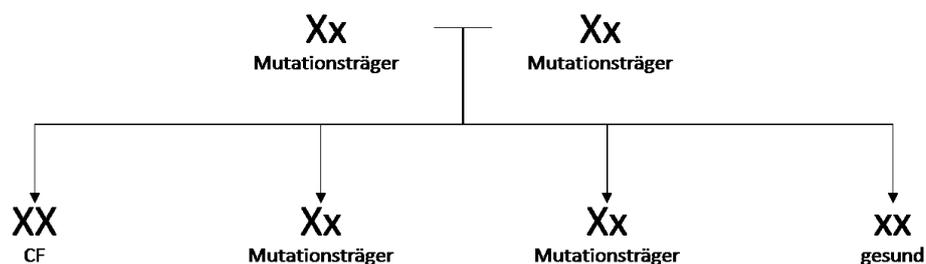


Abbildung 1: Autosomal-rezessiver Erbgang

Abbildung 1 stellt den Erbgang der CF schematisch dar. „X“ steht hierbei für das betroffene Allel und „x“ steht für das nicht betroffene Allel. Die beiden in der ersten Generation mit „Xx“ dargestellten Personen sind Mutationsträger (Synonym: Konduktoren) für die CF. Phänotypisch sind diese gesund. In der zweiten Generation ist die statistische Verteilungshäufigkeit dargestellt. Bei dem mit „Xx“ bezeichneten Nachfahren handelt es sich ebenfalls um einen Konduktoren. Sind bei einer Person beide Allele betroffen, so handelt es sich um einen an CF erkrankten Nachfahren. In der Abbildung ist dieser mit „XX“ gekennzeichnet. Bei Nachfahren, die mit „xx“ gekennzeichnet sind, handelt es sich um genotypisch und phänotypisch gesunde Nachfahren.

## 2.1.5 Pathophysiologie

Die Ursache der CF ist die Dysfunktion des Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Proteins [Kerem B 1989]. Dieses Protein ist ein am Zellepithel luminaler Zellen lokalisierter Chloridkanal und reguliert die Zusammensetzung der Sekrete exokriner Drüsen [Kerem B 1989]. Das CFTR-Gen ist auf Chromosom 7 (Locus 7q31.3) lokalisiert [Neocleous 2014]. Mit etwa 250kB codiert es für 1480 Aminosäuren [Neocleous 2014]. Mutationen in diesem Gen sind ursächlich für die CF [Kerem B 1989]. Bisher wurden über 1500 verschiedene Mutationen gefunden [Boyle 2007 Strategies].

Die häufigste Mutation ist die  $\Delta F508$ -Mutation, welche durch ein Fehlen der Aminosäure Phenylalanin (=F) an der Position 508 im CFTR-Protein steht. Diese Mutation tritt bei etwa 70% der CF-Patienten auf [McKone 2006].

Das CFTR-Gen ist ein integrales Protein, das zu den cyclischen-Adenosinphosphat-(cAMP)-regulierten Ionenkanälen und zu den Adenosintriphosphat-(ATP)-bindenden ABC-Transportern gehört [Ko 1993]. Es besteht aus zwei Untereinheiten [Walker 1982]. Jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs Transmembrandomänen [Walker 1982]. Das CFTR-Gen besitzt zwei Nukleotid-Bindedomänen (NBD1 und NBD2) [Walker 1982], sowie eine regulatorische Domäne (R-Domäne) [Cheng 1991, Picciotto 1992]. Weitere Bindedomänen für Protein-Protein-Interaktionen sorgen für den Transport von Bikarbonat [Ko 1993]. NBD1 und NBD2 binden ATP, was für die Öffnung und Schließung des Kanals notwendig ist [Ko 1993].

Durch den CFTR-Kanal werden Chloridionen reabsorbiert. Dieser Vorgang wird durch die Aufnahme von Natriumionen durch Natriumkanäle hervorgerufen. Bei eingeschränkter CFTR-Kanalaktivität wird dickflüssigeres Sekret sezerniert [Welsh 1995].

Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines CFTR-Kanals.

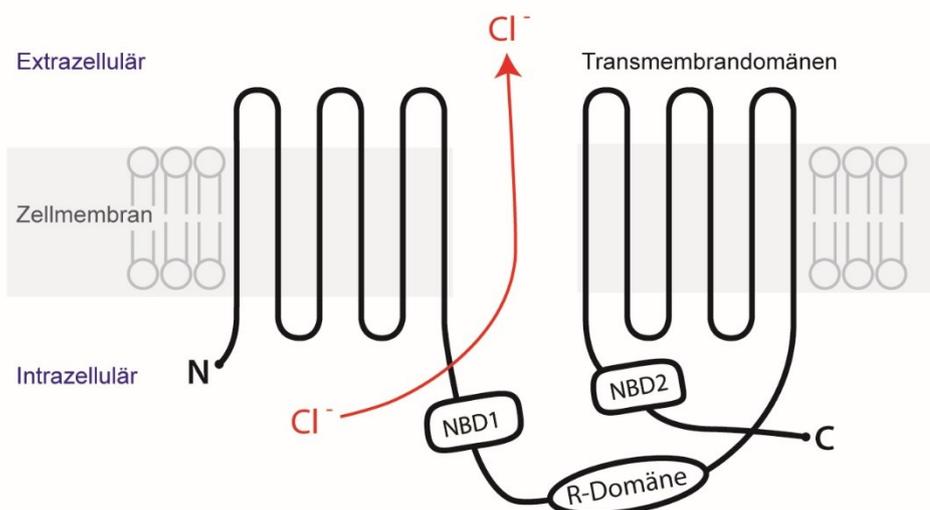


Abbildung 2: Der schematische Aufbau eines CFTR-Kanals

Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines CFTR-Kanals. Die beiden Transmembrandomänen bilden zusammen den CFTR-Protein-Kanal. Die regulatorische Domäne (R-Domäne) befindet sich intrazellulär.

Die Nukleotid-Bindedomänen (NBD1, NBD2) befinden sich ebenfalls intrazellulär und binden ATP, welches für die Kanalöffnung und -schließung benötigt wird [Ko 1993].

Ist der CFTR-Kanal defekt, wird weniger bis kein Chlorid durch den Kanal transportiert. Dem zur Folge reduziert sich auch der Transport von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oder bleibt sogar ganz aus. Aus diesem Defekt resultiert die Sezernierung von Mukus mit einer extrem hohen Viskosität.

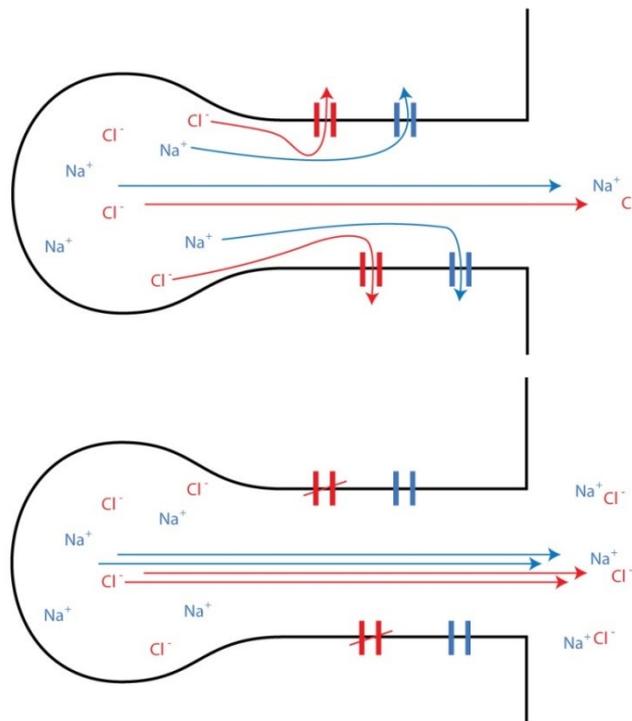


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Schweißdrüse.

Im oberen Panel der Abbildung 3 ist der schematische Aufbau einer Schweißdrüse mit normaler CFTR-Funktion zu sehen. Durch die in der apikalen Zellmembran lokalisierten CFTR-Kanäle (dargestellt in rot) wird Chlorid reabsorbiert. Den negativ geladenen Chloridionen (rot) folgen die positiv geladenen Natriumionen (blau).

Im unteren Panel der Abbildung 3 ist der schematische Aufbau einer Schweißdrüse eines CF-Patienten dargestellt. Hier sind die CFTR-Kanäle (rot) in ihrer Funktion eingeschränkt oder funktionslos. Aus diesem Grund werden weniger bis keine Chloridionen reabsorbiert, was zur Folge hat, dass auch weniger beziehungsweise keine Natriumionen (blau) reabsorbiert werden. Das sezernierte Sekret ist dem zur Folge reich an Natriumchlorid. Der daraus resultierende erhöhte Salzgehalt des Schweißes von CF-Patienten wird zur Diagnosestellung genutzt.

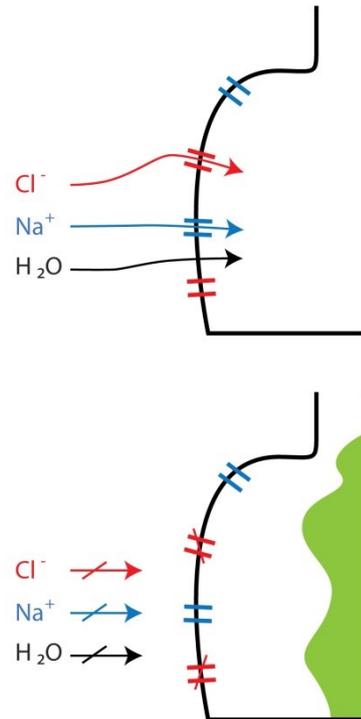


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Bronchialdrüse.

Im oberen Panel der Abbildung 4 ist der schematische Aufbau einer Bronchialdrüse mit normaler CFTR-Funktion dargestellt. Durch die funktionstüchtigen CFTR-Kanäle (rot) strömen Chloridionen aus der Zelle. Das hat zur Folge, dass auch Natriumionen (blau) in das Lumen der Bronchialdrüsen sezerniert werden. Resultierend daraus erfolgt der Ausstrom von Wasser mit dem Ergebnis, dass das sezernierte Sekret dünnflüssig wird.

Im unteren Panel der Abbildung 4 ist die Situation bei CF-Patienten schematisch dargestellt. Dadurch dass hier die CFTR-Kanäle (rot) in ihrer Funktion eingeschränkt oder funktionslos sind, werden weniger beziehungsweise keine Chloridionen sezerniert. Dem zur Folge reduziert sich der Natriumionenausstrom (dargestellt in blau) entsprechend. Folglich verringert sich die Sekretion von Wasser in das Lumen der Drüsen. Es entsteht ein hypertones Milieu. Hieraus resultiert das Kernproblem der CF. Visköses Sekret (grün) findet sich in den exokrinen Drüsen von CF-Patienten [Matsui 1998].

Letztlich kommt es durch die veränderte Sekretzusammensetzung zur Inhibition wichtiger Komponenten der endobronchialen Abwehr, welche eine bakterielle Besiedelung begünstigt [Bals 2001, Bals 1999, Smith 1996].

Durch die chronische bakterielle Besiedelung des Respirationstrakts kommt es zu einem exzessiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten [Dinwiddie 2000, Tiddens 2000].

Die Aktivität der proteolytischen Enzyme dieser Neutrophilen ist höher als die Aktivität der endogenen Antiproteasen [Dinwiddie 2000, Tiddens 2000]. Als Folge entstehen Destruktionen und Umbauprozesse des Respirationstrakts und des Lungenparenchyms [Dinwiddie 2000, Tiddens 2000].

#### 2.1.6 Diagnosestellung

Um die Diagnose CF stellen zu können, muss eine CFTR-Funktionsstörung und mindestens ein diagnostischer Hinweis auf CF vorhanden sein. Diagnostische Hinweise sind ein positives Neugeborenencreening, ein klinischer Hinweis auf CF oder die CF-Erkrankung eines Geschwisterkindes. Um eine CFTR-Funktionsstörung nachweisen zu können, benötigt man einen Schweißtest, welcher Schweißchloridwerte von  $\geq 60$  mmol/l in mindestens zwei unabhängigen Messungen detektiert oder den Nachweis von zwei CF-verursachenden CFTR-Mutationen oder den Nachweis einer auf CF-hinweisenden Abnormalität der CFTR-Funktion mittels nasaler Potentialdifferenzmessung (NPD) [Knowles 1995] oder Intestinaler Kurzschlussstrommessung (ICM) [De Jonge 2004, Mall 2004] [Naehrlich 2013]. Das Ziel ist eine frühe Diagnosestellung, da diese mit niedrigeren Hospitalisationsraten, besserer Lungenfunktion und geringerer chronischer Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* assoziiert ist [Coffey 2017].

##### 2.1.6.1 Schweißtest

Der Schweißtest ist ein gut durchführbarer und kostengünstiger Test mit einer Sensitivität von 96,5% und einer Spezifität von 99%, welcher den Goldstandard zur Diagnostik bei Verdacht auf CF darstellt und daher an erster Stelle im diagnostischen Algorithmus steht [De Boeck 2006, Farrell 2008].

Die Durchführung des Schweißtest erfolgt basierend auf der Leitlinie des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Entweder erfolgt die Durchführung nach Gibson-Cook [Gibson 1959] oder mittels Macroduct-System®. Nach einer Hautstimulation mit Pilocarpin über einen Zeitraum von 5 Minuten mit Hilfe einer Spannungsquelle, wird für eine Dauer von 30 Minuten der Schweiß der Patienten gesammelt [Gibson 1959, Gibson 1976].

Im Anschluss erfolgt die Analyse des Chloridgehalts. Hierbei gelten folgende Grenzwerte:

≤ 29 mmol: unauffällig = CF unwahrscheinlich

30-59 mmol/l: Kontrollbereich = weitere Diagnostik auf CF erforderlich

≥ 60 mmol/l: vereinbar mit der Diagnose CF

Die Messung der Leitfähigkeit kann für Screeninguntersuchungen genutzt werden. Hierbei gelten folgende Grenzwerte:

< 50 mmol/l: unauffällig

≥ 50 mmol/l: Hinweis auf CF

Bei Werten von ≥ 50 mmol/l Natrium-Chlorid-Äquivalent erfolgt die Durchführung eines Schweißtestes zur Diagnosesicherung [Naehrlich 2013].

Ein flächendeckendes Neugeborenencreening wurde in Deutschland am 20.08.2015 eingeführt. Ziel dieses Screenings soll ein möglichst früher Therapiebeginn sein [Gemeinsamer Bundesausschuss 2015].

Beim Neugeborenencreening wird im ersten Schritt eine Kapillarblutprobe des Neugeborenen entnommen und auf eine Trockenkarte getropft. Für das CF-Screening wird das Kapillarblut auf immunreaktives Trypsin (IRT), ein Pankreasenzym, untersucht. Ist die Konzentration dieses Proteins erhöht, so erfolgt die Analyse der Blutprobe auf ein weiteres Protein, das Pankreatitis-assoziierte Protein (PAP). Zeigen sich auch hier erhöhte Werte, so erfolgt die weitere Diagnostik mittels Schweißtest [Crossley 1979, Nauck 2012].

#### 2.1.6.2 Genetik

Besteht der Verdacht auf CF, so folgt dem Schweißtest die genetische Untersuchung. Diese dient der Diagnosesicherung sowie der molekulargenetischen Diagnostik. Die Patienten beziehungsweise deren Eltern sind vor der genetischen Diagnostik aufzuklären. Bei einem auffälligen Befund muss eine genetische Beratung in jedem Fall dringend empfohlen werden. Grundlage hierfür ist das deutsche Gendiagnostikgesetz [Gesetz über genetische Untersuchungen beim Menschen 2009] und die S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung [Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. 2011]. Die Heterozygotentestung ist indiziert bei Eltern von CF-Patienten und wird als prädiktive genetische Untersuchung angesehen. Nicht zulässig

sind laut Gendiagnostikgesetz ein allgemeines Heterozygotenscreening oder ein Heterozygotentest bei Kindern [Naehrlich 2013].

Nicht für alle der 1932 CFTR-Mutationen ist ein krankheitsverursachender Zusammenhang eindeutig nachgewiesen. In der „Cystic Fibrosis Mutation Database“ (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>) sind die krankheitsverursachenden Mutationen aufgelistet. Auch in der Konsensusarbeit von Castellani [Castellani 2008] sowie in den Leitlinien des europäischen CF-Netzwerks [Dequeker 2009] können die häufigsten CF-verursachenden Mutationen gefunden werden. Je nach ethnischer Herkunft der Patienten variiert das Spektrum der Mutationen und deren Häufigkeitsverteilung. Die unterschiedlichen Mutationen und deren Häufigkeitsverteilungen sind im WHO-Report von 2004 aufgeführt. In Deutschland sind folgende Mutationen mit einer Häufigkeit von  $\geq 1\%$  bekannt: F508del, G542X, R553X, N1303K, G551D, CFTRdele2,3 (21kb), R347P, 1717-1G>A und 3849+10kbC>T. In der Schweiz und in Österreich gehören F508del, G542X und R553X mit einer Häufigkeit von  $\geq 1\%$  ebenfalls zu den häufigsten Mutationen. Die Reihenfolge der Auflistung berücksichtigt die Häufigkeit der jeweiligen Mutationen [WHO 2004].

#### 2.1.6.3 Elektrophysiologie

Um Patienten, bei denen der Schweißtest und die genetische Untersuchung keine klare Aussage bezüglich der Diagnosesicherung liefern, weiter einordnen zu können, kann die elektrophysiologische Messung der CFTR-Chloridkanalfunktion herangezogen werden [Naehrlich 2013]. Vor allem bei Patienten deren Schweißchloridkonzentration im Bereich von 30-59 mmol/l liegt und bei denen der Nachweis von 2 CF-verursachenden CFTR-Mutationen nicht gelingt, können die nasale NPD sowie die ICM helfen, die Diagnose zu sichern beziehungsweise auszuschließen [De Boeck 2006, Farrell 2008, Goubau 2009, Mayell 2009]. Bei der NPD wird die In-vivo-Potentialdifferenz zwischen einer kutanen Referenzelektrode und einem im unteren Nasengang eingebrachten Katheter zum einen in Ruhe und zum anderen nach Applikation von Substanzen, die die Natrium- und Chloridkanäle beeinflussen, gemessen [Knowles 1995]. Im Gegensatz zu der NPD ist die ICM eine Ex-vivo-Methode, bei der der Kurzschlussstromfluss an Rektumbiopsaten der Patienten nach medikamentöser Stimulation der CFTR-Kanalfunktion gemessen wird [De Jonge 2004, Mall 2004].

## 2.1.6.4 Algorithmus bei klinischem Verdacht auf zystische Fibrose

### Algorithmus bei klinischem Verdacht auf CF

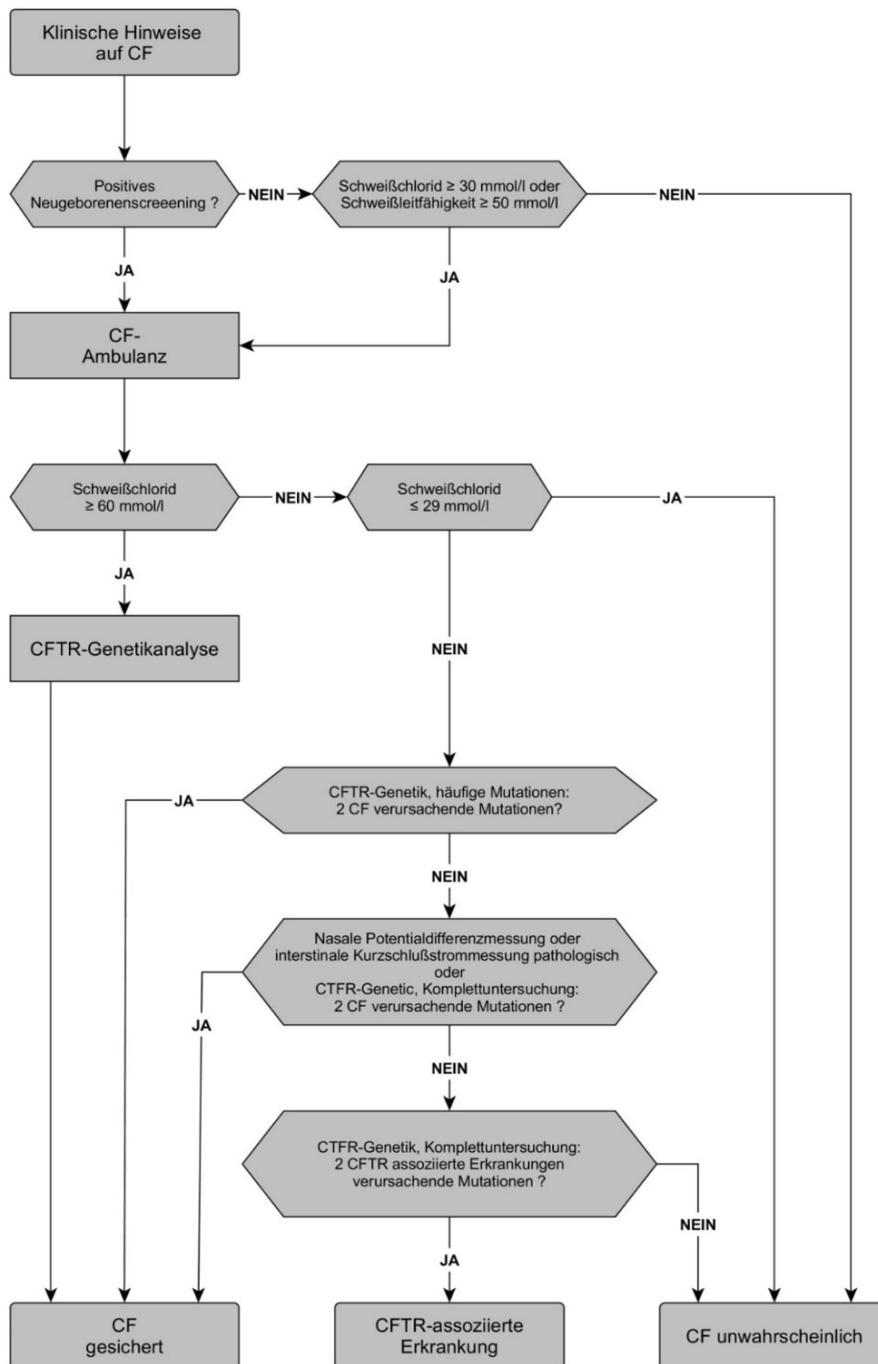


Abbildung 5: Algorithmus bei klinischem Verdacht auf CF (modifiziert nach Naehrlich 2013).

