

Aus dem Institut für Hygiene der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktorin: Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp)

**Evaluation von Laktat als Entzündungsmarker im Sputum
von Patienten mit Cystischer Fibrose**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Martin Stotz
geboren am 27.12.1981 in Gera

Betreuer: PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch

Gutachter: 1. Herr PD Dr. med. D. Worlitzsch
2. Herr Prof. Dr. med G. Keyßer
3. Herr Prof. Dr. med D. Hartl (Tübingen)

Eröffnung: 11.02.2014
Verteidigung: 22.01.2015

REFERAT

Seit kurzem ist bekannt, dass im Sputum von CF-Patienten hohe Laktat-Konzentrationen vorliegen. Als Produzenten des Laktats wurden die Neutrophilen Granulozyten (PMN), die bei einer akuten Exazerbation massenhaft in die CF-Lunge einströmen, ausgemacht. Das schnelle und zuverlässige Erkennen einer akuten Exazerbation ist von großer Bedeutung für eine suffiziente Therapie, gestaltet sich bisweilen jedoch schwierig. Goldstandard in der Diagnostik ist die FEV₁ (Forcierte Einsekundenkapazität). Routinemäßig eingesetzt wird ebenso das CRP im Serum. Ergänzende Markersubstanzen wären hilfreich. In der vorliegenden Arbeit wurde Laktat im Sputum von CF-Patienten als Entzündungsmarker evaluiert.

Die Laktat-Konzentrationen in 82 Sputum-Proben von 27 CF-Patienten wurden gemessen. Bei 13 Probenpaaren erfolgten die Konzentrationsbestimmungen jeweils während einer akuten Exazerbation und unter Therapie. Zum Vergleich erfolgten Messungen im Sputum von 8 Non-CF-Patienten. Die in den Proben nachweisbaren Erreger wurden identifiziert und quantifiziert. Die Korrelation von Laktat im Sputum und LDH, FEV₁, CRP sowie den häufigsten Bakterienspezies und deren Keimzahlen wurde ermittelt. Ebenso wurde die Stabilität von Laktat und LDH untersucht.

Die mittlere Laktat-Konzentration im CF-Sputum beträgt $3,1 \pm 2,8$ mmol/l. Die Laktat-Konzentration war bei Exazerbation mit $5,2 \pm 3,3$ mmol/l signifikant höher als während der Antibiotikatherapie mit $1,9 \pm 2,1$ mmol/l ($p = 0,006$). Bei Non-CF-Patienten lag der Laktat-Wert mit $1,5 \pm 0,9$ mmol/l deutlich niedriger. Die FEV₁ korreliert signifikant negativ mit dem Laktat-Wert ($r = -0,34$; $p = 0,012$). Für das CRP war eine positive Korrelation zu registrieren ($r = 0,33$; $p = 0,065$). Die Laktat-Konzentration war unabhängig von der Bakterienspezies oder -keimzahl. Laktat erwies sich als stabil unter Kühl- und Gefrierbedingungen.

Die Annahme, dass das Laktat von den PMN stammt, kann mit den hier vorliegenden Ergebnissen unterstützt werden, da die Laktat-Konzentration unabhängig von im Sputum nachweisbaren Erregern war. Laktat ist mit den hier vorliegenden Ergebnissen als non-invasiv gewonnener Entzündungsmarker in der paraklinischen Diagnostik der CF geeignet. Es stellt eine kostengünstige, routinemäßig messbare und im klinischen Alltag einfach zu ermittelnde Ergänzung zu der weiterhin als Goldstandard geltenden FEV₁ und zu der etablierten Markersubstanz CRP im Serum dar.

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen & Symbole.....	III	
1	EINLEITUNG	1
1.1	Cystische Fibrose.....	1
1.2	Chronische bakterielle Lungeninfektion	3
1.3	Inflammation und Neutrophile Granulozyten in der CF-Lunge.....	6
1.4	Laktat im Sputum von CF-Patienten	8
1.5	Laktatdehydrogenase im Sputum von CF-Patienten	9
1.6	Entzündungsmarker zur Therapieüberwachung	10
2	ZIELSTELLUNG	12
3	MATERIAL UND METHODIK.....	13
3.1	Patienten	13
3.1.1	CF-Patienten	13
3.1.2	Non-CF-Patienten	14
3.2	Bearbeitung der Sputum- und BAL-Proben	14
3.3	Laktat- und LDH-Messung	16
3.4	Bakterienquantifizierung.....	17
3.5	Bakterienidentifizierung.....	18
3.6	Stabilität von