### 2.1.6.5 Lungenfunktion

Im Hinblick auf die Diagnostik der Lungenbeteiligung im Rahmen der CF, kommt der Lungenfunktionsdiagnostik eine wichtige Bedeutung zu. Die Prüfung der Lungenfunktion gibt Hinweise auf Ventilations-, Diffusions- und Perfusionsstörungen der Lunge [Fauci 2009]. Im Rahmen der Lungenfunktionsdiagnostik können statische und dynamische Größen bestimmt werden [Fauci 2009]. Das Residualvolumen (RV) ist das Gasvolumen, welches sich am Ende der Expiration in der Lunge befindet [Sterk 1980]. Die totale Lungenkapazität (TLC) ist das Luftvolumen, das nach maximaler Inspiration in der Lunge vorhanden ist [Fauci 2009]. Als Vitalkapazität (VC) wird das Lungenvolumen, welches beim Übergang von der TLC zu dem RV ausgeatmet wird, bezeichnet [Fauci 2009]. Die Einsekundenkapazität, auch forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde (FEV1) genannt, ist das Luftvolumen, das während der ersten Sekunde der Expiration ausgeatmet werden kann [Fauci 2009]. Neben dem Absolutwert, wird der auf die Ist-VC bezogene relative Wert (FEV1%VC) bestimmt. Dieser Wert wird als Tiffeneau-Index bezeichnet [Tiffeneau 1948].

## 2.2 Serummarker für Matrixumbau und Neutrophile

### 2.2.1 Extrazelluläre Matrix

Unter extrazellulärer Matrix (EZM) versteht man den Gewebeanteil, der sich im Interzellularraum befindet [Ayad 1998]. Die EZM spielt im Bereich der Kommunikation von Zellen untereinander, der Zelladhäsion, des Zellwachstums und der Apoptose eine wichtige Rolle [Jackson BC 2010]. Außerdem ist die EZM entscheidend für die Funktion und die Struktur des Gewebes [Jackson BC 2010].

### 2.2.2 Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind extrazelluläre Proteasen, die als Mediatoren am Gewebeumbauprozess beteiligt sind. 1962 entdeckten Gross und Lapiere die Kollagenase und deren Funktion im Abbauprozess von fibrillärem Kollagen [Gross 1962, Brinckerhoff 2002]. Später wurde eine Kollagenase, Collagenase-1 oder auch MMP-1, in erkrankter Haut und Synovia entdeckt [Birkedal-Hansen 1993]. MMP-1 initiiert den Abbau von fibrillärem Kollagen durch die Spaltung der Peptidbindung zwischen Gly775-Ile776 oder Gly775-Lys776 in Typ I, II oder III Kollagen [Birkedal-Hansen 1993, Welgus 1983]. Inzwischen wurden insgesamt 23 strukturell ähnliche humane Proteinasen, die alle zu der MMP-Familie gehören, entdeckt [Page-McCaw 2007]. Es konnte eine erhöhte MMP-Aktivität beispielsweise bei der Rheumatoiden Arthritis und einigen

Karzinomerkrankungen gezeigt werden [Egeblad 2002, Coussens 2002].

#### 2.2.2.1 Aufbau der Matrix Metalloproteinasen

MMPs sind Zinkendopeptidasen [Cauwe 2007]. Sie sind Multidomänproteine und bestehen aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen Domäne mit einer Bindungsregion und einer Hämopexindomäne [Nagase 2006]. Die katalytische Domäne besitzt eine hochkonservierte zinkbindende Region, in der drei Histidine für die Bindung eines Zinkions zuständig sind [Van Wart 1990]. Das Propeptid besteht aus etwa 80 Aminosäuren und alle bisher bekannten MMPs, bis auf MMP-21 und CA-MMP, besitzen eine einheitliche Sequenz PRCXXPD [Parks 2001].

Die Aktivierung der MMPs kann durch extrazelluläre proteolytische Spaltung durch andere MMPs oder durch Serinproteasen, wie zum Beispiel durch Plasmin, erfolgen [Jackson BC 2010]. Die MMPs, die eine Furin-Erkennungssequenz aufweisen (MT-MMPs, MMP-11, MMP-21, MMP-23B und MMP-28) werden im Golgiapparat aktiviert und von dort in einer proteolytisch aktivierten Form sezerniert [Jackson 2010].

Besondere Bedeutung wird den MMPs in entzündlichem Gewebe zu gesprochen [Le 2007]. Die Expression von MMPs wird ausgelöst durch inflammatorische Zytokine und durch Transkriptionsfaktoren, wie Activator-Protein-1 (AP-1), Nuklear-Factor-KappaB (NFκB) und Serum-Amyloid-A-Activating-Factor (SAF-1) [Jackson 2010].

Chronisch inflammatorisch verändertes Gewebe weist erhöhte MMP-Konzentrationen auf [Fernandez-Patron 2001]. Es wird davon ausgegangen, dass MMPs zu der Leukozyteninfiltration aus der Peripherie in das Gewebe beitragen [Fernandez-Patron 2001]. Die Erhöhung der Durchlässigkeit der Basalmembran wird durch MMP-2 und MMP-9 hervorgerufen [Fernandez-Patron 2001]. Die Spaltung von Endothelin-1 zu einem Endothelin-A-Rezeptor bindenden Peptid wird durch MMP-2 katalysiert [Fernandez-Patron 2001]. Dadurch wird der Endothelin-A-Rezeptor aktiviert, Integrine werden hochreguliert und die transendotheliale Migration von Leukozyten wird ausgelöst [Fernandez-Patron 2001]. MMP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-14 und MMP-17 können den Tumornekrosefaktor (TNF) aktivieren [Gearing 1994, Gearing 1995]. MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 aktivieren Interleukin-1 beta (IL-1β) [Ito 1996]. MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MMP-14 aktivieren den Transforming growth factor (TGF-β) [Yu 2000, Schultz 2009]. MMPs spalten Chemokine. Dies kann sowohl zur Hemmung der Inflammation als auch zu deren Aktivierung führen [Le 2007]. MMPs können neben Chemokinen auch Zytokine modifizieren [Van den Steen 2000, Van den Steen 2003, McQuibban 2000, McQuibban 2002]. Daher spielen MMPs sowohl bei akuten und

chronischen Entzündungen als auch bei Autoimmunerkrankungen und in der Regeneration nach Entzündungen eine wesentliche Rolle [Jialiang Hu 2007]. MMPs sind wichtig für die Initiierung, die Aufrechterhaltung und die Beseitigung akuter und chronischer Inflammationen [Jialiang Hu 2007].

#### 2.2.2.2 Matrix Metalloproteinasen im Kontext von Krankheiten

Besonders bei Krankheitsbildern, bei denen Matrixabbau oder Inflammation eine Rolle spielen, sind MMPs beteiligt [Fingleton 2007]. Beispiele hierfür sind die Rheumatoide Arthritis, Gefäßerkrankungen wie zum Beispiel Aneurysmata, Karzinomerkkrankungen und einige neurodegenerative Erkrankungen [Fingleton 2007]. Ebenso sind MMPs an Wundheilungsprozessen beteiligt [Toriseva 2009]. Hierbei bauen MMPs EZM ab, induzieren eine Inflammation und rekrutieren Zellen, die für die Reepithelialisierung und Angiogenese entscheidend sind [Toriseva 2009]. Auch an der Entstehung von Lungenerkrankungen, wie dem Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) und der Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) sind MMPs entscheidend beteiligt [Daheshia 2005]. MMPs bewirken den Gewebeabbau, die Entstehung von Fibrose und tragen zu der Inflammation, die im Rahmen dieser Erkrankungen auftritt, bei [Jackson BC 2010]. Die Serumkonzentrationen von MMP-1, MMP-8 und MMP-9 weisen bei CF-Patienten erhöhte Werte auf und korrelieren mit dem Vorhandensein einer PEx [Roderfeld 2009]. Der Serumkonzentrationsanstieg von MMP-8 bei CF-Patienten ist mit Verschlechterung der Lungenfunktion assoziiert [Roderfeld 2009]. Es wurde ein Zusammenhang zwischen erniedrigten MMP-2-Serumkonzentrationen bei CF-Patienten und dem Auftreten einer PEx gezeigt [Roderfeld 2009]. Durch antibiotische Therapien im Rahmen der PEx bei CF-Patienten, kommt es zu einem Abfall der Serumkonzentrationen von MMP-1, MMP-8 und MMP-9 [Roderfeld 2009]. Daher könnten diese Marker zur Detektion der PEx bei CF-Patienten herangezogen werden [Roderfeld 2009].

#### 2.2.3 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

Die inhibitorische Aktivität der Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) wurde bereits in den frühen 1970er Jahren entdeckt [Bauer 1975]. 1979 wurde entdeckt, dass die inhibitorische Aktivität von MMPs 25-31kDa schweren Proteinen zugeordnet werden kann [Vater 1979, Welgus 1979]. Später wurde diesen Proteinen, welche nicht nur Kollagenasen, sondern auch Gelatinasen und die Progelatinase (mittlerweile auch als MMP-3 bezeichnet) inhibieren können, der Name TIMPs gegeben [Cawston 1981].

TIMPs sind als Gegenspieler der MMPs zu verstehen. Aktivierte MMPs werden durch TIMPs in ihrer Funktion inhibiert [Jackson BC 2010]. Bislang sind vier unterschiedliche TIMPs bekannt. Bezeichnet werden diese als TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4. TIMPs spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Balance zwischen EZM-Aufbau und EZM-Abbau [Gomez 1997]. Es wird vermutet, dass TIMP-1 und TIMP-2 multifunktionale Proteine mit vielfältigen Funktionen sind [Gomez 1997]. TIMP-1 und TIMP-2 besitzen eine wachstumsfaktorähnliche Funktion [Gomez 1997]. Sie können die Angiogenese inhibieren. TIMP-1 und TIMP-2 weisen bei Patienten mit CFLD erhöhte Serumkonzentrationen auf und können in Kombination mit der transienten Elastographie als diagnostische Mittel zur Detektion der CFLD und der portalen Hypertension eingesetzt werden [Rath 2012]. TIMP-3 ist das einzige Mitglied der TIMP-Familie, welches bisher ausschließlich in der EZM gefunden wurde [Gomez 1997]. Es wird angenommen, dass TIMP-4 gewebespezifisch in der EZM vorhanden ist [Gomez 1997]. Die Serumkonzentration von TIMP-4 ist bei Patienten mit CFLD signifikant erhöht [Rath 2013].

#### 2.2.4 Chitinase 3-like-Protein

Das Chitinase 3-like-Protein (YKL-40) ist ein inflammatorisches Glykoprotein. Dieses Protein ist beteiligt an der Chemotaxis, der Zellmigration, der Reorganisation und dem Gewebeumbau. Erhöhte YKL-40-Serumkonzentrationen sind an der Entstehung von Endothelschäden und der Entstehung von Fibrose beteiligt [Tao 2014, Knorr 2003, Gressner 2007].

Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, wurden hohe YKL-40-Konzentrationen in Synovialflüssigkeit gefunden [Johansen 1993]. Es wird angenommen, dass das im Rahmen einer Inflammation aus den neutrophilen Granulozyten freigesetzte YKL-40, als Autoantigen eine T-Zell-vermittelte-Autoimmunantwort induziert [Volck 1998, Johansen 2006]. Vermutlich ist YKL-40 involviert in den Prozess des Gewebeumbaus und des Gewebeabbaus [Volck 1998, Johansen 2006]. YKL-40 fungiert als Wachstumsfaktor für Fibroblasten [Recklies 2002, De Ceuninck 2001]. Die Serumkonzentration von YKL-40 weist bei Patienten mit Leberfibrose erhöhte Werte auf [Rath 2011]. Besonders deutlich wird dieser Sachverhalt bei der Hepatitis C assoziierten Leberfibrose [Rath 2011]. Des Weiteren konnte bei CF-Patienten, besonders während einer schweren PEx, ein Anstieg der YKL-40-Serumkonzentration nachgewiesen werden [Leonardi 2016]. YKL-40 kann daher als nicht-invasiver Marker für Inflammation und Fibrose genutzt werden [Saitou 2005, Mehta 2008, Fontana 2008, Berres 2009, Rath 2011].

### 2.2.5 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (hyaluron acid, HA) ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid [Ialenti 1994]. Aufgebaut ist es aus einer Disaccharideinheit, welche D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin enthält [Ialenti 1994]. HA trägt wesentlich zum Aufbau der EZM bei und ist ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes, der Synovialflüssigkeit, des embryonalen Mesenchyms und der Haut und findet sich auch in einigen anderen menschlichen Geweben [Ialenti 1994], wie zum Beispiel in respiratorischen Epithelzellen [Baraniuk 1996]. Inhalierter HA kann vor Bronchokonstriktion, die durch inflammatorische Mediatoren verursacht wird, schützen [Turino 2003]. Je nach Molekulargewicht kann HA unterschiedliche Effekte hervorrufen [Manzanares 2007]. HA mit hohem Molekulargewicht wird unter dem Einfluss freier Radikale und Enzyme gespalten und kann dadurch hemmend im Rahmen einer Inflammation wirken [Manzanares 2007]. HA mit niedrigem Molekulargewicht kann zur Mobilisation von Immunzellen beitragen [Manzanares 2007]. HA reguliert die Angiogenese und moduliert die Proliferation und Migration von Zellen im Rahmen der Wundheilung [Jiang 2007].

Bei CF-Mäusen konnte ein positiver Effekt auf Inflammationen des respiratorischen Epithels durch Inhalation von HA gezeigt werden [Gavina 2013]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die HA-Inhalation eine effektive Methode bei CF-Patienten mit inflammatorischer Lungenbeteiligung darstellt [Ros 2013].

Auch in der Diagnostik der Leberfibrose kann die HA-Serumkonzentrationsbestimmung zum Ausschluss einer fortgeschrittenen Leberfibrose oder einer Leberzirrhose herangezogen werden. Daher gilt die HA im Bereich der Leberdiagnostik bereits als vielversprechender Fibrosemarker [Gressner 2009].

### 2.2.6 Prokollagen III Peptid

Prokollagen III Peptid (PIIIP) wird in den Fibroblasten produziert [Klappacher 1995]. Bei der Umwandlung von Prokollagen III in Kollagen III wird PIIIP abgespalten und gelangt in den Blutkreislauf [Klappacher 1995].

Die Konzentration des PIIIPs korreliert mit dem Fibrosierungsgrad im Rahmen von Lebererkrankungen [Gerling 1996]. Daher eignet sich die Bestimmung der PIIIP-Serumkonzentration zum Beispiel zur Verlaufskontrolle von fibrosierenden Lebererkrankungen [Gerling 1996].

### 2.2.7 Immunreaktives Trypsin

Immunreaktives Trypsin (IRT, Trypsinogen) ist die Vorstufe des Trypsins [Steer 1999]. Trypsin fungiert als Enzym der Proteinverdauung und wird vom Pankreas sezerniert [Steer 1999]. Seit 1979 gibt es mit der Messung von IRT eine einfache, zuverlässige Screening-Methode für die CF bei Neugeborenen [Crossley 1979, Rueegg 2013].

### 2.2.8 Inflammation

Eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems sind die neutrophilen Granulozyten (Synonym: Neutrophile, Granulozyten) [Zarbock 2008]. Neutrophile sind als Untergruppe der Leukozyten zu verstehen [Zarbock 2008]. Kommt es zu einer Gewebeschädigung, zum Beispiel im Rahmen einer Inflammation, so werden Neutrophile rekrutiert [Zarbock 2008]. Neutrophile Granulozyten spielen eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen [Zarbock 2008]. Als Reaktion auf lokale Invasion durch Mikroorganismen, können Neutrophile in das umliegende Gewebe wandern [Zarbock 2008]. Neutrophile sezernieren antimikrobielle Peptide und können Mikroorganismen mittels Phagozytose eliminieren [Zarbock 2008]. Bei Mutationen des CFTR-Gens kommt es zu einer abnorm erhöhten Neutrophilenaktivität [Painter 2006, Painter 2008, Painter 2010]. Dadurch können überschießende Immunantworten hervorgerufen werden [Nichols 2015]. Bei CF sind Neutrophile in überhöhtem Maße vorhanden, sodass die normale Abwehrfunktion zu einem pathologischen Prozess werden kann [Nichols 2015]. Außerdem setzen Neutrophile unter anderem MMP-8 und MMP-9 frei, welche die EZM abbauen können [Nichols 2015].

## 2.3 Die zystische Fibrose – Eine Multisystemerkrankung

Die CF als Multisystemerkrankung manifestiert sich an vielen verschiedenen Organen, wobei besonders die CF-Lungenbeteiligung einen limitierenden Einfluss auf den Verlauf der Grunderkrankung hat [Boyle 2007, Stern 2008]. Alle Organe, die eine sekretorische Funktion haben, können von der zystischen Fibrose betroffen sein [Fauci 2009].

### 2.3.1 Die zystisch-Fibrose-assoziierte Lungenerkrankung

Besonders die CF-assoziierte-Lungenerkrankung und deren altersabhängige Verschlechterung ist für die erhöhte Morbidität und Mortalität im Rahmen der Grunderkrankung ausschlaggebend [Boyle 2007, Hirche 2003, Dakin 2001]. Etwa 90% der Todesfälle bei CF lassen sich auf die respiratorische Insuffizienz zurückführen [Stern

2008]. Klinisch äußert sich die CF-Lungenerkrankung durch Mukostase, Mukushypersekretion und persistierende neutrophile Inflammation [Ferkol 2006]. Pathophysiologisch zeigt sich die CF-assoziierte Lungenerkrankung durch abnormales Geweberemodelling und die Akkumulation von EZM. Durch die Retention von hochviskösem Mukus in den Atemwegen von CF-Patienten, kommt es zu von Inflammation begleitenden Infektionen und letztlich zur Destruktion und zum Remodelling des Lungengewebes [Dinwiddie 2000, Tiddens 2000].

#### 2.3.1.1 Pulmonale Exazerbation

Die Pulmonale Exazerbation (PEx) äußert sich klinisch durch episodische auftretende respiratorische Symptome, wie zum Beispiel vermehrte Sputumproduktion und Husten [Wood 1987, Ramsey 1994, Nelson 1985]. Systemische Symptome wie Fatigue, Gewichtsverlust und Anorexie können begleitend auftreten [Wood 1987, Ramsey 1994, Nelson 1985]. Pathophysiologisch liegt der PEx ein komplexes Zusammenspiel von Zellen der Immunabwehr, Zellen des respiratorischen Epithels und dessen Bakterienflora zugrunde [Rosenfeld 2001, Gibson 2003, Ferkol 2006]. Eine vermehrte bakterielle Besiedlung des Respirationstraktes und die Aktivierung des Immunsystems spielen hierbei eine zentrale Rolle [Rosenfeld 2001, Gibson 2003, Ferkol 2006].

Die Häufigkeit des Auftretens einer PEx variiert in den verschiedenen Altersgruppen [Rabin 2004]. Beispielsweise tritt bei unter 6 jährigen CF-Patienten bei 23% und bei erwachsenen CF-Patienten bei 63% der Patienten eine PEx auf, die eine antibiotische Therapie nötig macht [Rabin 2004]. Risikofaktoren für das Auftreten einer PEx sind virale Infektionen des Atemwegssystems, eine eingeschränkte FEV1, Besiedelung des Atemtraktes mit *Pseudomonas aeruginosa* und ein niedriger sozioökonomischer Status [Wood 1987, Emerson 2002, Schechter 2001]. Auch das Alter der CF-Patienten hat Einfluss auf das Auftreten einer PEx [Rabin 2004]. Je älter die Patienten sind, desto häufiger tritt eine PEx auf [Rabin 2004]. Die Inflammation, die im Rahmen einer PEx auftritt wird durch lokale Stimuli, Mediatoren und Chemokine verursacht [Cunningham 2003, Bonfield 1995]. In der Lungenfunktionsuntersuchung kann eine verminderte VC oder ein Abfall der FEV1 und mehr als 10% als Hinweis auf eine PEx gewertet werden [Ramsey 1994, Gozal 1993]. Aufgrund konsequenter Therapien erreichen in Deutschland etwa 60% der pädiatrischen CF-Patienten eine FEV1 von mindestens 80% des Sollwerts, wohingegen lediglich 19 Prozent der Erwachsenen einen normalen Wert erreichen [Sens Überblick 2001]. Fällt die FEV1 unter 30% des Sollwerts, so ist mit einer mittleren Sterblichkeit von 50% innerhalb der folgenden zwei Jahre zu rechnen [Stuhrmann 1999, Hayllar 1997].

Bisher gibt es außer der Lungenfunktionsuntersuchung keine validen bzw. im klinischen Alltag routinemäßig eingesetzten nicht-invasiven diagnostische Marker für das Auftreten und den Progress einer PEx [Ferkol 2006]. Für die PEx gibt es bislang weder eine standardisierte Definition, noch zuverlässige Laborparameter, die zur Diagnosesicherung der PEx dienen [Ferkol 2006]. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass es nötig ist, zuverlässige Routinemarker, die eine PEx identifizieren und das Voranschreiten einer PEx detektieren, im klinischen Alltag zu etablieren.

### 2.3.1.2 Krankheitsstadien und Scoresysteme

Zur Einteilung der CF in verschiedene Krankheitsstadien wurden unterschiedliche Scores entwickelt. Im folgenden Abschnitt wird eine Auswahl davon vorgestellt.

#### Rosenfeld-Score

Margaret Rosenfeld etablierte im Jahr 2001 einen Exazerbationsindex, welcher dazu dient, CF-Patienten in 2 Gruppen zu unterteilen. Dieser Exazerbationsindex wird auch als Rosenfeld-Score bezeichnet und unterscheidet zwischen CF-Patienten mit PEx und CF-Patienten ohne PEx. Der Rosenfeldscore setzt sich aus insgesamt sechs klinischen Befunden, welche im Rahmen einer akuten Lungeninfektion auftreten können, zusammen. Jeder dieser klinischen Befunde wird unterschiedlich gewichtet und bekommt daher einen individuellen Punktwert. Geringe körperliche Belastbarkeit wird mit 1,8 gewichtet, dem krankheitsbedingten Fernbleiben von der Schule oder der Arbeit wird ein Punktwert von 1,6 zugeteilt und vermehrtem Husten oder vermehrtem Auswurf wird ein Punktwert von 1,5 zugesprochen. Auskultatorisch auffälligen Befunden wie vermehrtem Giemen, Brummen oder Rasseln wird der Wert 1,2 zugeteilt. Eine Verminderung des Hungergefühls wird mit 1,1 gewichtet. Ist die Summe der einzelnen Punktwerte größer als 2,6, so ist das Kriterium für eine PEx erfüllt [Rosenfeld 2001, Roderfeld 2009].

Vorteile diesen Scores liegen in der raschen, nicht-invasiven Durchführbarkeit und der Anwendbarkeit bei pädiatrischen und erwachsenen CF-Patienten. Der Rosenfeldscore ist ein Score der speziell für die Detektion der PEx entwickelt wurde.

#### Chrispin-Norman-Score

Ein weiterer Score für die Beurteilung der Lungenbeteiligung im Rahmen der CF ist der Chrispin-Norman-Score (CNS). Dieser radiologische Score wurde bereits 1974 von Chrispin und Norman entwickelt und basiert auf der Beurteilung von Röntgenbildern des Thorax. Hierfür ist sowohl eine Beurteilung einer posterior-anterior Aufnahme als auch

einer seitlichen Aufnahme nötig. Beurteilt werden folgende Parameter: Sternalvorwölbung, Brustkyphose, Zwerchfellabflachung, bronchiale streifige Strukturvermehrung im rechten Oberfeld, linken Oberfeld, rechten Unterfeld, linken Unterfeld, Fleckschatten im rechten Oberfeld, linken Oberfeld, rechten Unterfeld, linken Unterfeld, Ringstrukturen im rechten Oberfeld, linken Oberfeld, rechten Unterfeld, linken Unterfeld und großflächige Transparenzminderung im rechten Oberfeld, linken Oberfeld, rechten Unterfeld und linken Unterfeld. Pro Parameter werden Punkte von null bis zwei vergeben. Die Punkte bedeuten Folgendes: 0: nicht vorhanden. 1: vorhanden, aber nicht ausgeprägt. 2: ausgeprägt. Die jeweils vergebenen Punktwerte werden addiert. Im besten Fall können null, im schlechtesten Fall können 38 Punkte erreicht werden [Chrispin 1974]. Ein Vorteil dieses Scores ist die relativ einfache Durchführbarkeit. Außerdem können die Röntgen-Thoraxbilder weitestgehend objektiv beurteilt werden. Nachteile sind die bei der Erstellung der Röntgen-Thoraxbilder entstehende Strahlung und die Vernachlässigung anderer Organsysteme, an denen sich die CF ebenfalls manifestieren kann. Ein weiterer Nachteil ist die Anwendung dieses Scores bei Erwachsenen CF-Patienten, da Chrispin und Norman diesen Score an pädiatrischen CF-Patienten entwickelt haben.

#### Shwachman-Score

Der Shwachman-Score ist ein 1958 von Shwachman entwickeltes Schema zur Befundauswertung mit dem Ziel der Festlegung eines Schweregrads der CF. Beurteilt werden bei diesem klinischen Score die Parameter allgemeine Aktivität, klinischer Befund, Ernährungszustand und Röntgenbefund des Thorax. Pro Parameter wird ein Punktwert zugeordnet. Die Summe der Punktwerte entspricht dem Schweregrad [Shwachman 1958].

Allgemeine Aktivität	Klinischer Befund	Ernährungszustand	Röntgenbefund
Völlig normale Aktivität; spielt Ball; besucht die Schule regelmäßig usw.  25 Punkte	Normal; kein Husten; Atmung regelrecht; Lungen frei; gute Körperhaltung  25 Punkte	Gewicht/Länge oberhalb der 25. Perzentile; Stühle geformt, fast normal; gut entwickelte Muskulatur/Tonus  25 Punkte	Lungenfelder klar  25 Punkte
Geringe Ausdauer; abends müde; Schulbesuch gut  20 Punkte	Puls/Atmung in Ruhe normal; seltenes Husten/Räusperrn; keine Trommelschlegelfinger/-zehen; Lungen frei; minimales Emphysem  20 Punkte	Gewicht und Länge zwischen 15. und 20. Perzentile; Stühle leicht verändert; ausreichende Muskulatur und Tonus  20 Punkte	Minimale Betonung der Bronchial- und Gefäßzeichnung; beginnendes Emphysem  20 Punkte
Ruht sich tagsüber gern aus; ermüdet leicht nach Anstrengung; Schulbesuch noch ausreichend  15 Punkte	Gelegentlicher Husten, z.B. morgens beim Aufstehen; Atmung leicht beschleunigt; leichtes Emphysem; rauhes Atemgeräusch  15 Punkte	Gewicht/Länge oberhalb der 3. Perzentil; Stühle im Allgemeinen schlecht, mäßig, kaum geformt; sehr geringe Auftreibung des Abdomens, soweit überhaupt nachweisbar; schlaffer Muskeltonus; reduzierte Muskulatur  15 Punkte	Leichtes Emphysem mit fleckförmigen Atelektasen; vermehrte Bronchial- und Gefäßzeichnung  15 Punkte
Nur häuslicher Unterricht möglich; nach kurzem gehen Dyspnoe; ruht sich gern aus  10 Punkte	Viel Husten, gewöhnlich mit Auswurf; Einziehung des Thorax; mäßiges Emphysem; Thorax kann deformiert sein; meist Rasselgeräusche; Trommelschlegelfinger ++ bis +++  10 Punkte	Gewicht/Länge unterhalb der 3. Perzentile; schlecht geformte, massige, fettige übelriechende Stühle; schlafe und an der Masse reduzierte Muskulatur; leichte bis mäßige Auftreibung des Abdomens  10 Punkte	Mäßig schweres Emphysem; ausgedehnte Bezirke von Atelektasen sowie verstreute Infektionsherde; minimale Bronchiektasen  10 Punkte
Orthopnoe, bettlägerig oder sitzend  5 Punkte	Schwere Hustenanfälle; Tachypnoe mit Tachykardie und erheblichem Lungenbefund; unter Umständen Rechtsherzversagen; Trommelschlegelfinger +++ bis ++++  5 Punkte	Erhebliche Unterernährung; großes aufgetriebenes Abdomen; Rektumprolaps; voluminöse, faulige, fettige, zahlreiche Stühle  5 Punkte	Ausgeprägte Veränderungen mit Zeichen der Verlegung der Luftwege und Infektion; lobäre Atelektase und Bronchiektasen  5 Punkte

Punktzahl:	86-100	71-85	56-70	41-55	<40
Schweregrad:	I°	II°	III°	IV°	V°
Einstufung:	sehr gut	gut	leicht erkrankt	mittelschwer erkrankt	schwer erkrankt

Tabelle 1: Shwachman-Score: Schema einer klinischen Befundausswertung [Shwachman 1958]

Ein Vorteil dieses Scores liegt in der Beurteilung mehrerer Organsysteme. Einen Nachteil stellt die für das Röntgen-Thoraxbild erforderliche Strahlung dar. Dieser 1958 eingeführte Score wurde an pädiatrischen Patienten entwickelt und ist daher nur eingeschränkt auf erwachsene CF-Patienten übertragbar.

### 2.3.2 Die zystische-Fibrose-assoziierte Leberbeteiligung

Die Diagnose der Leberbeteiligung (CFLD: cystic fibrosis liver disease), die im Rahmen der CF auftreten kann, kann mit Hilfe kürzlich entwickelter Richtlinien [Debray 2011] gestellt werden. Voraussetzung für die Diagnosestellung ist, dass mindestens zwei der folgenden Kriterien zutreffen oder die Persistenz der folgenden Kriterien über ein Jahr gewährleistet ist:

- sonographisch bestätigte Hepatomegalie (Leberspannweite > 2cm unterhalb des Rippenbogens in der Medioclavicularlinie)
- zwei von der Norm abweichende Leberenzymwerte (ALT, AST,  $\gamma$ GT>ULN)
- Ultraschallpathologien, außer der Hepatomegalie (erhöhte bzw. heterogene Echogenität, noduläre Veränderungen, unscharfe Leberbegrenzung)

Im Hinblick auf die Analyse des Serums von Patienten mit CFLD konnte gezeigt werden, dass die Serummarker TIMP-4 und Endoglin in erhöhter Konzentration vorliegen. Die Expression dieser Marker korreliert mit dem Schweregrad der CFLD und kann daher ebenfalls zur nicht-invasiven Diagnosestellung genutzt werden. Zur Erhöhung der Sensitivität der Diagnosestellung der CFLD, kann die Bestimmung von TIMP-4 und Endoglin durch die Untersuchung der Lebersteifigkeit mittels der transienten Elastographie ergänzt werden [Rath 2013].

### 3. Fragestellung und Hypothese

Intensive Forschungen bezüglich Leber- und Lungenfibrose haben dazu beigetragen, die Pathogenese der Fibrogenese besser verstehen zu können und nicht-invasive quantitative Serumfibrosemarker zu identifizieren. Serumfibrosemarker, wie MMPs, sind pathophysiologisch am Umbauprozess der EZM beteiligt und könnten als ein direktes Korrelat der molekularen Pathogenese der Fibrogenese gewertet werden [Gressner 2007, Page-McCaw 2007, Parks 2001, Rath 2013]. MMP-8 und -9 werden außerdem direkt von neutrophilen Granulozyten freigesetzt und induzieren die Sekretion neutrophiler Chemokine [Campoccia 1993, Gaggar 2011, Nordenbaek 1999, Volck 1998]. Basierend auf dieser Grundlage liegt der vorliegenden Arbeit die Hypothese zugrunde, dass Matrix- oder Neutrophilenmarker mit der Verschlechterung der Lungenfunktion und dem Auftreten der PEx bei CF-Patienten assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgesuchte experimentelle Matrix- und Neutrophilenmarker im Serum von CF-Patienten quantifiziert. Außerdem wurde untersucht, ob sich diese Marker als Biomarker bzw. Surrogatmarker für die CF-assoziierte Lungenerkrankung und die PEx eignen.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind folgende:

1. Erforschung neuer Serum-Fibrosebiomarker, die eine PEx bei CF-Patienten detektieren
2. Prüfung dieser Serum-Fibrosemarker auf Lungenspezifität

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Patienten

Für die vorliegende Arbeit wurden 54 Erwachsene und 26 Kinder mit CF untersucht. In Tabelle 2 (siehe S. 33) und Tabelle 3 (siehe S. 35) sind die Charakteristika dieser Patienten dargestellt. Erhoben wurden neben den Kriterien Geschlecht, Alter und BMI auch das Vorhandensein einer CF-Leberbeteiligung (CFLD), das mittels Lungenfunktion ermittelte Einsekundenvolumen und die Vitalkapazität. Außerdem wurde das Serum der eingeschlossenen Patienten auf folgende Parameter untersucht: Hämoglobin, Thrombozyten, Alanin-Aminotransferase (ALT, GPT),  $\gamma$ -Glutamyl-transferase (GGT) Bilirubin, Albumin, Prothrombinzeit und CRP.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Studie wurde auf Grundlage der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Von allen teilnehmenden Patienten oder deren Erziehungsberechtigten wurde vorab eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (Klinikstraße 36, 35392 Gießen, Deutschland) geprüft und genehmigt. Die Antragsnummer lautet 75/09.

Die Diagnosesicherung der CF erfolgte bei allen Teilnehmern primär mittels Schweißtest und wurde später durch genetische Analysen bestätigt. Alle Patienten wurden nach europäischen und U.S.-Richtlinien behandelt [Flume 2007, Kerem 2005]. Die teilnehmenden Patienten stellten sich alle 3 Monate zur Routineuntersuchung in den entsprechenden Ambulanzen der Pädiatrie und Pneumologie des Universitätsklinikums in Gießen vor. Die pädiatrischen Patienten stellten sich im Mukoviszidose-Zentrum der Kinderklinik vor. Die erwachsenen Patienten stellten sich in der Mukoviszidose-Ambulanz für Erwachsene der Medizinischen Klinik II vor.

Bei jeder Vorstellung erfolgte eine ausführliche klinische Untersuchung, bei der folgende Parameter routinemäßig erhoben wurden: Anamnese, körperliche Untersuchung, Sputumprobe, Blutprobe und Lungenfunktionsuntersuchung plus Blutgasanalyse (BGA). Die Serumproben der Patienten wurden zur Beurteilung von CRP, Leberenzymen und Leukozyten in dem Zeitraum zwischen 8:00 Uhr und 14:00 Uhr entnommen. Im Falle einer PEx wurden die Serumproben vor dem Einsatz von Antibiotika entnommen. Die Lungenfunktionsuntersuchung wurde mittels Bodyplethysmographie nach etablierten Richtlinien [Miller 2005] mit einem MasterScreen V4.6 (VIASYS Healthcare GmbH, Hoechst, Deutschland) durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden gewichtsadaptiert unter Berücksichtigung des individuellen Body-Maß-Index (BMI) ausgewertet. Um die

Frage, ob Matrix- oder Neutrophilenmarker als aussagekräftige Biomarker für die CF-assozierte Lungenerkrankung herangezogen werden können, beantworten zu können, wurde das Serum von CF-Patienten mit einem FEV1 < und  $\geq 80\%$ , das Serum von CF-Patienten mit einer VC < und  $\geq 80\%$  und das Serum von CF-Patienten mit einem FEV1/VC-Quotienten < und  $\geq 70\%$  (FEV1/VC) untersucht. Diese Kriterien wurden bereits in mehreren klinischen Studien untersucht und dienen als Indikatoren für die CF-assozierte Lungenerkrankung [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002].

Um die Ergebnisse statistisch analysieren zu können, wurde die CF-assozierte Lungenerkrankung folgendermaßen definiert:

- Mittlere bis schwere Lungenbeteiligung: Patienten mit einem FEV1 und einer VC <80% und einem FEV1/VC-Quotienten von <70%.
- Leichte Lungenbeteiligung: Patienten mit einem FEV1 und einer VC  $\geq 80\%$  und einem FEV1/VC-Quotienten  $\geq 70\%$ .

Die Patienten wurden dazu aufgefordert bei Auftreten von Symptomen, die mit einer PEx assoziiert sein könnten, direkt die Klinik zu benachrichtigen. Die Definition der PEx wurde auf Grundlage des von Margaret Rosenfeld im Jahr 2001 festgelegten Scores gestellt [Rosenfeld 2001]. Der PEx-Score (Rosenfeldscore) umfasst sechs klinische Merkmale der CF-assozierten PEx, welche jeweils mit unterschiedlichen Koeffizienten (angegeben in Klammern) gewichtet wurden:

- Abnehmende Belastbarkeit (1,8)
- zunehmender Husten (1,5)
- zunehmende Verschleimung (1,5)
- Schulunfähigkeit oder Arbeitsunfähigkeit (1,6)
- pathologische Auskultationsbefunde in der Lungenauskultation (1,2)
- verringerter Appetit (1,1) [Rosenfeld 2001]

Ergaben die Auswertungen einen Wert  $\geq 2,6$ , so wurde die Diagnose der PEx gestellt.

Eine antibiotische Therapie wurde dann eingeleitet, wenn die behandelnden ärztlichen CF-Spezialisten der jeweiligen Abteilung des Universitätsklinikums Gießen dies anhand der klinischen Befundkonstellation für erforderlich hielten. Die Auswahl der antibiotischen Therapie erfolgte basierend auf der Sputumanalyse des jeweiligen Patienten und wurde so gewählt, dass die am häufigsten bei PEx auftretenden Erreger abgedeckt wurden.

#### 4.2 Routinelaborparameter und Bestimmung experimenteller Matrix- und Neutrophilenmarker

Das gesamte Patientenkollektiv wurde jeweils an dem Tag, an dem die Quantifizierung der Serumbiomarker erfolgte, routinemäßig klinisch und hämatologisch untersucht. Die entnommenen Serumproben wurden auf folgende Biomarker untersucht:

- Serum MMP-1, -2, -8, -9 und -13 wurden mittels Fluorokine MAP multiplex human MMP panel (R&D Systems, Minneapolis, USA) ermittelt.
- TIMP-1, TIMP-2, C-terminales Procollagen III Peptid (PIIIP), Hyaluronsäure (HA) und YKL-40 wurden mit Hilfe von in einer Verdünnung von 1:200 für TIMP-1 und -2, 1:13 für PIIIP, 1:1 für HA und unverdünnt für YKL-40 (MMP-9: Cat.No. DY911; TIMP-1: Cat.No. DY970; TIMP-2: Cat.No. DY971, alle von R&D Systems, Weinheim, Deutschland; PIIIP: Cat.No. E3087Hu, YKL-40: Cat.No. 8020, beide von Quidel, San Diego, USA; HA: Cat.No. TE1017, Osteomedical, Bünde, Deutschland) bestimmt.

#### 4.3 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 21.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill). Die Testung der Normalverteilung der Daten erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests [Sachs 2006]. Da sich zeigte, dass die Daten nicht normalverteilt sind, wurden nicht-parametrische Tests für die Datenauswertung verwendet. Die Expression der Serummarker ist in Kastendiagrammen (Box-Whisker-Plots) dargestellt.

#### 4.4 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Kastendiagrammen (Box-Whisker-Plots). Diese eignen sich zur Darstellung nichtparametrischer Werte und zeigen Unterschiede zwischen Populationen auf. Ein Kastendiagramm besteht aus einem Rechteck, dem Kasten oder der Box, und zwei Linien, die den Kasten in jede Richtung verlängern. Bezeichnet werden diese zwei Linien als Antennen oder Whisker und werden durch einen Strich begrenzt. Innerhalb des Kastens liegen 50% der Werte.

Die Begrenzung des Kastens entspricht dem oberen und unteren Quartil beziehungsweise der 75. bzw. 25. Perzentile. Innerhalb des Kastens wird der Median als Strich dargestellt, anhand dessen Lage man einen Eindruck über die Schiefe der Daten bekommt. Die Antennen oder Whisker stellen die Werte dar, die außerhalb des Kastens liegen. Begrenzt werden diese Antennen durch das Minimum und das Maximum. Werte, die um das 1,5 bis 3fache von der Darstellung abweichen, werden als Ausreißer (o) definiert. Signifikante Unterschiede werden hervorgehoben (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Patientencharakteristika

Klinische und demographische Daten von 54 Erwachsenen und 26 Kindern mit CF, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

#### 5.1.1 Demographische und klinische Daten der adulten CF-Patientenkohorte

Tabelle 2: Demographische und klinische Daten der adulten CF-Patientenkohorte

	Adulte CF-Patienten (n =54)		
	Leichte CF-Lungenerkrankung (n =34)	Mittlere bis schwere CF-Lungenerkrankung (n =20)	Signifikanz
<b>Demographische und klinische Daten</b>			
Männlich (n)	21	10	p =0,403
Weiblich (n)	13	10	
Alter (J)			
Mittelwert (Median) ± SD	32,2 (31) ± 8,8	30,9 (30) ± 7	p =0,647
BMI (kg/m <sup>2</sup> )			
Mittelwert (Median) ± SD	21,2 (21) ± 2,5	20,2 (20) ± 2,7	p =0,119
CFLD (n)			
keine CFLD	16	6	p =0,222
CFLD	18	14	
%FEV1			
Mittelwert (Median) ± SD	73 (73) ± 19	40 (39) ± 13	p<0,001
%VC			
Mittelwert (Median) ± SD	86 (88) ± 16	69 (73) ± 17	p =0,003

	Adulte CF-Patienten (n =54)		
	Leichte CF-Lungenerkrankung (n =34)	Mittlere bis schwere CF-Lungenerkrankung (n =20)	Signifikanz
<b>Biochemie</b>			
Hämoglobin (g/dl)			
Mittelwert (Median) ± SD	14,1 (14,4) ± 2,1	14,2 (14,5) ± 1,7	p =0,971
Bandbreite	8,5-17,1	10,5-16,9	
Thrombozyten (Tsd./µl)			
Mittelwert (Median) ± SD	282 (282) ± 103	295 (282) ± 99	p =0,837
Bandbreite	13-514	113-541	
ALT (U/L)			
Mittelwert (Median) ± SD	27 (25) ± 16	24 (21) ± 12	p =0,622
Bandbreite	7-83	10-55	
γGT (U/l)			
Mittelwert (Median) ± SD	32 (19) ± 31	35 (19) ±38	p =0,762
Bandbreite	9-114	6-137	
Bilirubin (mg/dl)			
Mittelwert (Median) ± SD	1,4 (0,9) ± 1,9	0,7 (0,6) ±0,5	p =0,511
Bandbreite	0,1-7	0,2-1,8	
Albumin (g/dl)			
Mittelwert (Median) ± SD	4,3 (4,4) ±0,38	4,2 (4,2) ±0,39	p =0,437
Bandbreite	3,4-4,9	3,3-4,6	
Prothrombinzeit (%)			
Mittelwert (Median) ± SD	89 (97) ±22	91 (90) ±13	p =0,625
Bandbreite	21-112	72-116	
CRP (mg/dl)			
Mittelwert (Median) ± SD	17 (7) ±48	20 (10) ±31	p =0,163
Bandbreite	0-285	0-135	

In der adulten CF-Kohorte zeigten sich bezüglich der in Tabelle 2 erfassten Lungenfunktionsparameter signifikante Unterschiede zwischen erwachsenen CF-Patienten mit leichter CF-Lungenerkrankung und erwachsenen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung. Mittlere bis schwere Lungenbeteiligung wurde folgendermaßen festgelegt: %FEV1 <80%, %VC <80% und reduziertes FEV1/VC-Verhältnis <70%. Bei Patienten mit leichter Lungenbeteiligung galten entsprechend folgende Voraussetzungen: FEV1 ≥80%, VC ≥80% und FEV1/VC-Verhältnis ≥70% [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002]. Bei erwachsenen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenerkrankung zeigten sich erniedrigte

Werte der %FEV1 im Vergleich zu erwachsenen CF-Patienten mit leicht ausgeprägter CF-Lungenerkrankung ( $p < 0,001$ ). Ebenso zeigte sich eine Reduktion der %VC bei erwachsenen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungen-erkrankung im Vergleich zu erwachsenen CF-Patienten mit leichter CF-Lungenerkrankung ( $p = 0,003$ ).

### 5.1.2 Demographische und klinische Daten der pädiatrischen CF-Patientenkohorte

Tabelle 3: Demographische und klinische Daten der pädiatrischen CF-Patientenkohorte

	Pädiatrische CF-Patienten (n =26)		
	Leichte CF-Lungenerkrankung (n =19)	Mittlere bis schwere CF-Lungenerkrankung (n =7)	Signifikanz
<b>Demographische und klinische Daten</b>			
Männlich (n)	7	6	p =0,063
Weiblich (n)	12	1	
Alter (J)			
Mittelwert (Median) ± SD	11,5 (13) ±5,5	15 (16) ±2,9	p =0,025
BMI (kg/m <sup>2</sup> )			
Mittelwert (Median) ± SD	-0,22 (-0,5) ±1,1	-1,34 (-1,7) ±1,1	p =0,041
CFLD (n)			
keine CFLD	11	5	p =0,611
CFLD	8	2	
%FEV1			
Mittelwert (Median) ± SD	91 (94) ±15	61 (65) ±23	p =0,004
%VC			
Mittelwert (Median) ± SD	87 (89) ±19	79 (76) ±29	p =0,657

<b>Pädiatrische CF-Patienten (n =26)</b>			
	<b>Leichte CF-Lungenerkrankung (n =19)</b>	<b>Mittlere bis schwere CF-Lungenerkrankung (n =7)</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Biochemie</b>			
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	13,8 (13,8) ±0,9	14,2 (14,2) ±1,2	p =0,364
Bandbreite	12,4-15,6	12,5-16	
<b>Thrombozyten (Tsd./µl)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	329 (326) ±64	346 (332) ±80	p =0,651
Bandbreite	217-418	217-484	
<b>ALT (U/L)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	36 (30) ±19	26 (24) ±15	p =0,156
Bandbreite	17-85	12-54	
<b>γGT (U/l)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	22 (16) ±24	39 (18) ±45	p =0,231
Bandbreite	7-115	13-138	
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	0,5 (0,3) ±0,4	0,3 (0,3) ±0,1	p =0,971
Bandbreite	0,2-1,8	0,1-0,4	
<b>Albumin (g/dl)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	4,4 (4,4) ±0,2	4,4 (4,5) ±0,4	p =0,974
Bandbreite	4,1-4,7	3,9-4,8	
<b>Prothrombinzeit (%)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	87 (90) ±11	86 (84) ±7	p =0,828
Bandbreite	68-106	76-95	
<b>CRP (mg/dl)</b>			
Mittelwert (Median) ± SD	1 (0) ±3	8 (8) ±6	p =0,004
Bandbreite	0-12	0-17	

In der pädiatrischen CF-Kohorte zeigten sich bezüglich der in Tabelle 3 erfassten Parameter signifikante Unterschiede im Bereich Alter, BMI, %FEV1 und CRP zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit leichter CF-Lungenerkrankung und pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung. Mittlere bis schwere Lungenbeteiligung wurde folgendermaßen festgelegt: %FEV1 <80%, %VC <80% und reduziertes FEV1/VC-Verhältnis <70%. Bei Patienten mit leichter Lungenbeteiligung galten entsprechend folgende Voraussetzungen: FEV1 ≥80%, VC ≥80% und FEV1/VC-Verhältnis ≥70% [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002]. Die untersuchten pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung waren älter als die pädiatrischen Patienten mit leichter CF-Lungenerkrankung

( $p = 0,025$ ). Bei pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung zeigten sich erniedrigte BMI-Werte im Vergleich zu pädiatrischen CF-Patienten mit leicht ausgeprägter CF-Lungenerkrankung ( $p = 0,041$ ). Außerdem zeigte sich eine Reduktion der %FEV1 bei pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung im Vergleich zu pädiatrischen Patienten mit leichter CF-Lungenerkrankung ( $p = 0,004$ ). Im Hinblick auf das CRP zeigte sich eine Erhöhung des CRPs bei pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung verglichen mit pädiatrischen CF-Patienten mit leichter CF-Lungenerkrankung ( $p = 0,004$ ).

## 5.2 Lungenfunktion und Biomarkerexpression

Die CF-Patienten des untersuchten Kollektivs wurden nach Ausprägung der CF-Lungenerkrankung in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Zur Unterteilung wurden das FEV1, die VC sowie das FEV1/VC-Verhältnis herangezogen. Die CF-Patienten mit einem FEV1 und einer VC von  $\geq 80\%$  und einem FEV1/VC-Verhältnis von  $\geq 70\%$  wurden in die Gruppe der CF-Patienten mit leichter CF-Lungenbeteiligung eingeschlossen. Die CF-Patienten mit einem FEV1 und einer VC von  $< 80\%$  und einem FEV1/VC-Verhältnis von  $< 70\%$  wurden in die Gruppe der CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung eingeschlossen [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002].

Außerdem wurden folgende Matrix- und Neutrophilenmarker im Serum der CF-Patienten bestimmt: YKL-40, MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, HA und PIIP.

### 5.2.1 Analyse der adulten CF-Patientenkohorte

Insgesamt wurden 54 erwachsene CF-Patienten untersucht. 34 der erwachsenen CF-Patienten wurden anhand der oben genannten Kriterien in die Gruppe der Patienten mit leichter Lungenbeteiligung eingeteilt. Bei 20 erwachsenen CF-Patienten zeigte sich ein FEV1 und eine VC von  $< 80\%$  und ein FEV1/VC-Verhältnis von  $< 70\%$ , was für eine mittlere bis schwere Lungenbeteiligung im Rahmen der Grunderkrankung spricht. In diesem Patientenkollektiv konnte im Vergleich zu Patienten mit einer nicht signifikanten Einschränkung der Lungenfunktion oder einer nur milden ausgeprägten CF-Lungenbeteiligung (definiert als FEV1 und VC  $\geq 80\%$  oder FEV1/VC  $\geq 70\%$ ) ein stabiler und signifikanter Anstieg von MMP-8 und YKL-40 verzeichnet werden (Abbildung 6 und Abbildung 7). Außerdem zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von MMP-9 und TIMP-1 bei erwachsenen CF-Patienten mit reduzierter VC (MMP-9 und TIMP-1) und

reduzierter FEV1 (TIMP-1) oder einem reduziertem FEV1/VC-Verhältnis (MMP-9) (Abbildung 6 und Abbildung 7).

### 5.2.1.1 Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei adulten CF-Patienten mit Lungenbeteiligung

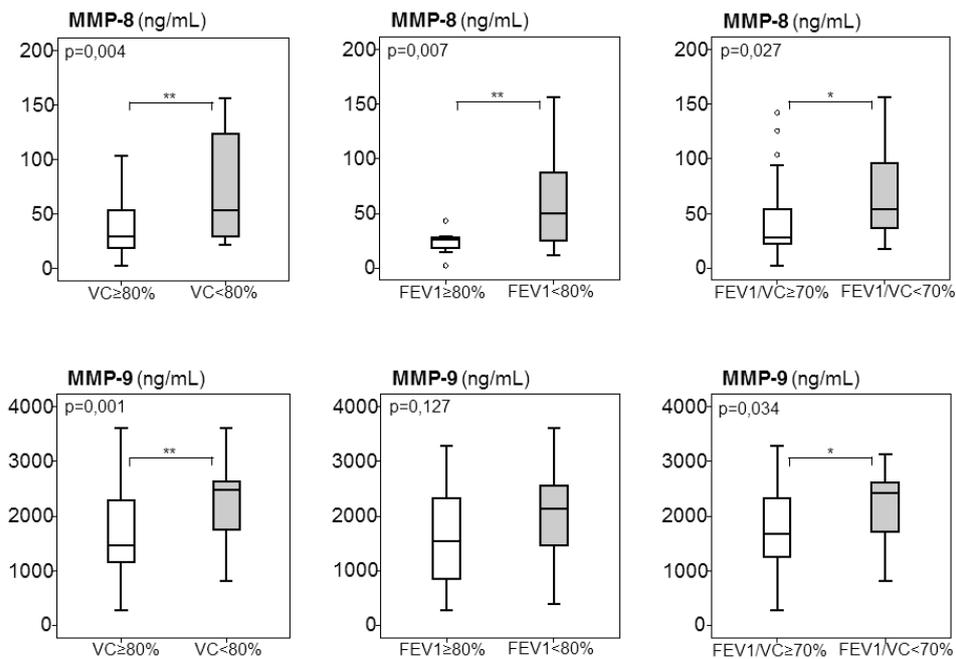


Abbildung 6: Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei adulten CF-Patienten mit Lungenbeteiligung

Bei adulten CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung, zeigte sich durchweg ein Anstieg der MMP-8-Serumkonzentration verglichen mit adulten CF-Patienten mit leichter Lungenbeteiligung. Mittlere bis schwere Lungenbeteiligung wurde folgendermaßen festgelegt: %FEV1 < 80%, %VC < 80% und reduziertes FEV1/VC-Verhältnis < 70%. Bei Patienten mit leichter Lungenbeteiligung galten entsprechend folgende Voraussetzungen: FEV1 ≥ 80%, VC ≥ 80% und FEV1/VC-Verhältnis ≥ 70% [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002]. Bei adulten CF-Patienten mit einer VC ≥ 80% betrug der Median der MMP-8-Serumkonzentration 33,16ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 1460ng/ml, wohingegen der Median der MMP-8-Serumkonzentration bei adulten CF-Patientin mit einer VC < 80% 53,55ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 2475ng/ml betrug. Bei adulten CF-Patienten mit einem FEV1 ≥ 80% betrug der Median der MMP-8-Serumkonzentration 27,48ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 1550ng/ml, wohingegen der Median der MMP-8-Serumkonzentration bei adulten CF-Patientin mit einem FEV1 < 80% 51,58ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 2130ng/ml betrug. Ebenso zeigte sich eine signifikant erhöhte MMP-9-

Serumkonzentration bei adulten CF-Patienten mit sinkender %VC und sinkendem FEV1/VC Verhältnis. Die oberen und unteren Kastenbegrenzungen entsprechen der 75. und 25. Perzentile. Die Linie markiert den Median. Die Antennenenden markieren jeweils das Minimum und das Maximum. Die Sternchen kennzeichnen die signifikanten Unterschiede: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Ausreißer sind mit ° gekennzeichnet.

### 5.2.1.2 Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei adulten CF-Patienten mit Lungenbeteiligung

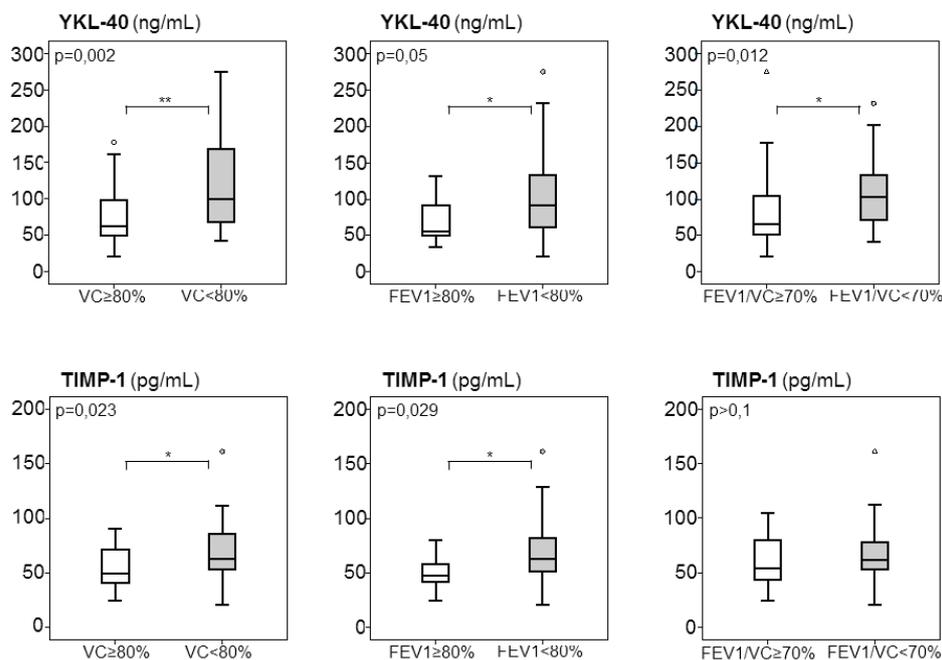


Abbildung 7: Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei adulten CF-Patienten mit Lungenbeteiligung

Bei adulten CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung, zeigte sich durchweg ein Anstieg der YKL-40-Serumkonzentration verglichen mit adulten CF-Patienten mit leichter Lungenbeteiligung. Mittlere bis schwere Lungenbeteiligung wurde folgendermaßen festgelegt: %FEV1 < 80%, %VC < 80% und reduziertes FEV1/VC-Verhältnis < 70%. Bei Patienten mit leichter Lungenbeteiligung galten entsprechend folgende Voraussetzungen: FEV1 ≥ 80%, VC ≥ 80% und FEV1/VC-Verhältnis ≥ 70% [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002]. Bei adulten CF-Patienten mit einer VC ≥ 80% betrug der Median der YKL-40-Serumkonzentration 62,69ng/ml, wohingegen der Median der YKL-40-Serumkonzentration bei adulten CF-Patientin mit einer VC < 80% 102,7ng/ml betrug. Bei adulten CF-Patienten mit einem FEV1 ≥ 80% betrug der Median der YKL-40-Serumkonzentration 55,78ng/ml, wohingegen der Median der YKL-40-

Serumkonzentration bei adulten CF-Patientin mit einem FEV1<80% 91,27ng/ml betrug. Ebenso zeigte sich eine signifikant erhöhte TIMP-1-Serumkonzentration bei adulten CF-Patienten mit sinkender %VC und sinkendem FEV1. Bei adulten CF-Patienten mit einer VC ≥80% betrug der Median der TIMP-1-Serumkonzentration 51,75ng/ml, wohingegen der Median der TIMP-1-Serumkonzentration bei adulten CF-Patientin mit einer VC <80% 63,21ng/ml betrug. Bei adulten CF-Patienten mit einem FEV1 ≥80% betrug der Median der TIMP-1-Serumkonzentration 47,71ng/ml, wohingegen der Median der TIMP-1-Serumkonzentration bei adulten CF-Patientin mit einem FEV1 <80% 63,21ng/ml betrug. Die oberen und unteren Kastenbegrenzungen entsprechen der 75. und 25. Perzentile. Die Linie markiert den Median. Die Antennenenden markieren jeweils das Minimum und das Maximum. Die Sternchen kennzeichnen die signifikanten Unterschiede: \*p<0,05, \*\*p<0,01. Ausreißer sind mit ° gekennzeichnet.

#### 5.2.1.3 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf FEV1, VC und FEV1/VC

Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Serumkonzentrationen weiterer Marker für Matrixumbau und Neutrophile. Hier wurden die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) im erwachsenen CF-Kollektiv untersucht. Keiner dieser Marker wies signifikante Unterschiede zwischen erwachsenen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer und erwachsenen CF-Patienten mit leichter Lungenbeteiligung auf.

Tabelle 4: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf FEV1

	FEV1≥80%	FEV1<80%	Signifikanz
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	1157±420	1562±865	p =0,369
Median (Bandbreite)	1295 (510-1790)	1285 (410-4160)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	13,4±2,9	12,8±2,3	p =0,244
Median (Bandbreite)	14,1 (6,7-17)	12,9 (8,9-18,6)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	21,1±18,1	44,3±140	p =0,374
Median (Bandbreite)	15,5 (1,6-44,6)	4,96 (0-651)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	118,5±25,3	130,2±25,6	p =0,247
Median (Bandbreite)	117,6 (80,8-157)	123,1 (85,3-211,1)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	26,2±26,1	29,3±21,4	p =0,275
Median (Bandbreite)	21,2 (3,6-92)	29 (0,8-127,5)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	11,7±15,4	15,3±27,7	p =0,721
Median (Bandbreite)	4,6 (0-45,7)	4,9 (1,2-136,1)	

Die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) wiesen keinen Unterschied zwischen adulten CF-Patienten mit einer FEV1 <80% und ≥80% auf.

Tabelle 5: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf VC

	VC≥80%	VC<80%	Signifikanz
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	1338±661	1649±941	p =0,345
Median (Bandbreite)	1280 (410-3430)	1310 (410-4160)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	13,1±2,8	12,8±1,8	p =0,566
Median (Bandbreite)	13,2 (6,7-18,6)	12,8 (9,7-16,5)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	69,3±176	12,4±13,5	p =0,184
Median (Bandbreite)	22,7 (1,6-651,8)	5 (0-41)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	126±29,2	130,1±21,7	p =0,406
Median (Bandbreite)	119,1 (80,8-211,1)	124,1 (85,3-179,1)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	32,8±26,8	24,1±14,6	p =0,378
Median (Bandbreite)	28,1 (3,6-127,5)	23 (0,8-53,6)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	19,2±34	10,1±27,7	p =0,674
Median (Bandbreite)	5,3 (0-136,1)	4,9 (1,6-50,5)	

Die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) wiesen keinen Unterschied zwischen adulten CF-Patienten mit einer VC <80% und ≥80% auf.

Tabelle 6: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf FEV1/VC

	FEV1/VC≥70%	FEV1/VC<70%	Signifikanz
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	1464±726	1490±860	p =0,751
Median (Bandbreite)	1310 (510-3160)	1270 (416-4160)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	12,4±2,8	13,1±2,2	p =0,442
Median (Bandbreite)	12,4 (6,6-17,1)	13,2 (9-18,6)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	15,2±15,4	51,7±150,7	p =0,982
Median (Bandbreite)	8,4 (1,6-44,6)	8,4 (0-652)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	118,7±26	132±24,8	p =0,075
Median (Bandbreite)	108,7 (80,8-160,1)	124,4 (85,3-211,1)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	25,9±24,8	29,9±23	p =0,416
Median (Bandbreite)	24,8 (3,6-92)	28,7 (0,8-127,6)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	16,2±33,8	14±22,1	p =0,539
Median (Bandbreite)	4,3 (0-136,1)	5,1 (1,2-122,1)	

Die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptide (PIIIP) wiesen keinen Unterschied zwischen adulten CF-Patienten mit einer FEV1/VC <70% und ≥70% auf.

#### 5.2.1.4 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten ohne und mit CFLD

Das Hauptproblem vieler CF-Patienten stellt die Pathologie der Lunge dar, dennoch ist zu beachten, dass oftmals auch die Funktion der Leber und die Funktion des Pankreas durch die CF beeinträchtigt sind. Deshalb musste in Betracht gezogen werden, dass die Beteiligung der Leber und des Pankreas im Rahmen der Grunderkrankung als potenzieller Störfaktor des bei CF-Lungenbeteiligung beobachteten Anstiegs der Serumkonzentration von MMP-8, -9, YKL-40 und TIMP-1 fungieren könnte. Vor diesem Hintergrund musste beachtet werden, dass bei Patienten mit CFLD bereits erhöhte Serumkonzentrationen von TIMP-1, TIMP-2 [Rath 2012] und TIMP-4 [Rath 2013] nachgewiesen wurden. Des Weiteren wurde bereits ein Anstieg der YKL-40-Serumkonzentration bei Patienten mit Leberfibrose gezeigt [Rath 2011]. Um zu prüfen, ob die Beteiligung der Leber und des Pankreas einen Einfluss auf die

Serumkonzentrationsanstiege von MMP-8, -9, YKL-40 und TIMP-1 in der vorliegenden Patientengruppe hatten, wurde die Serumkonzentration von YKL-40, MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) bei erwachsenen und pädiatrischen CF-Patienten mit und ohne CFLD analysiert. Die Diagnosestellung der CFLD erfolgte anhand bereits etablierter Richtlinien [Debray 2011]. Der Gruppe der erwachsenen CF-Patienten ohne CFLD wurden 22 der von uns untersuchten 54 Patienten, der Gruppe der erwachsenen CF-Patienten mit CFLD wurden 32 Patienten zugeteilt. In das Kollektiv der pädiatrischen CF-Patienten ohne CFLD wurden 16 Patienten eingeschlossen. Die untersuchte Gruppe der pädiatrischen CF-Patienten mit CFLD umfasste 10 Patienten. Die Serumkonzentrationen von YKL-40, MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) wiesen keine Unterschiede zwischen erwachsenen CF-Patienten und pädiatrischen CF-Patienten mit CFLD und erwachsenen und pädiatrischen CF-Patienten ohne CFLD auf (Tabelle 7). Damit konnte die CFLD als möglicher Einflussfaktor auf die beobachteten Serumkonzentrationsanstiege bei CF-Lungenbeteiligung ausgeschlossen werden.

Tabelle 7: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten ohne (n =22) und mit (n =32) CFLD

	ohne CFLD	mit CFLD	Signifikanz
<b>YKL-40 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	85,2 ±38,5	105,2 ±62,8	p =0,360
Median (Bandbreite)	83,6 (31,2-172,8)	81,3 (21,4-275)	
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	1593 ±925	1446 ±795	p =0,660
Median (Bandbreite)	1430 (450-4160)	1285 (410-3430)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	12,44 ±2,6	13,09 ±2,4	p =0,379
Median (Bandbreite)	12,76 (6,7-18,6)	13,14 (8,02-18,45)	
<b>MMP-8 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	54,9 ±45,2	59,7 ±43,3	p =0,771
Median (Bandbreite)	43,3 (11,3-178,1)	49,2 (2,3-156,1)	
<b>MMP-9 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	1896 ±692	2057 ±877	p =0,400
Median (Bandbreite)	1690 (85-3280)	2220 (290-3610)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	19,27 ±15,34	49,26 ±151,26	p =0,298
Median (Bandbreite)	11,93 (1,6-41)	4,96 (0-651)	
<b>TIMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	59,3 ±30,4	66,9 ±23,1	p =0,149
Median (Bandbreite)	53,5 (21,1-161,3)	63,2 (27,9-128,7)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	123,33 ±18,17	129,94 ±30,1	p =0,606
Median (Bandbreite)	120,72 (89,2-149)	125,7 (80,8-211,1)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	22,35 ±15,36	32,72 ±25,96	p =0,143
Median (Bandbreite)	21,99 (0,79-50,3)	28,96 (7,2-127,5)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	14,85 ±29,45	14,32 ±23,6	p =0,898
Median (Bandbreite)	5,02 (1,2-136,1)	4,88 (0-122)	

Bei erwachsenen CF-Patienten mit CFLD (nach Debray Kriterien) und erwachsenen CF-Patienten ohne CFLD wies die Serumkonzentration von YKL-40, MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) keine Unterschiede auf.

Tabelle 8: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten ohne (n =16) und mit (n =10) CFLD

	ohne CFLD	mit CFLD	Signifikanz
<b>YKL-40 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	52,8±23,2	69,1±40,8	p =0,412
Median (Bandbreite)	50,4 (22,1-114,6)	59,2 (22-157)	
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	1074±787	1381±992	p =0,521
Median (Bandbreite)	800 (350-3460)	1270 (240-3430)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	17,6±3,8	19,7±4,97	p =0,238
Median (Bandbreite)	16,9 (12,6-26,8)	19,7 (12,91-28,34)	
<b>MMP-8 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	45,4±46,2	21,6±15,5	p =0,159
Median (Bandbreite)	27,1 (0-189,7)	19,3 (0-54,6)	
<b>MMP-9 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	1537±863	1201±879	p =0,204
Median (Bandbreite)	1275 (280-3280)	830 (340-3270)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	62,59 ±58,4	71,8 ±40,4	p =0,317
Median (Bandbreite)	49,3 (0-249)	70,7 (0,2-131,7)	
<b>TIMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	61,2±8,8	61,1±19,8	p =1,00
Median (Bandbreite)	61,7 (41,8-72,9)	58,4 (27,6-89,5)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	131,4±25,3	150,4±23,2	p =0,084
Median (Bandbreite)	133,5 (94,7-178)	149 (125,6-210)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	19,2±10,4	22,9±16,3	p =0,642
Median (Bandbreite)	17,5 (0-40,3)	26,6 (0-45,1)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ± SD	9,1±12,2	21 ±39,1	p =0,707
Median (Bandbreite)	4,3 (2-50,5)	8,2 (0-136,1)	

Bei pädiatrischen CF-Patienten mit CFLD (nach Debray) und pädiatrischen CF-Patienten ohne CFLD wies die Serumkonzentration von YKL-40, MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) keine Unterschiede auf.

#### 5.2.1.5 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten ohne und mit PI

Um die Spezifität des beobachteten Anstiegs der Serumkonzentration von MMP-8, -9, YKL-40 und TIMP-1 bei CF-Patienten mit Lungenbeteiligung weiter zu belegen, wurde die Beteiligung des Pankreas als möglicher Störfaktor geprüft. Hierzu wurde das erwachsene CF-Patientenkollektiv in erwachsene CF-Patienten mit Pankreasinsuffizienz (PI) und erwachsene CF-Patienten ohne PI unterteilt. Die Diagnose der PI wurde in den jeweiligen Ambulanzen mittels Stuhluntersuchungen und Insulinmessungen gestellt. 51 der untersuchten erwachsenen CF-Patienten waren pankreasinsuffizient. Nicht pankreasinsuffizient waren lediglich drei erwachsene CF-Patienten. In dieser Analyse wies ebenfalls keiner der untersuchten Biomarker signifikante Unterschiede bei CF-Patienten mit PI und CF-Patienten ohne PI bezüglich seiner Serumkonzentration auf.

In Zusammenschau sind diese Daten hinweisend dafür, dass der beobachtete Konzentrationsanstieg von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 spezifisch für die Existenz der CF-Lungenbeteiligung ist, ohne dass eine Beeinflussung dieser Serummarkerkonzentrationen durch Leber- oder Pankreasbeteiligung als weitere wesentliche Manifestationsorgane der CF erfolgt.

#### 5.2.2 Analyse der pädiatrischen CF-Patientenkohorte

Um den Zusammenhang der zuvor genannten Serummarker mit der CF-Lungenbeteiligung weiter zu belegen, wurde ein Kollektiv von 26 pädiatrischen CF-Patienten, deren klinische und demographische Daten in Tabelle 3 zusammengefasst sind, untersucht. Bei diesen pädiatrischen CF-Patienten wurde ebenfalls die Konzentration von Serummarkern für von Matrixumbau und Neutrophile analysiert. Die pädiatrischen CF-Patienten wurden analog zu dem untersuchten erwachsenen CF-Kollektiv in pädiatrische CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung und pädiatrische CF-Patienten mit leichter Lungenbeteiligung unterteilt. Bei pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von MMP-8 und MMP-9 nachgewiesen (Abbildung 8).

### 5.2.2.1 Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung

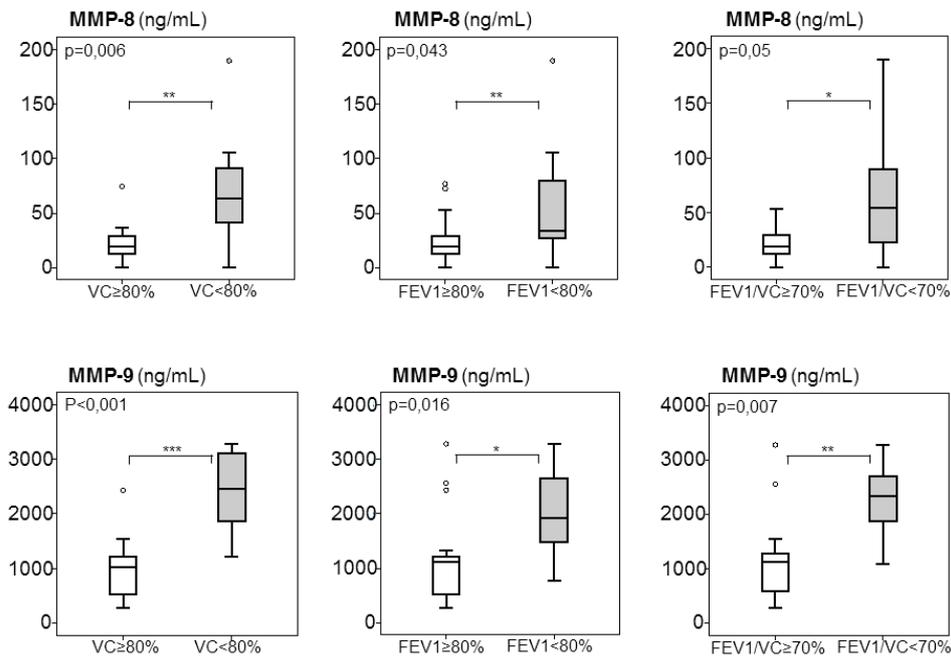


Abbildung 8: Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung

Bei pädiatrischen CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung, zeigten sich Anstiege der Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 verglichen mit pädiatrischen CF-Patienten mit leichter Lungenbeteiligung. Mittlere bis schwere Lungenbeteiligung wurde folgendermaßen festgelegt: %FEV1 <80%, %VC <80% und reduziertes FEV1/VC-Verhältnis <70%. Bei Patienten mit leichter Lungenbeteiligung galten entsprechend folgende Voraussetzungen: FEV1 ≥80%, VC ≥80% und FEV1/VC-Verhältnis ≥70% [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002]. Bei pädiatrischen CF-Patienten mit einer VC ≥80% betrug der Median der MMP-8-Serumkonzentration 19,32ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 1015ng/ml, wohingegen der Median der MMP-8-Serumkonzentration bei pädiatrischen CF-Patienten mit einer VC <80% 34,17ng/ml und die MMP-9-Serumkonzentration 2450ng/ml betrug. Bei pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1 ≥80% betrug der Median der MMP-8-Serumkonzentration 19,32ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 1120ng/ml, wohingegen der Median der MMP-8-Serumkonzentration bei pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1 <80% 34,17ng/ml und der Median der MMP-9-Serumkonzentration 1915ng/ml betrug. Die oberen und unteren Kastenbegrenzungen entsprechen der 75. und 25. Perzentile. Die Linie markiert den Median. Die Antennenenden markieren jeweils das Minimum

und das Maximum. Die Sternchen kennzeichnen die signifikanten Unterschiede: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Ausreißer sind mit ° gekennzeichnet.

### 5.2.2.2 Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung

Außerdem konnte ein signifikanter Anstieg von YKL-40 und TIMP-1 bei pädiatrischen CF-Patienten mit eingeschränkter VC (YKL-40) oder eingeschränktem FEV1/VC-Quotienten (TIMP-1) nachgewiesen werden (Abbildung 9).

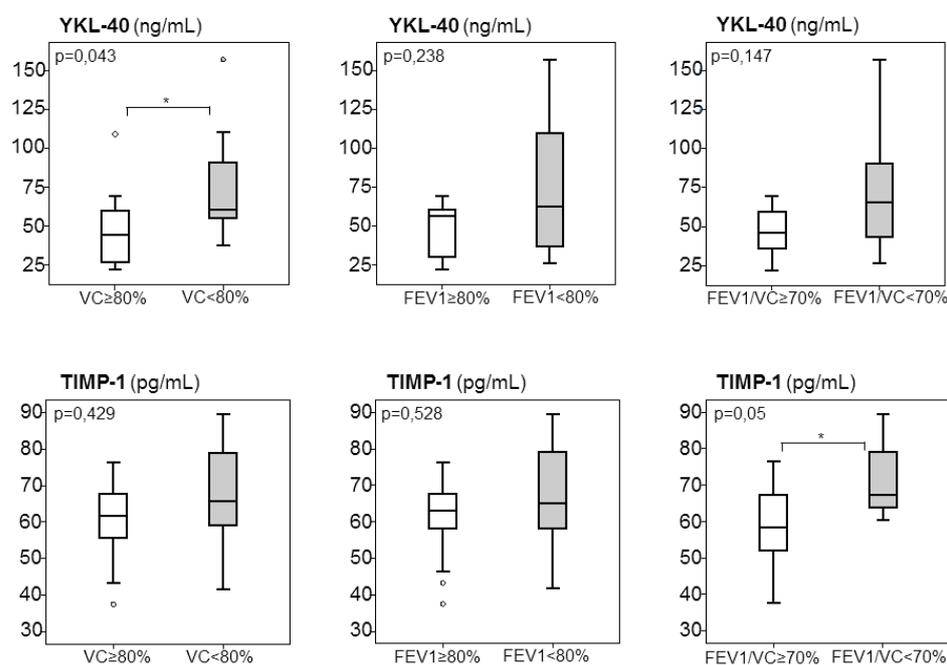


Abbildung 9: Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung

Bei pädiatrischen CF-Patienten mit reduzierter VC zeigten sich signifikant erhöhte YKL-40-Serumkonzentrationen verglichen mit pädiatrischen CF-Patienten mit einer VC von  $\geq 80\%$ . Die TIMP-1-Serumkonzentration zeigte bei pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1/VC-Verhältnis  $< 70\%$  einen Anstieg im Vergleich zu pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1/VC-Verhältnis  $\geq 70\%$ . Bei pädiatrischen CF-Patienten mit einer VC  $\geq 80\%$  betrug der Median der YKL-40-Serumkonzentration 45,17ng/ml und der Median der TIMP-1-Serumkonzentration 61,73ng/ml, wohingegen der Median der YKL-40-Serumkonzentration bei pädiatrischen CF-Patienten mit einer VC  $< 80\%$  60,43ng/ml und die TIMP-1-Serumkonzentration 65,81ng/ml betrug. Bei pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1  $\geq 80\%$  betrug der Median der YKL-40-Serumkonzentration 56,71ng/ml und der Median der TIMP-1-Serumkonzentration 63ng/ml,

wohingegen der Median der YKL-40--Serumkonzentration bei pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1 <80% 62,34ng/ml und der Median der TIMP-1-Serumkonzentration 64,97ng/ml betrug. Die oberen und unteren Kastenbegrenzungen entsprechen der 75. und 25. Perzentile. Die Linie markiert den Median. Die Antennenenden markieren jeweils das Minimum und das Maximum. Die Sternchen kennzeichnen die signifikanten Unterschiede: \*p<0,05, \*\*p<0,01. Ausreißer sind mit ° gekennzeichnet.

### 5.2.2.3 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf FEV1, VC und FEV1/VC

Analog zu den Beobachtungen im Erwachsenenkollektiv, zeigte die Serumkonzentration von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, HA und PIIP keine signifikanten Unterschiede zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1 (Tabelle 9) oder VC (Tabelle 10) <80% und ≥80% oder einem FEV1/VC-Quotienten (Tabelle 11) <70% und ≥70%.

Tabelle 9: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf FEV1

	FEV1≥80%	FEV1<80%	Signifikanz
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	1163±816	1493±1114	p =0,628
Median (Bandbreite)	810 (240-3460)	985 (350-3430)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	19,7±4,5	16,2±3,3	p =0,057
Median (Bandbreite)	19,4 (12,6-28,3)	15 (13,3-23,1)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	82,1±56,9	48,2±28,3	p =0,157
Median (Bandbreite)	70,8 (22,7-248,6)	44,7 (11,9-84)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	138,7±21,4	139,2±35,2	p =0,842
Median (Bandbreite)	137,3 (94,7-170,7)	137,5 (100,4-210)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	20,4±12,5	21,3±14,8	p =0,932
Median (Bandbreite)	22,3 (0-42,8)	15,7 (3,4-45,1)	
<b>PIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	6,7±7,5	8,8±7,6	p =0,153
Median (Bandbreite)	2,9 (0-24,9)	5 (3,2-22,9)	

Die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIP) wiesen keinen Unterschied zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit einer FEV1 <80% und ≥80% auf.

Tabelle 10: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf VC

	VC≥80%	VC<80%	Signifikanz
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	1150±790	1463±1141	p =0,683
Median (Bandbreite)	805 (240-3460)	990 (350-3430)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	19,2±4,9	16,6±2,2	p =0,238
Median (Bandbreite)	19,4 (12,6-28,3)	16,3 (13,3-19,4)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	73,8±56,2	57,5±43,9	p =0,495
Median (Bandbreite)	64,2 (0-248,6)	43,7 (11,9-139,4)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	140,4±29	131±18,1	p =0,531
Median (Bandbreite)	143,6 (94,7-210)	134,5 (100,4-158,2)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	21,6±13,2	18,3±12,2	p =0,429
Median (Bandbreite)	23,3 (0-42,8)	13,2 (9,2-45,1)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	13,2±31,3	10,3±8,6	p =0,090
Median (Bandbreite)	3,2 (0-136,1)	5,9 (3,6-24,9)	

Die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, -13, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) wiesen keinen Unterschied zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit einer VC <80% und ≥80% auf.

Tabelle 11: Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf FEV1/VC

	FEV1/VC≥70%	FEV1/VC<70%	Signifikanz
<b>MMP-1 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	1095±798	1657±1094	p =0,188
Median (Bandbreite)	800 (240-3460)	990 (350-3430)	
<b>MMP-2 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	19,2±4,7	16,3±2,7	p =0,188
Median (Bandbreite)	19 (12,6-28,3)	16,4 (13,3-20,7)	
<b>MMP-13 (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	80,3±56,2	37,7±21,1	p =0,035
Median (Bandbreite)	72,7 (0-248,6)	37,3 (11,9-76,4)	
<b>TIMP-2 (pg/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	140,3±26,1	130,2±26,8	p =0,572
Median (Bandbreite)	137,3 (94,7-210)	120 (100,4-170,7)	
<b>HA (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	18±12,5	27,6±11,5	p =0,073
Median (Bandbreite)	15 (0-42,8)	26,8 (13,4-45,1)	
<b>PIIIP (ng/ml)</b>			
Mittelwert ±SD	13,4±30,4	9,3±9,1	p =0,651
Median (Bandbreite)	4,2 (0-136,1)	4,7 (2,5-22,9)	

Die Serumkonzentrationen von MMP-1, -2, TIMP-2, Hyaluronsäure (HA) und Procollagen-III-Peptid (PIIIP) wiesen keinen Unterschied zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit einer FEV1/VC <70% und ≥70% auf. Bei pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1/VC-Verhältnis ≥70%, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration von MMP-13 verglichen mit pädiatrischen CF-Patienten mit einem FEV1/VC-Verhältnis von <70%.

#### 5.2.2.4 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten ohne und mit CFLD

Im Hinblick auf Unterschiede zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit CFLD und pädiatrischen CF-Patienten ohne CFLD wurden bei den analysierten Laborparametern keine signifikanten Abweichungen gefunden (Tabelle 3). Wie bereits gezeigt, wiesen die Serumkonzentrationen von YKL-40, MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, HA und PIIIP bei pädiatrischen CF-Patienten mit CFLD und pädiatrischen CF-Patienten ohne CFLD keine signifikanten Unterschiede auf (Tabelle 8).

#### 5.2.2.5 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten ohne und mit PI

Im Hinblick auf die Pankreasfunktion zeigte sich, dass 24 der untersuchten pädiatrischen CF-Patienten pankreasinsuffizient und lediglich zwei der pädiatrischen CF-Patienten pankreassuffizient waren. Es konnte gezeigt werden, dass keiner der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Serummarker zwischen pädiatrischen CF-Patienten mit PI und pädiatrischen Patienten ohne PI unterscheidet.

Diese Ergebnisse sind Indikatoren dafür, dass der Anstieg der Serumkonzentrationen von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 mit einer reduzierten Lungenfunktion bei pädiatrischen CF-Patienten zusammenhängt und dass dieser Zusammenhang spezifisch für die Lungenbeteiligung bei CF ist und nicht durch die CFLD oder die PI beeinflusst wird.

#### 5.2.2.6 Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF Patienten mit pulmonaler Exazerbation

Um die Anstiege der Serumkonzentrationen von MMP-8, -9, YKL-40 und TIMP-1 bei CF-Patienten mit Lungenbeteiligung weiter zu belegen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass CF-Patienten mit einer PEx im Rahmen der akuten Verschlechterung der respiratorischen Funktion einen Anstieg der zuvor genannten Serummarker aufweisen. Die Unterteilung der CF-Patienten in CF-Patienten mit PEx und CF-Patienten ohne PEx erfolgte mit Hilfe des Rosenfeld-Scores [Rosenfeld 2001].

Von den 54 erwachsenen CF-Patienten litten zum Zeitpunkt der Analyse 16 Patienten (29,1%) an einer PEx. Die Lungenfunktion derer, die zum Untersuchungszeitpunkt an einer PEx litten, war signifikant verschlechtert im Vergleich zu den CF-Patienten ohne klinische Zeichen einer PEx. In den Analysen zeigte sich eine erhöhte Serumkonzentration von YKL-40, MMP-8, MMP-9 und TIMP-1 bei erwachsenen CF-Patienten mit PEx im Vergleich zu erwachsenen CF-Patienten ohne klinische Zeichen einer PEx (Abbildung 10).

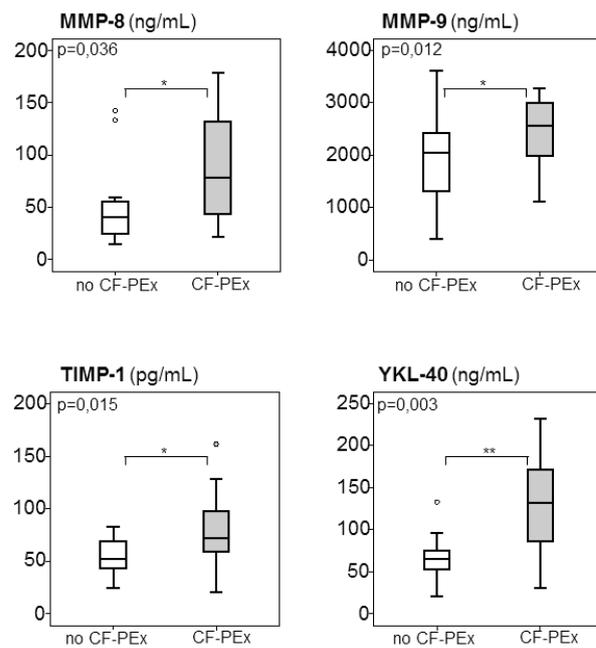


Abbildung 10: Serumkonzentration von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 bei adulten CF Patienten mit pulmonaler Exazerbation

Die YKL-40-Serumkonzentration zeigte bei adulten CF-Patienten mit PEx (131,62ng/ml) eine sehr signifikante Erhöhung im Vergleich zu adulten CF-Patienten ohne PEx (65,72ng/ml). Außerdem zeigten sich signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von MMP-8 (77,9ng/ml), MMP-9 (2560ng/ml) und TIMP-1 (72,18ng/ml) bei adulten CF-Patienten mit PEx im Vergleich zu den Serumkonzentrationen von MMP-8 (40,27ng/ml), MMP-9 (2040ng/ml) und TIMP-1 (52,23ng/ml) bei adulten Patienten ohne PEx. Die oberen und unteren Kastenbegrenzungen entsprechen der 75. und 25. Perzentile. Die Linie markiert den Median. Die Antennenenden markieren jeweils das Minimum und das Maximum. Die Sternchen kennzeichnen die signifikanten Unterschiede: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Ausreißer sind mit ° gekennzeichnet.

Die anderen analysierten Serummarker (MMP-1, MMP-2, MMP-13, TIMP-2, HA, PIIP) wiesen keine Unterschiede zwischen CF-Patienten mit PEx und CF-Patienten ohne PEx auf. Dies lässt vermuten, dass die untersuchten Serummarker für Matrixumbau und Neutrophile bei CF-Patienten mit PEx und reduzierter Lungenfunktion nicht generell hochreguliert sind, sondern der Anstieg der Marker je nach Ausprägung des Schweregrads variiert.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass erwachsene und pädiatrische CF-Patienten mit mittlerer bis schwerer Lungenerkrankung erhöhte Serumkonzentrationen der Serummarker MMP-8, MMP-9 und YKL-40 aufwiesen und dass die erhöhten Serumkonzentrationen dieser Biomarker nicht durch eine CFLD oder eine PI beeinflusst wurden.

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Befunde erhoben:

- MMP-8, MMP-9 und YKL-40 können als Serummarker für Matrixumbau und neutrophile Granulozyten zur Detektion der CF-Lungenbeteiligung und der PEx angesehen werden
- Die Serumkonzentrationsanstiege von MMP-8, MMP-9 und YKL-40 korrelieren nicht mit dem Vorliegen einer CFLD oder PI

### 6.1 Diagnostik der CF-Lungenbeteiligung

Der häufigste Grund für CF-assoziierte Mortalität ist die progressive Verschlechterung der Lungenfunktion von CF-Patienten [Kerem 1992, Corey 1996, Corey 1997, Stern 2008]. Die CF-Lungenbeteiligung ist durch vermehrte bakterielle bronchopulmonale Besiedelung und sich wiederholende Phasen neutrophiler Inflammation und anschließender Destruktion von pulmonalem Gewebe gekennzeichnet [Hartl 2007]. Die CF-Lungenbeteiligung und wiederkehrende Episoden pulmonaler Exazerbation stellen wichtige limitierende Parameter im klinischen Alltag der CF-Patienten dar.

#### Lungenfunktionsuntersuchung

Überraschenderweise gibt es außer der Lungenfunktionsdiagnostik wenige nicht-invasive Möglichkeiten zur adäquaten und routinemäßigen Diagnostik, dem Monitoring und zu der Langzeitbeobachtung der Lungenbeteiligung von CF-Patienten. Als Surrogatmarker der CF-Lungenerkrankung werden folgende Parameter verwendet: FEV<sub>1</sub>, VC und der FEV<sub>1</sub>/VC-Quotient. Diese Parameter gehören zu den im klinischen Alltag etablierten Indikatoren für die CF-Lungenerkrankung [Flume 2007, Ramsey 1994, Kerem 2005, Gault 2002] und wurden daher in der vorliegenden Arbeit zur Detektion der CF-Lungenbeteiligung genutzt.

#### Innovative Aspekte der Diagnostik der CF-Lungenbeteiligung

Bisher sind einige experimentelle Biomarker, unter anderem inflammatorische Zytokine, Akut-Phase-Proteine und Marker des oxidativen Stresses im Zusammenhang mit der Diagnosestellung der CF-Lungenbeteiligung und der pulmonalen Exazerbation untersucht worden [Shoki 2013].

## Fibrosemarker zur Diagnostik der CF-Lungenbeteiligung

In den vergangenen Jahren wurden Biomarker für den Umbau von EZM beziehungsweise für die fibrotische Aktivität von Gewebe und für die Ablagerung von EZM beziehungsweise für die Diagnostik des Fibrosierungsgrads untersucht.

### Neutrophilenelastase

Unter den untersuchten Markern wurde besonders die Neutrophilenelastase des Sputums als vielversprechender Marker identifiziert. Die Neutrophilenelastase korreliert mit sinkender Lungenfunktion und pulmonaler Inflammation bei CF-Patienten [Sagel 2012, Mayer-Hamblett 2007, Doring 1994]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Neutrophilenelastase immunologische Effekte der Lunge, wie die Aktivierung von IL-8 [Walsh 2001] und die Proliferation von MMP-9 [Jackson 2010] verstärkt. Im Rahmen des Akuten Respiratorischen Distress Syndroms (ARDS) gilt die Messung der Konzentration der Neutrophilenelastase im Serum als vielversprechender Marker [Zhu 2017]. Bei der Entstehung der Inflammation und des Emphysems bei COPD konnte gezeigt werden, dass die Neutrophilenelastase bei dem Umbau von Kollagen-Typ-IV und der Abbau von Elastin eine wesentliche Rolle spielt [Bihlet 2017]. Die Konzentration der Neutrophilenelastase im Sputum kann als Biomarker für das Krankheitsstadium und das zukünftige Risiko bei erwachsenen Patienten mit Bronchiektasen genutzt werden [Chalmers 2016].

### MMPs

Die Familie der MMPs umfasst 23 charakterisierte humane Vertreter, welche das Potenzial haben, nahezu alle Bestandteile der EZM zu zersetzen. Zusammen mit ihren spezifischen Inhibitoren, den TIMPs, bilden sie den Hauptbestandteil der am Umbau und der Homöostase der EZM beteiligten Mediatoren. Studien haben gezeigt, dass die Herabsetzung der MMP-Aktivität zu einem erhöhten EZM-Umbau, zu einer erhöhten Reparaturrate mit Narbenbildung und zu einer Akkumulation der EZM mit anschließender Gewebsfibrose bei chronischer Lungenerkrankung führt [Elkington 2006, Gueders 2006, Parks 2001]. Daraus kann geschlossen werden, dass MMPs eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Lungengewebeumbaus auch im Zusammenhang mit der CF spielen. Diesbezüglich haben mehrere Studien zeigen können, dass erhöhte MMP-Konzentrationen in der bei einer bronchoalveolären-Lavage (BAL) gewonnenen Flüssigkeit oder im Sputum von CF-Patienten [Sagel 2005, Ratjen 2002, Hilliard 2007, Gaggar 2007] mit sinkender Lungenfunktion und Atemwegsinfektionen im Rahmen der CF assoziiert sind. In diesem Zusammenhang ist

vor allem MMP-9 zu nennen [Sagel 2005, Ratjen 2002, Jackson 2010]. Des Weiteren konnte durch Sputumanalysen bereits gezeigt werden, dass MMP-8 und MMP-9 eine wichtige ätiologische Rolle bei der Entstehung einer pulmonalen Inflammation im Rahmen der CF spielen [Perez 2008, Gaggar 2008]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) Agonisten die Inflammationsantwort in CF-Zelllinien und bei CF-Mäusen, zumindest in dem Teil der Abschwächung von NF- $\kappa$ B-gesteuerten Prozessen, wie der MMP-9-Produktion, inhibieren können [Perez 2008]. Gaggar et al fanden heraus, dass MMP-8 und MMP-9 in der Produktion eines starken, von der EZM-abstammenden neutrophilen Chemokinlockmittels involviert sind und deshalb potenziell an dem Neutrophileneinstrom und der damit verbundenen Atemwegsdestruktion bei CF-Patienten beteiligt sind [Gaggar 2008]. Den bereits publizierten Studien liegen Sputumanalysen von CF-Patienten zugrunde. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sowohl MMP-8 als auch MMP-9 im Serum von CF-Patienten mit CF-Lungenerkrankung erhöht sind. Die Resultate zeigen weiterhin, dass sich die bereits beobachtete erhöhte MMP-Produktion im Bronchialsystem der CF-Patienten [Sagel 2005, Ratjen 2002, Hilliard 2007, Gaggar 2007] im Serum dieser Patienten widerspiegelt. Vorteile der Serummarkeranalysen liegen in der einfachen Durchführbarkeit der Probegewinnung. Die Analysen der Serummarker können parallel zu den routinemäßig durchgeführten Blutentnahmen erfolgen, sodass auf eine zusätzliche Invasivität verzichtet werden kann. Dies trägt zur Praktikabilität im klinischen Alltag bei, da keine gesonderten Untersuchungen durchgeführt werden müssen. Daher eignet sich dieses Vorgehen besonders bei Kindern. Außerdem könnten sich Serummarker bereits zur Frühdiagnostik eignen. Bei der Untersuchung von mittels Bronchiallavage gewonnenem Material, muss eine Bronchoskopie erfolgen. Dieses invasive Vorgehen ist im Vergleich zur Analyse von Serummarkern sehr zeitaufwändig, risikoreich und nicht in allen Zentren durchführbar. Ein weiterer Nachteil der Analyse von Markern der Bronchiallavage ist die Organspezifität. Serummarker hingegen sind systemische Marker, die Schäden an unterschiedlichen Organsystemen detektieren können. Diese Sachverhalte unterstreichen die Rolle der MMPs als nicht-invasive, neue Serumbiomarker in der Diagnostik der CF-Lungenerkrankung.

YKL-40

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von YKL-40 bei Erwachsenen und Kindern mit CF-Lungenerkrankung beobachtet. Eine bereits publizierte Studie zeigte, dass die YKL-40-Konzentrationen im Sputum und

Serum von CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen erhöht sind [Hector 2011]. Sowohl bei CF-Patienten als auch bei  $\beta$ ENaC-Tg Mäusen korrelieren die Atemwegskonzentrationen von YKL-40 und das dazugehörige Mausanalogen Breast regression protein-39 (BRP-39) mit der Schwere der pulmonalen Obstruktion [Hector 2011]. Bei  $\beta$ ENaC-Tg Mäusen handelt es sich um ein Mäusemodell, welches die CF-Lungenerkrankung simuliert [Mall 2004, Zhou 2011]. Das Atemwegsepithel dieser Mäuse ist charakterisiert durch eine Überexpression von Natriumkanälen (ENaC), wodurch es zu verstärkter Mukusansammlung, Obstruktion, chronischer neutrophiler Inflammation, Lungenfibrose und letztlich zu erhöhter Sterblichkeit kommt [Gehring 2014].

Neben der Bedeutung im Zusammenhang mit CF konnte gezeigt werden, dass das YKL-40-Serumlevel bei Patienten mit schwerem Asthma [Chupp 2007] und COPD signifikant erhöht ist [Letuve 2008]. Diese beiden Erkrankungen sind ebenso wie die CF durch neutrophile Inflammation gekennzeichnet. Asthma und COPD verursachen im Vergleich zur CF allerdings keine Lungenfibrose, sondern Lungenemphyseme.

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Serumkonzentrationsanstieg von YKL-40 bei CF-Patienten mit Lungenbeteiligung als Serummarker für Matrixumbau und Neutrophile fungiert.

#### MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 bei CF-Patienten mit Lungenbeteiligung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Serumexpression von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 bei erwachsenen und pädiatrischen Patienten mit mittlerer bis schwerer CF-Lungenerkrankung im Vergleich zu CF-Patienten ohne relevante Lungenfunktionseinschränkung oder leichter CF-Lungenbeteiligung signifikant erhöht ist. Wichtig ist, dass die Serumkonzentration dieser Marker nicht von dem Vorhandensein oder der Abwesenheit einer Leber- oder Pankreasbeteiligung beeinflusst wird. Dieser Sachverhalt wurde in Subanalysen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie nachgewiesen. Aus diesem Grund kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die vorhergenannten Marker spezifisch für die CF-Lungenerkrankung sind. Demzufolge können MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 als neue nicht-invasive Serumbiomarker der CF-Lungenerkrankungen fungieren.

#### MMP-8, MMP-9 und YKL-40 bei CF-Patienten mit PEx

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu verifizieren, wurden die Konzentrationen von MMP-8, MMP-9 und YKL-40 bei erwachsenen CF-Patienten, die zum Zeitpunkt der Analyse unter einer PEx litten, analysiert. In dieser Sub-Kohorte wurde gezeigt, dass die

PEX-Patienten im Vergleich zu CF-Patienten ohne klinische Zeichen einer pulmonalen Exazerbation höhere MMP-8-, MMP-9- und YKL-40-Serumkonzentrationen aufwiesen. Diese Resultate könnten weitreichende Folgen haben. Bislang existiert keine standardisierte Definition der PEX [Ramsey 1994, Dakin 2001]. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass Routineserummarker, welche zum einen das Vorhandensein und zum anderen die Ausprägung einer pulmonalen Exazerbation zuverlässig detektieren, im klinischen Alltag benötigt werden. Dies ist besonders für eine frühe Diagnosestellung essentiell. Denn nur durch frühe Diagnosestellung, kann eine frühe Therapie eingeleitet werden und somit das Outcome und die Langzeitprognose der Patienten verbessert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass MMP-8, MMP-9 und YKL-40 als neue Serummarker die Diagnosestellung einer PEX erleichtern könnten. Diese Hypothese stützend, konnte bereits bei COPD-Patienten gezeigt werden, dass die Serumkonzentrationen von MMP-8, MMP-9 und Neutrophileneelastase höher sind als deren Konzentration im Atemkondensat [Sng 2016], wodurch die Relevanz der Serumanalyse verdeutlicht wird. Des Weiteren weist die YKL-40-Serumkonzentration auch bei COPD-Patienten erhöhte Werte auf und korreliert mit Phasen der Exazerbation [Lai 2016].

#### Reservoir der Serummarker

Die Antwort auf die Frage nach den Zelltypen, die für die Erhöhung von MMP und YKL-40 verantwortlich sind, lässt sich ebenfalls aus der vorliegenden Arbeit ableiten. Obwohl die untersuchten MMPs und YKL-40 nicht bestimmten Zelltypen zugeordnet wurden, kann angenommen werden, dass die beobachtete Serumkonzentrations-erhöhung der MMPs und YKL-40 im Rahmen der PEX das Ausmaß der neutrophilen Atemwegsinflammation widerspiegelt. Diese Annahme wird durch folgenden Sachverhalt unterstützt: Neutrophile repräsentieren eine Hauptquelle der MMP-Produktion, besonders der Produktion von MMP-8 und MMP-9. YKL-40 wird ebenfalls in den sekretorischen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert [Hartl 2007]. Weiterführende Studien, die die Serummarkerkonzentration im Sputum und im Serum im Hinblick auf die Identifikation der Hauptzellquellen dieser Marker beurteilen, sind nötig um deren Herkunft genauer beschreiben zu können. Denkbar wären zum Beispiel Studien, die die Korrelation von histologischen Lungenbefunden mit der Höhe der Serummarker analysieren. Hierbei wären auch immunohistochemische Untersuchungen an Lungenproben möglich. Allerdings setzt dieses Vorgehen invasive und risikoreiche Lungenbiopsien voraus. Eine weniger invasive Möglichkeit wäre die Untersuchung von Zellen des Bronchialsekrets. Diese könnte beispielsweise mittels Immunohistochemie

erfolgen. Prinzipiell sind Untersuchungen an größeren Kollektiven zur Überprüfung der klinischen Praktikabilität und der Kosteneffizienz nötig, um experimentelle Serummarker im klinischen Alltag etablieren zu können.

## 6.2 Volkswirtschaftliche Bedeutung einer schnellen und einfachen Diagnostik

Der Einsatz von schneller und einfacher Diagnostik ist nicht nur für Patienten von erheblichem Vorteil. Aus volkswirtschaftlicher Sicht lassen sich ebenfalls Vorteile erkennen, da durch den Einsatz von Serummarkern als diagnostisches Mittel Kosten reduziert werden können. Die Serummarkeranalyse setzt eine einfache Blutentnahme voraus und kann daher in jeder noch so kleinen Arztpraxis erfolgen. Hierdurch wird ein engeres, flächendeckendes Monitoring und daraus resultierend eine schnellere Zuweisung in Spezialambulanzen bei Anstieg der Serummarker möglich. Dies führt zu einer Reduktion der Krankenhausaufenthalte, da ein frühzeitiger Therapiebeginn möglich wird [Coffey 2017]. Serummarker sind im Gegensatz zu der Untersuchung der Lungenfunktion nicht von der Mitarbeit der Patienten abhängig [Fauci 2009] und somit gerade in der Pädiatrie eine sichere Methode zur Diagnostik.

## 6.3 Limitationen der Studie

Obwohl es sich bei der untersuchten Studienpopulation um eine relativ große und gut untersuchte Gruppe handelt, müssen einige Limitationen diskutiert werden.

Es ist nicht möglich eine erhöhte Serummarkerkonzentration direkt mit Lungengewebe als Ursprung dieser Biomarker in Verbindung zu bringen, da ein Zusammenhang zwischen Mitgliedern der MMP-Familie und YKL-40 auch bei anderen Systemerkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder einigen kardiovaskulären Erkrankungen, beobachtet wurde [Ma 2014, Lewandowski 2011, Lee 2012, Kadoglou 2014, Harutyunyan 2013]. Es wurde gezeigt, dass Mitglieder der MMP-Familie und YKL-40 in den Atemwegen der CF-Patienten in erhöhtem Maße vorliegen [Gaggar 2011, Sagel 2005, Ratjen 2002, Hilliard 2007, Gaggar 2007, Hector 2011, Fantino 2014]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass der beobachtete Serumkonzentrationsanstieg von MMP-8, MMP-9 und YKL-40 bei CF-Patienten mit Lungenbeteiligung nicht mit anderen CF-Organschäden, wie der CFLD oder der PI, korreliert. Vor diesem Hintergrund kann davon ausgegangen werden, dass sich der beobachtete Konzentrationsanstieg auf die Freisetzung aus dem Atemwegstrakt zurückzuführen lässt. Beweisen lässt sich dieser Sachverhalt allerdings durch die bloßen Analysen von Serum nicht.

Eine mögliche Einschränkung der Studie stellt die geringe Anzahl der Patienten ohne PI dar. Dieses Problem resultiert daraus, dass 80 bis 90% aller CF-Patienten pankreasinsuffizient sind [Durno 2002, Dray 2003] und die Manifestation der PI bereits in den frühen Lebensjahren der Patienten auftritt [Durno 2002]. Daher ist es recht schwierig eine große Anzahl von CF-Patienten ohne PI zu rekrutieren. Diese Fakten spiegeln sich auch in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiv wider. Die Ergebnisse der Subgruppenanalyse der Serummarkerkonzentrationen im Hinblick auf das Vorliegen einer PI, die die vorliegende Arbeit zeigt, unterstreichen die Annahme, dass der Anstieg von Serummarkern für Matrixumbau und Neutrophile bei CF-Patienten mit abnehmender Lungenfunktion, jedoch nicht mit der Existenz einer CFLD oder PI korreliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Serummarker für Matrixumbau und Neutrophile mit Ergebnissen der Lungenfunktionsuntersuchung verglichen. Sicherlich wäre es denkbar, diese Serummarker mit histologischen Befunden zu korrelieren. Hierzu wäre allerdings die Durchführung von invasiven und risikoreichen Lungenbiopsien notwendig.

Außerdem muss bedacht werden, dass die Ergebnisse der Lungenfunktionsuntersuchung von der Patientenmitarbeit beeinflusst werden können. Da es sich um zahlreiche Lungenfunktionsuntersuchungen handelt, die Patienten in der Regel hochmotiviert und das Personal am Universitätsklinikum Gießen in der Durchführung exzellent geschult ist, sollten Fehlbestimmungen relativ selten sein.

#### 6.4 Ausblick

In Zukunft sollte versucht werden, die Diagnostik der CF assoziierten Lungenbeteiligung von invasiver hin zu nicht invasiver Diagnostik zu entwickeln. Patientensicherheit, einfache Durchführbarkeit und hohe diagnostische Genauigkeit stellen entscheidende Parameter in der Entwicklung neuer diagnostischer Instrumente dar. Serummarkern für Matrixumbau und Neutrophile sollten auch in Zukunft ein hohes wissenschaftliches Interesse zukommen, da diese eine nicht invasive und schnelle Methode zur Diagnostik einer Lungenbeteiligung darstellen.

Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil der Patienten, die an einer CF-assoziierten Lungenbeteiligung leiden. Daher sollte in Zukunft der Schwerpunkt der Diagnostik auf der Etablierung von Markern für Matrixumbau und Neutrophile liegen, die bereits bei pädiatrischen Patienten nachweisbar sind.

Neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Markern, könnten Studien die weitere Marker für Matrixumbau und Neutrophile untersuchen sinnvoll sein. Auch Kombinationen von Markern und anderen diagnostischen Methoden sollten untersucht werden um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen. Des Weiteren wären Studien sinnvoll, die zusätzliche Einflussfaktoren untersuchen, die die Expression von Serummarkern beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 80 CF-Patienten untersucht. Trotz der relativ großen Zahl wären Multizenterstudien an größeren Kollektiven sinnvoll die über längere Zeiträume prospektiv hin untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung

Die im Rahmen der zystischen Fibrose auftretende Lungenerkrankung ist eine der Hauptursachen der mit dieser Erkrankung assoziierten Morbidität und Mortalität. Charakteristisch für die Lungenerkrankung bei zystischer Fibrose ist eine Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter ( $FEV_1 < 80\%$ ,  $VC < 80\%$ ,  $FEV_1/VC < 70\%$ ). Neben der Lungenfunktionsuntersuchung gibt es bislang keine verlässlichen Biomarker zur Detektion der zystisch Fibrose-assoziierten Lungenerkrankung und dem Auftreten einer pulmonalen Exazerbation. Ziel unserer Untersuchungen war die Identifikation neuer experimenteller Biomarker für die Detektion der zystischen Fibrose-assoziierten-Lungenerkrankung und deren Exazerbation.

Untersucht wurden 54 adulte und 26 pädiatrische Patienten einer universitären Spezialambulanz. Im Serum der untersuchten Patienten wurde die Konzentration von MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, YKL-40, Hyaluronsäure und Prokollagen III Peptid mittels ELISA gemessen. Die Diagnose der zystischen Fibrose-assoziierten Lungenerkrankung wurde mittels Lungenfunktionsuntersuchung gestellt. Die Definition der pulmonalen Exazerbation erfolgt mit Hilfe eines klinischen Scores, der 2001 von Rosenfeld eingeführt wurde.

Erwachsene und Kinder mit mittlerer bis schwerer Lungenbeteiligung wiesen signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 auf. Die Serumkonzentrationen von MMP-8 ( $p=0,036$ ), MMP-9 ( $p=0,012$ ) und YKL-40 ( $p=0,003$ ) bei erwachsenen Patienten, die unter einer pulmonalen Exazerbation litten, waren signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten ohne klinische Zeichen einer pulmonalen Exazerbation. Die Serumkonzentrationen von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 wurden durch das Vorkommen einer zystischen Fibrose-assoziierten Lebererkrankung oder einer Pankreasinsuffizienz nicht beeinflusst.

MMP-8, MMP-9 und YKL-40 können als neue nicht-invasive Biomarker zur einfachen serumassoziierten Detektion einer zystisch Fibrose-assoziierten Lungenerkrankung sowie deren pulmonaler Exazerbation dienen.

## 8. Summary

Cystic Fibrosis lung disease is characterized by progressively declining lung function (FEV1 <80%, VC <80%, FEV1/VC <70%) and represents a major factor contributing to the high morbidity and mortality associated with cystic fibrosis. However, apart from spirometry, respiratory disease surrogate markers reliably indicating cystic fibrosis lung disease and the occurrence of pulmonary exacerbations are still lacking. The aim of our study was to identify novel experimental biomarkers for the detection of cystic fibrosis lung disease and its exacerbation.

54 adult and 26 pediatric cystic fibrosis patients were included in the study and serum concentrations of MMP-1, -2, -8, -9, -13, TIMP-1, TIMP-2, YKL-40, hyaluronic acid and procollagen III peptide were quantified by ELISA. CF lung disease was diagnosed by lung function test. Pulmonary exacerbation was defined based on a clinical scoring established by Rosenfeld in 2001.

Adults and children with moderate to severe cystic fibrosis lung disease exhibited significantly increased serum expression of MMP-8, MMP-9, YKL-40 and TIMP-1. Further, MMP-8 ( $p=0,036$ ), MMP-9 ( $p=0,012$ ) and YKL-40 ( $p=0,003$ ) were significantly increased in adult cystic fibrosis patients suffering from pulmonary exacerbation compared to those without clinical signs of respiratory exacerbation. MMP-8, MMP-9, YKL-40 and TIMP-1 serum levels were unaffected by the presence or absence of cystic fibrosis liver disease or pancreatic insufficiency.

MMP-8, MMP-9 and YKL-40 might serve as novel non-invasive serum-associated biomarkers of cystic fibrosis lung disease and pulmonary exacerbation.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC-Transporter	ATP-binding cassette transporter
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	Activator-Protein-1
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body-Mass-Index
BRP-39	Breast regression protein-39
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose, Mukoviszidose
CFLD	Cystic Fibrosis Liver Disease
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
CNS	Chrispin-Norman-Score
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reatives Protein
dl	Deziliter
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Phenylalanin

FEV1	Einsekundenkapazität, forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
G	Giga
g	Gramm
Gly	Glycin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Hyaluronsäure, hyaluronic acid
ICM	Interstinale Kurzschlussstrommessung
IL	Interleukin
IRT	Immunreaktives Trypsin
J	Jahre
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lys	Lysin
mg	Miligramm
ml	Mililiter
mmol	Milimol
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
Na <sup>+</sup>	Natrium
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NFκB	Nuklear-Factor-KappaB
ng	Nanogramm
NPD	Nasale Potentialdifferenzmessung
PAP	Pankreatitis-assoziiertes-Protein
PEx	Pulmonale Exazerbation
pg	Picogramm

PI	Pankreasinsuffizienz
PIIIP	Prokollagen III Peptid
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor
R-Domäne	Regulatorische Domäne
RV	Residualvolumen
s	Sekunde
SAF-1	Serum-Amyloid-A-Activating-Factor
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TGF- $\beta$	Transforming growth factor
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
U.S.	United States
ULN	Upper Limit of Normal
V	Volumen
VC	Vitalkapazität
YKL-40	Chitinase-3-like-protein-1
$\gamma$ GT	Gamma-Glutamyltransferase

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Autosomal-rezessiver Erbgang .....	9
Abbildung 2: Der schematische Aufbau eines CFTR-Kanals .....	10
Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Schweißdrüse. ....	11
Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Bronchialdrüse. ....	12
Abbildung 5: Algorithmus bei klinischem Verdacht auf CF .....	16
Abbildung 6: Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei adulten CF- Patienten mit Lungenbeteiligung .....	38
Abbildung 7: Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei adulten CF- Patienten mit Lungenbeteiligung .....	39
Abbildung 8: Serumkonzentration von MMP-8 und MMP-9 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung .....	48
Abbildung 9: Serumkonzentration von YKL-40 und TIMP-1 bei pädiatrischen CF Patienten mit Lungenbeteiligung .....	49
Abbildung 10: Serumkonzentration von MMP-8, MMP-9, YKL-40 und TIMP-1 bei adulten CF Patienten mit pulmonaler Exazerbation .....	54

## 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Shwachman-Score: Schema einer klinischen Befundauswertung....	26
Tabelle 2:	Demographische und klinische Daten der adulten CF-Patientenkohorte .....	33
Tabelle 3:	Demographische und klinische Daten der pädiatrischen CF-Patientenkohorte .....	35
Tabelle 4:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf FEV141	
Tabelle 5:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf VC ..	42
Tabelle 6:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten in Bezug auf FEV1/VC .....	43
Tabelle 7:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei adulten CF-Patienten ohne (n =22) und mit (n =32) CFLD .....	45
Tabelle 8:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten ohne (n =16) und mit (n =10) CFLD.....	46
Tabelle 9:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf FEV1 .....	50
Tabelle 10:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf VC .....	51
Tabelle 11:	Serumkonzentration von experimentellen Matrix- und Neutrophilenmarkern bei pädiatrischen CF-Patienten in Bezug auf FEV1/VC .....	52

## 12. Literaturverzeichnis

1. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J, Stone AJ, Olson ER, Ordoñez CL, Campbell PW, Ashlock MA, Ramsey BW (2010): Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. In: *N Engl J Med* 363 (21), S. 1991-2003.
2. Andersen DH (1938): Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. In: *Am J Dis Child* 56 (2), S. 344-399.
3. Ayad S, Boot-Hanford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA (1998): The Extracellular Matrix (Facts Book). Academic Press, S. 3 ff.
4. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Accurso F, Wilson JM (2001): Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 25 (1), S. 21-25.
5. Bals R, Weiner DJ, Wilson JM (1999): The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. In: *J clin Invest* 103 (3), S. 303-307.
6. Baraniuk IN, Shizari T, Sabol M, Ali M, Underhill CB (1996): Hyaluronan is exocytosed from serous, but not mucous cells, of human nasal and tracheobronchial submucosal glands. In: *J. Investig. Med* 44 (2), S. 47-52.
7. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ (1975): Collagenase production by human skin fibroblasts. In: *Biochem Biophys Res Commun* 64 (1), S. 232-240.
8. Berres ML, Papen S, Pauels K, Schmitz P, Zaldivar MM, Hellerbrand C, Mueller T, Berg T, Weiskirchen R, Trautwein C, Wasmuth HE (2009): A functional variation in CHI3L1 is associated with severity of liver fibrosis and YKL-40 serum levels in chronic hepatitis C infection. In: *J Hepatol* 50 (2), S. 370-376.
9. Bethesda MD (2001): Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 2000 Annual Report. Maryland 2001.
10. Bethesda MD (2014): Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2013 Annual Data Report.
11. Bihlet AR, Karsdal MA, Sand JM, Leeming DJ, Roberts M, White W, Bowler R (2017): Biomarkers of extracellular matrix turnover are associated with emphysema and eosinophilic-bronchitis in COPD. In: *Respir Res* 18 (1), S. 22.

12. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993): Matrix metalloproteinases: A review. In: *Crit Rev Oral Biol Med* 4 (2), S.197-250.
13. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M (1995): Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. In: *Am J Respir Crit Care Med* 152 (6), S. 2111-2118.
14. Boyle MP (2007): Adult cystic fibrosis. In: *JAMA* 298 (15), S. 1787-1793.
15. Boyle MP (2007): Strategies for identifying modifier genes in cystic fibrosis. In: *Proc Am Thorac Soc* 4 (1), S. 52-57.
16. Brinckerhoff CE, Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinases: A tail of a frog that became a prince. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (3), S. 207-214.
17. Campoccia D, Hunt JA, Doherty PJ, Zhong SP, Callegaro L, Benedetti L, Williams DF (1993): Human neutrophil chemokinesis and polarization induced by hyaluronic acid derivatives. In: *Biomaterials* 14 (15), S. 1135-1139.
18. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS (2008): Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. In: *J Cyst Fibros* 7 (3), S. 179-196.
19. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G (2007): The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. In: *Crit Rev Biochem Mol Bio* 42 (3), S. 113-185.
20. Cawston TE, Galloway WA, Mercer E, Murphy G, Reynolds JJ (1981): Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. In: *Biochem J* 195 (1), S. 159-165.
21. Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrie E, Dicker A, Wrobel K, Elborn JS, Walker B, Martin SL, Marshall SE, Huang JT, Fardon TC (2016): Neutrophil Elastase Activity is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis. In: *Am J Respir Crit Care Med*, im Druck.

22. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ and Smith AE (1991): Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. In: *Cell* 66 (5), S. 1027-1036.
23. Chrispin AR, Norman AP (1974): The systematic evaluation of the chest radiograph with cystic fibrosis. In: *Pediatr Radiol* 2 (2), S. 101-105.
24. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA (2007): A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. In: *N Engl J Med* 357 (20), S. 2016-2027.
25. Coffey MJ, Whitaker V, Gentin N, Junek R, Shalhoub C, Nightingale S, Hilton J, Wiley V, Wilcken B, Gaskin KJ, Ooi CY (2017): Differences in Outcomes between Early and Late Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Newborn Screening Era. In: *J Pediatr* 181, S. 137-145.
26. Corey M, Edwards L, Levison H, Knowles M (1997): Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. In: *J Pediatr* 131 (6), S. 809-814.
27. Corey M, Farewell V (1996): Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada, 1970–1989. In: *Am J Epidemiol* 143 (10), S. 1007-1017.
28. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. In: *Science* 295 (5564), S. 2387-2392.
29. Crossley JR, Elliott RB and Smith PA (1979): Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. In: *Lancet* 1 (8114), S. 472-474.
30. Cunningham S, Mccolm JR, Mallinson A, Boyd I, Marshall TG (2003): Duration of effect of intravenous antibiotics on spirometry and sputum cytokines in children with cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 36 (1), S. 43-48.
31. Daheshia M (2005): Therapeutic inhibition of matrix metalloproteinases for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In: *Curr Med Res Opin* 21 (4), S. 587-594.
32. Dakin C, Henry RL, Field P, Morton J (2001): Defining an exacerbation of pulmonary disease in cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 31 (6), S. 436-442.

33. Davis PB (2006): Cystic fibrosis since 1938. In: *Am J Respir Crit Care Med* 173 (5), S. 475-482.
34. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C., Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M (2006): Cystic fibrosis: Terminology and diagnostic algorithms. In: *Thorax* 61 (7), S. 627-635.
35. De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureau P (2001): YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 285 (4), S. 926-931.
36. De Jonge HR, Ballmann M, Veeze H, Bronsveld I, Stanke F, Tummler B, Sinaasappel M (2004): Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. In: *J Cyst Fibros* 3 (2), S. 159-163.
37. Debray D, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C (2011): Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. In: *J Cyst Fibros* 10 (2), S. 29-36.
38. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E (2009): Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders-- updated European recommendations. In: *Eur J Hum Genet* 17 (1), S. 51-65.
39. Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.V. (GfH), Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V (BVDH) (2011): S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung. In: *Med Gen* 23, S. 281-323.
40. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953): Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship to disease. In: *Pediatrics* 12 (5), S. 549-563.
41. Dinwiddie R (2000): Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. In: *Respiration* 67 (1), S. 3-8.
42. Doring G (1994): The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. In: *Am J Respir Crit Care Med* 150, S. 114-117.

43. Dray X, Marteau P, Bienvenu T, Dusser D, Hubert D (2003): Discussion on genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. In: *Gastroenterology* 125 (4), S. 1286.
44. Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui LC, Durie P (2002): Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. In: *Gastroenterology* 123 (6), S. 1857-1864.
45. Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. In: *Nature Rev Cancer* 2 (3), S. 161-174.
46. Elkington PT, Friedland JS (2006): Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. In: *Thorax* 61 (3), S. 259-266.
47. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey BW, Gibson RL (2002): *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 34 (2), S. 91-100.
48. Fantino E, Gangell CL, Hartl D, Sly PD (2014): Airway, but not serum or urinary, levels of YKL-40 reflect inflammation in early cystic fibrosis lung disease. In: *BMC Pulm Med* 14, S. 28.
49. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd (2008): Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. In: *J Pediatr* 153 (2), S. 4-14.
50. Fauci A, Dietel M (2009): *Harrisons Innere Medizin*. 17. Aufl. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag. S. 1951-1959.
51. Ferkol T, Rosenfeld M, Milla CE (2006): Cystic fibrosis pulmonary exacerbations. In: *J Pediatr* 148 (2): S. 259-264.
52. Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG (2001): Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. In: *FASEB J* 15 (12), S. 2230-2240.
53. Feuchtbaum L, Carter J, Dowray, Currier RJ, Lorey F (2012): Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. In: *Genet Med* 14 (11), S. 937-945.
54. Fingleton B (2007): Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. In: *Curr Pharm Des* 13 (3), S. 333-346.

55. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ Jr, Willey-Courand DB, Bujan J, Finder J, Lester M, Quittell L, Rosenblatt R, Vender RL, Hazle L, Sabadosa K, Marshall B; Cystic Fibrosis Foundation, Pulmonary Therapies Committee (2007): Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. In: *Am J Respir Crit Care Med* 176 (10), S. 957-969.
56. Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Naishadham D, Sterling RK, Su GL, Ghosh M, Wright EC; HALT-C Trial Group (2008): Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. In: *Hepatology* 47 (3), S. 789-798.
57. Gaggar A, Hector A, Bratcher PE, Mall MA, Griese M, Hartl D (2011): The role of matrix metalloproteinases in cystic fibrosis lung disease. In: *Eur Respir J* 38 (3), S. 721-727.
58. Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, O'Reilly PJ, McQuaid DB, Rowe SM, Clancy JP, Blalock JE (2008): A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. In: *J Immunol* 180 (8), S. 5662-5669.
59. Gaggar A, Li Y, Weathington N, Winkler M, Kong M, Jackson P, Blalock JE, Clancy JP (2007): Matrix metalloproteinase-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293 (1), S. 96-104.
60. Gault R (2002): Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. In: *Pediatr Phys Ther* 14 (3), S. 157-158.
61. Gavina M, Luciani A, Vilella VR, Esposito S, Ferrari E, Bressani I, Casale A, Bruscia EM, Maiuri L, Raia V (2013): Nebulized hyaluronan ameliorates lung inflammation in cystic fibrosis mice. In: *Pediatr Pulmonol* 48 (8), S. 761-771.
62. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL (1994): Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. In: *Nature* 370 (6490), S. 555-557.

63. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R (1995): Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. In: *J Leukoc Biol* 57 (5), S. 774-777.
64. Gehrig S, Duerr J, Weitnauer M, Wagner CJ, Graeber SY, Schatterny J, Hirtz S, Belaouaj A, Dalpke AH, Schultz C, Mall MA (2014): Lack of neutrophil elastase reduces inflammation, mucus hypersecretion, and emphysema, but not mucus obstruction, in mice with cystic fibrosis-like lung disease. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 189 (9), S. 1082-1092.
65. Gemeinsamer Bundesausschuss (2015): Screening auf Mukoviszidose für Neugeborene beschlossen. Pressemitteilung Nr. 21 / 2015 URL: [https://www.g-ba.de/downloads/34-215-585/21-2015-08-20\\_Ki-RL\\_Mukoviszidose.pdf](https://www.g-ba.de/downloads/34-215-585/21-2015-08-20_Ki-RL_Mukoviszidose.pdf).
66. Gerling B, Becker M, Waldschmidt J, Rehmann M, Schuppan D (1996): Elevated serum aminoterminal procollagen type-III-peptide parallels collagen accumulation in rats with secondary biliary fibrosis. In: *J Hepatol* 25 (1), S. 79-84.
67. Gesetz über genetische Untersuchungen beim Menschen (2009): Gendiagnostikgesetz-GenDG, In: *BGBI I*, S. 2529, 3672.
68. Gibson LE, Cooke RE (1959): A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. In: *Pediatrics* 23 (3), S. 545-549.
69. Gibson LE, di Sant'Agnese PA, Shwachman H (1976): Procedure for the quantitative iontophoretic sweat test for cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation. Report of the committee for a study for evaluation of testing for Cystic Fibrosis. In: *J Pediatr* 88, S. 711-750.
70. Gibson R, Burns J, Ramsey B (2003): Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. In: *Am J Respir Crit Care Med*, 168 (8), S. 918-951.
71. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. In: *Eur J Cell Biol* 74 (2), S. 111-122.
72. Goubau C, Wilschanski M, Skalicka V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, Munck A, Derichs N, Middleton PG, Hjelte L, Padoan R, Vasar M, De Boeck K (2009): Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride

- values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. In: *Thorax* 64 (8), S. 683-691.
73. Gozal D, Bailey SL, Keens TG (1993): Evolution of pulmonary function during an acute exacerbation in hospitalized patients with cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 16 (6), S. 347-353.
  74. Gressner AM, Gao CF, Gressner OA (2009): Non-invasive biomarkers for monitoring the fibrogenic process in liver: a short survey. In: *World J Gastroenterol* 15 (20), S. 2433-2440.
  75. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM (2007): Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. In: *Clin Chim Acta* 381 (2), S. 107-113.
  76. Gross J, Lapiere CM (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 15 (48), S. 1014-1022.
  77. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD (2006): Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: Potential implications in asthma and other lung diseases. In: *Eur J Pharmacol* 533 (1-3), S. 133-144.
  78. Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, Krauss-Etschmann S, Koller B, Reinhardt D, Roscher AA, Roos D, Griese M (2007): Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. In: *Nat Med* 13 (12), S. 1423-1430.
  79. Harutyunyan M, Gotze JP, Winkel P, Johansen JS, Hansen JF, Jensen GB, Hilden J, Kjølner E, Kolmos HJ, Gluud C, Kastrup J (2013): Serum YKL-40 predicts long-term mortality in patients with stable coronary disease: a prognostic study within the CLARICOR trial. In: *Immunobiology* 218 (7), S. 945-951.
  80. Hayllar KM, Williams SG, Wise AE, Pouria S, Lombard M, Hodson ME, Westaby D (1997): A prognostic model for the prediction of survival in cystic fibrosis. In: *Thorax* 52 (4), S. 313-317.
  81. 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 (2011): The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. In: *PLoS One* 6 (9), e24399.

82. Hilliard TN, Regamey N, Shute JK, Nicholson AG, Alton EW, Bush A, Davies JC (2007): Airway remodelling in children with cystic fibrosis. In: *Thorax* 62 (12), S. 1074-1080.
83. Hirche TO, Smaczny C, Mallinckrodt C, Krüger S, Wagner TO (2003): Pulmonale Manifestation der Mukoviszidose im Erwachsenenalter. In: *Dtsch Arztebl* 100 (5), S. 264-270.
84. Ialenti A, Di Rosa M (1994): Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. In: *Agents Actions* 43 (1-2), S. 44-47.
85. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y (1996): Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. In: *J Biol Chem* 271 (25), S. 14657-14660.
86. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V (2010): Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. In: *Hum Genomics* 4 (3), S. 194-201.
87. Jackson PL, Xu X, Wilson L, Weathington NM, Clancy JP, Blalock JE, Gaggar A (2010): Human neutrophil elastasemediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: Implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction. In: *Mol Med* 16 (5-6), S. 159-166.
88. Jialiang Hu, Philippe E, Van den Steen PE, Qing-Xiang A, Sang and Ghislain Opdenakker (2007): Review: Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. In: *Nat Rev Drug Discov* 6, S. 480-498.
89. Jiang D, Liang J, Noble PW (2007): Hyaluronan in tissue injury and repair. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, S. 435-461.
90. Johansen JS (2006): Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. In: *Dan Med Bull* 53 (2), S. 172-209.
91. Johansen JS, Jensen HS, Price PA (1993): A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. In: *Br J Rheumatol* 32 (11), S. 949-955.
92. Kadoglou NP, Sailer N, Fotiadis G, Kapelouzou A, Liapis CD (2014): The impact of type 2 diabetes and atorvastatin treatment on serum levels of MMP-7 and MMP-8. In: *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122 (1), S. 44-49.

93. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. In: *Science* 245 (4922), S. 1073-1080.
94. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H (2005): Standards of care for patients with cystic fibrosis: A European consensus. In: *J Cyst Fibros* 4 (1), S. 7-26.
95. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H (1992): Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. In: *N Engl J Med* 326 (18), S. 1187-1191.
96. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler HG (1995): Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. In: *Am J Cardiol* 75 (14), S. 913-918.
97. Knorr T, Obermayr F, Bartnik E, Zien A, Aigner T (2003): YKL-39 (chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40 (chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes. In: *Ann Rheum Dis* 62 (10), S. 995-998.
98. Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC (1995): In vivo nasal potential difference: Techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. In: *Hum Gene Ther* 6 (4), S. 445-455.
99. Ko YH, Thomas PJ, Delannoy MR, Pedersen PL (1993): The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein. In: *J Biol Chem* 268 (32), S. 24330-24338.
100. Konstan MW, McKone EF, Moss RB, Marigowda G, Tian S, Waltz D, Huang X, Lubarsky B, Rubin J, Millar SJ, Pasta DJ, Mayer-Hamblett N, Goss CH, Morgan W, Sawicki GS (2017): Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS). A phase 3, extension study. In: *Lancet Respir Med* 5 (2), S. 107-118.
101. Korosok M, Wei W, Farrell P (1996): The incidence of cystic fibrosis. In: *Stat Med* 15 (5), S. 15449-15462.
102. Kraynack NC, Gothard MD, Falletta LM, McBride JT (2011): Approach to treating cystic fibrosis pulmonary exacerbations varies widely across US CF care centers. In: *Pediatr Pulmonol* 46 (9), S. 870-881.

103. Lai T, Wu D, Chen M, Cao C, Jing Z, Huang L, Lv Y, Zhao X, Lv Q, Wang Y, Li D, Wu B, Shen H (2016): YKL-40 expression in chronic obstructive pulmonary disease: relation to acute exacerbations and airway remodeling. In: *Respir Res* 17, S. 31.
104. Le NT, Xue M, Castelnoble LA and Jackson CJ (2007): The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. In: *Front Biosci* 12 (1), S. 1475-1487.
105. Lee JH, Kim SS, Kim IJ, Song SH, Kim YK, In Kim J, Jeon YK, Kim BH, Kwak IS (2012): Clinical implication of plasma and urine YKL-40, as a proinflammatory biomarker, on early stage of nephropathy in type 2 diabetic patients. In: *J Diabetes Complications* 26 (4), S. 308-312.
106. Leonardi S, Parisi GF, Capizzi A, Manti S, Cuppari C, Scuderi MG, Rotolo N, Lanzafame A, Musumeci M, Salpietro C (2016): YKL-40 as marker of severe lung disease in cystic fibrosis patients. In: *J Cyst Fibros* 15 (5), S. 583-586.
107. Letuve S, Kozhich A, Arouche N, Grandsaigne M, Reed J, Dombret MC, Kiener PA, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M (2008): YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. In: *J Immunol* 181 (7), S. 5167-5173.
108. Lewandowski KC, Banach E, Bienkiewicz M, Lewinski A (2011): Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia. In: *Arch Med Sci* 7 (2), S. 294-303.
109. Lowe CU, May CD, Reed SC (1949): Fibrosis of the pancreas in infants and children: a statistical study of clinical and hereditary features. In: *Am Dis Chil* 78 (3), S. 349-374.
110. Ma Y, Yabluchanskiy A, Hall ME, Lindsey ML (2014): Using plasma matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 to predict future cardiovascular events in subjects with carotid atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 232 (1), S. 231-233.
111. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC (2004): Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. In: *Nat Med* 10 (5), S. 487-493.
112. Mall M, Hirtz S, Gonska T, Kunzelmann K (2004): Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. In: *J Cyst Fibros* 3 (2), S. 165-169.

113. Manzanares D, Monzon ME, Savani RC, Salathe M (2007): Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 37 (2), S. 160-168.
114. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC (1998): Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airway disease. In: *Cell* 95 (7), S. 1005-1015.
115. Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW, European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group (2009): A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. In: *J Cyst Fibros* 8 (1), S. 71-78.
116. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, Sagel SD, Ramsey BW (2007): Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. In: *Am J Respir Crit Care Med* 175 (8), S. 822-828.
117. MacKenzie T, Gifford AH, Sabadosa KA, Quinto HB, Knapp EA, Goss CH, Marshall BC (2014): Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry. In: *Ann Intern Med* 161 (4), S. 233-241.
118. McKone EF, Goss, CH, Aitken ML (2006): CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. In: *Chest* 130 (5), S. 1441-1447.
119. McQuibban G, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM (2000): Inflammation dampened by gelatinase a cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. In: *Science* 289, S. 1202-1206.
120. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM (2002): Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. In: *Blood* 100 (4), S. 1160-1167.
121. Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, Rawlins SR, Sanderson SO, Levine RA (2008): Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, FIBROSpect II, and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C. In: *Am J Gastroenterol* 103 (4), S. 928-936.

122. Meng X, Wang Y, Wang X, Wrennall JA, Rimington TL, Li H, Cai Z, Ford RC, Sheppard DN (2017): Two Small Molecules Restore Stability to a Sub-population of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator with the Predominant Disease-causing Mutation. In: *J Biol Chem*, im Druck.
123. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J; ATS/ERS Task Force (2005): Standardisation of spirometry. In: *Eur Respir J* 26 (5), S. 319-338.
124. Mogayzel P, Dunitz J, Marrow L, Hazle LA (2014): Improving care delivery and outcomes: The impact of the cystic fibrosis care network. In: *BMJ Qual Saf* 23 (1), S. 3-8.
125. Naehrlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barbeno J, Bargoni J, Blankensteind O, Bremer W, Brunsmann F, Ellemunter H, Fusch C, Gembruch U, Hammermann J, Jacobeit J, Jung A (2013): S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“. Berlin: Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie. AWMF.
126. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. In: *Cardiovasc Res* 69 (3), S. 562-573
127. Nauck M, Schmidt S (2012): Neugeborenenenscreening auf Mukoviszidose. Elterninformation zur Früherkennung angeborener Störungen bei Neugeborenen. Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Greifswald.
128. Nelson J (1985): Management of acute pulmonary exacerbations in cystic fibrosis: A critical appraisal. In: *J Pediatr* 106 (6), S. 1030-1033.
129. Neocleous V, Yiallourous PK, Tanteles GA, Costi C, Moutafi M, Ioannou P, Patsalis PC, Sismani C, Phylactou LA (2014): Apparent Homozygosity of p.Phe508del in CFTR due to a Large Gene Deletion of Exons 4-11. In: *Case Rep Genet* 2014, S. 613863.
130. Nichols DP, Chmiel JF (2015): Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 50 (40), S. 39-56.
131. Nordenbaek C, Johansen JS, Junker P, Borregaard N, Sorensen O, Price PA (1999): YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. In: *J Infect Dis* 180 (5), S. 1722-1726.

132. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007): Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3), S. 221-233.
133. Painter RG, Bonvillain RW, Valentine VG, Lombard GA, LaPlace SG, Nauseef WM, Wang G (2008): The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. In: *J Leukoc Biol* 83 (6), S. 1345-1353.
134. Painter RG, Marrero L, Lombard GA, Valentine VG, Nauseef WM, Wang G (2010): CFTR-mediated halide transport in phagosomes of human neutrophils. In: *J Leukoc Biol* 87 (5), S. 933-942.
135. Painter RG, Valentine VG, Lanson NA Jr, Leidal K, Zhang Q, Lombard G, Thompson C, Viswanathan A, Nauseef WM, Wang G, Wang G (2006): CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. In: *Biochemistry* 45 (34), S. 10260-10269.
136. Parks WC, Shapiro SD (2001): Matrix metalloproteinases in lung biology. In: *Respir Res* 2 (1), S. 10-19.
137. Perez A, van Heeckeren AM, Nichols D, Gupta S, Eastman JF, Davis PB (2008): Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in cystic fibrosis lung epithelium. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295 (2), S. 303-313.
138. Picciotto MR, Cohn J, Bertuzzi G, Greengard P and Nairn AC (1992): Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. In: *J Biol Chem* 267 (18), S. 12742-12752.
139. Quon BS, Rowe SM (2016): New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. In: *BMJ* 352, S. 859.
140. Rabin HR, Butler SM, Wohl MEB, Geller DE, Colin AA, Schidlow DV, Johnson CA, Konstan MW, Regelman WE; Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis (2004): Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 37 (5), S. 400-406.
141. Ramsey BW, Boat TF (1994): Outcome measures for clinical trials in cystic fibrosis. Summary of a Cystic Fibrosis Foundation consensus conference. In: *J Pediatr* 124 (2), S. 177-192.

142. Rath T, Hage L, Kugler M, Menendez Menendez K, Zachoval R, Naehrlich L, Schulz R, Roderfeld M, Roeb E (2013): Serum proteome profiling identifies novel and powerful markers of cystic fibrosis liver disease. In: *PLoS one* 8 (3), S. e58955.
143. Rath T, Menendez Menendez K, Kugler M, Hage L, Wenzel C, Schulz R, Graf J, Naehrlich L, Roeb E (2012): TIMP-1/-2 and transient elastography allow non invasive diagnosis of cystic fibrosis associated liver disease. In *Dig Liver Dis* 44 (9), S. 780-787.
144. Rath T, Roderfeld M, Guler M, Wenzel C, Graf J, Beitinger F, Roeb E, Zachoval R (2011): YKL-40 and transient elastography, a powerful team to assess hepatic fibrosis. In: *Scand J Gastroenterol* 46 (11), S. 1369-1380.
145. Ratjen F, Hartog CM, Paul K, Wermelt J, Braun J (2002): Matrix metalloproteinases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. In: *Thorax* 57 (11), S. 930-934.
146. Recklies AD, White C, Ling H (2002): 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. In: *Biochem J* 365 (1), S. 119-126.
147. Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E (2009): Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. In: *J Cyst Fibros* 8 (5), S. 338-347.
148. Ros M, Casciaro R, Lucca F, Troiani P, Salonini E, Favilli F, Quattrucci S, Sher D, Assael BM (2013): Hyaluronic acid improves the tolerability of hypertonic saline in the chronic treatment of cystic fibrosis patients: a multicenter, randomized, controlled clinical trial. In: *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 27 (2), S. 133-137.
149. Rosenfeld M, Emerson J, Williams-Warren J, Pepe M, Smith A, Montgomery AB, Ramsey B (2001): Defining a pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. In: *J Pediatr* 139 (3), S. 359-365.
150. Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, Hiatt P, McCoy K, Wilson CB, Inglis A, Smith A, Martin TR, Ramsey BW (2001): Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 32 (5), S. 356-366.

151. Rueegg CS, Kuehni CE, Gallati S, Baumgartner M, Torresani T, Barben J (2013): One-year evaluation of a neonatal screening program for cystic fibrosis in Switzerland. In: *Dtsch Arztebl Int* 110 (20), S. 356–363.
152. Sachs L, Hedderich J (2006): Statistik: Angewandte Statistik. 12. Auflage. Springer, Berlin/ Heidelberg, S. 338.
153. Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I (2005): Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. In: *Pediatr Pulmonol* 39 (3), S. 224-232.
154. Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET (2012): Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. In: *Am J Respir Crit Care Med* 186 (9), S. 857-865.
155. Saitou Y, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Kawakita T, Yamamoto N, Sugimoto K, Murata K, Nakano T (2005): Noninvasive estimation of liver fibrosis and response to interferon therapy by a serum fibrogenesis marker, YKL-40, in patients with HCV-associated liver disease. In: *World J Gastroenterol* 11 (4), S. 476-481.
156. Schechter M, Shelton BJ, Margolis PA, FitzSimmons S (2001): The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States. In: *Am J Respir Crit Care Med* 163 (6), S. 1331-1337.
157. Schultz GS and Wysocki A (2009): Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. In: *Wound Repair Regen* 17 (2), S. 153-162.
158. Sens B, Stern M (2012): Qualitätssicherung Mukoviszidose 2011. Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen, Mukoviszidose e.V. und Mukoviszidose Institut gGmbH. Bad Honnef: Hippocampus Verlag.
159. Sens B, Stern M, Wiedemann B, Stitz I, Eissing G (2001): Qualitätssicherung Mukoviszidose – Eine Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse. Mukoviszidose e. V. Bonn 2001. Online verfügbar unter: [www.muko.info](http://www.muko.info).
160. Sens B, Stern M, Wiedemann BH (2001): Qualitätssicherung Mukoviszidose – Überblick über den Gesundheitszustand der Patienten in Deutschland 2000. Zentrum für Qualitätsmanagement im Gesundheitswesen Hannover 2001. Online verfügbar unter: [www.muko.info](http://www.muko.info).

161. Shoki AH, Mayer-Hamblett N, Wilcox PG, Sin DD, Quon BS (2013): Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations. In: *Chest* 144 (5), S. 1659-1670.
162. Shwachman H, Kulczycki LL (1958): Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. In: *AMA J Dis Child* 96 (1), S. 6-15.
163. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996): Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. In: *Cell* 85 (2), S. 229-236.
164. Sng JJ, Prazakova S, Thomas PS, Herbert C (2016): MMP-8, MMP-9 and Neutrophil Elastase in Peripheral Blood and Exhaled Breath Condensate in COPD. In: *COPD*, S. 1-7.
165. Spoonhower KA, Davis PB (2016): Epidemiology of Cystic Fibrosis. In: *Clin Chest Med* 37 (1), S. 1-8.
166. Steer ML (1999): Early events in acute pancreatitis. In: *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 13 (2), S. 213-225.
167. Sterk PJ, Quanjer PhH, Van der Maas LLJ, Wise ME, Van der Lende R (1980): The validity of the single breath nitrogen determination of residual volume. In: *Bull Europ Physiopath Respir* 16 (2), S. 195-213.
168. Stern M, Wiedemann B, Wenzlaff P (2008): From registry to quality management: the German Cystic Fibrosis Quality Assessment project 1995 – 2006. In: *Eur Respir J* 31 (1), S. 29-35.
169. Stuhmann M, von der Hardt H, Fabel H (1999): Mukoviszidose – Auch eine Erkrankung des Erwachsenen? In: *Internist (Berl)* 40 (5), S. 476-485.
170. Tao H, Yang JJ, Shi KH, Huang C, Zhang L, Lv XW, Li J (2014): The significance of YKL-40 protein in liver fibrosis. In: *Inflamm Res* 63 (4), S. 249-254.
171. Tiddens H, Silverman M, Bush A (2000): The role of inflammation in airway disease: remodeling. In: *Am J Respir Crit Care Med* 162 (2), S. 7-10.
172. Tiffeneau R, Pinelli A. (1948): Régulation bronchique de la ventilation pulmonaire. In: *J Fr Méd Chir Thorac* 2 (3), S. 221-244.
173. Toriseva M and Kahari VM (2009): Proteinases in cutaneous wound healing. In: *Cell Mol Life Sci* 66 (2), S. 203-224.

174. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N (1985): Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. In: *Science* 230 (4729), S. 1054-1057.
175. Turino G, Cantor J (2003): Hyaluronan in respiratory injury and repair. In: *Am J Respir Crit Care Med* 167 (9), S. 1169-1175.
176. Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G (2003): Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. In: *Eur J Biochem* 270 (18), S. 3739-3749.
177. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J and Opdenakker G (2000): Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- $\alpha$  and leaves RANTES and MCP-2 intact. In: *Blood* 96 (8), S. 2673-2681.
178. Van Wart HE and Birkedal-Hansen H (1990): The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (14), S. 5578-5582.
179. Vater CA, Mainardi CL, Harris ED (1979): Inhibitor of human collagenase from cultures of human tendon. In: *J Biol Chem* 254 (8), S. 3045-3053.
180. Volck B, Price PA, Johansen JS, Sorensen O, Benfield TL, Nielsen HJ, Calafat J, Borregaard N (1998): YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. In: *Proc Assoc Am Physicians* 110 (4), S. 351-360.
181. Walker JE, Saraste M, Runswick J, Gay NJ (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. In: *EMBO J* 1 (8), S. 945-951.
182. Walsh DE, Greene CM, Carroll TP, Taggart CC, Gallagher PM, O'Neill SJ, McElvaney NG (2001): Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. In: *J Biol Chem* 276 (38), S. 35494-35499.

183. Welgus HG, Kobayashi DK, Jeffrey JJ (1983): The collagen substrate specificity of rat uterus collagenase. In: *J Biol Chem* 258 (23), S. 14162-14165.
184. Welgus HG, Stricklin GP, Eisen AZ, Bauer EA, Cooney RV, Jeffrey JJ (1979): A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. In: *J Biol Chem* 254 (6), S. 1938-1943.
185. Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7. Ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. New York: McGraw–Hill; 1995. S. 3799-3863.
186. Wood RE, Leigh MW (1987): What is a “pulmonary exacerbation” in cystic fibrosis? In: *J Pediatr* 111 (6), S. 841-842.
187. World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis (2004): Online verfügbar unter:  
<http://www.who.int/genomics/publications/reports/en/index.html>.
188. Yu Q, Stamenkovic I (2000): Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. In: *Genes Dev* 14 (2), S. 163-176.
189. Zarbock A, Ley K (2008): Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. In: *Am J Pathol* 172 (1), S.1-7.
190. Zhou Z, Duerr J, Johannesson B, Schubert SC, Treis D, Harm M, Graeber SY, Dalpke A, Schultz C, Mall MA (2011): The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. In: *J Cyst Fibros* 10 (2), S. 172-182.
191. Zhu Z, Wang T, Liu Z, Yi L, Yang, Z, Bian W, Chen W, Wang S, Li G, Li A, Martin GS, Zhu X (2017): Plasma Neutrophil Elastase and Elafin as Prognostic Biomarker for Acute Respiratory Distress Syndrome: A Multicenter Survival and Longitudinal Prospective Observation Study. In: *Shock*, im Druck.

## 13. Anhang

### Einverständniserklärung



Justus-Liebig  
Universität Giessen  
Standort Giessen

## UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIESSEN UND MARBURG



Philipps-Universität  
Marburg

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

Prof. Dr. med. Elke Roeb

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

#### Patienteninformation zur Studie

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

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

Giessen, 29. Mai 2009

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

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

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

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

Wir danken für Ihre Mitarbeit.

Das Team der Gastroenterologie

Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb



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

**Studie**

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

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

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

35392 Gießen, Klinikstr. 33

☒ 35385 Gießen

☎ (06 41) 985-4 23 38

☎ (06 41) 985-4 23 39

E-Mail:

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

Giessen,

**Einwilligungserklärung**

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Arzt/Ärztin

## Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (Klinikstraße 36, 35392 Gießen, Deutschland) geprüft und genehmigt. Die Antragsnummer lautet 75/09.

## 14. Danksagung

Für diese Arbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Elke Roeb für die Überlassung des interessanten Themas und die exzellente Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für die wertvollen Ratschläge.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Dr. Timo Rath für die großartige Unterstützung und Beratung bei der Auswertung der Ergebnisse und der zielstrebigem Arbeit an unserer gemeinsamen Veröffentlichung.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe, vor allem PD Dr. Martin Roderfeld und Annette Tschuschner, für die inspirierenden Gespräche, die vielen wertvollen Anregungen, die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Mukoviszidoseambulanzen und Ute Seeger, die mir durch ihren unermüdlichen Einsatz eine große Hilfe waren.

Von ganzem Herzen danke ich meinen wundervollen Eltern, Kirsten und Stefan Zwaschka, ohne die ein Studium und die Erstellung dieser Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären. Vielen Dank, dass ihr mich in allen Lebenslagen so liebevoll unterstützt und immer an mich glaubt. Meinem Bruder Jonas Zwaschka danke ich dafür, dass er mich mit seiner stets gut gelaunten Art immer wieder aufheitert.

Ein besonderer Dank geht an meinen Ehemann Philipp Holetzke. Danke, dass Du immer für mich da bist und all meine Computerprobleme so geduldig gelöst hast. Ich werde es wohl niemals lernen.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die für die erforderliche Abwechslung sorgten.

## 15. Ehrenwörtliche Erklärung

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift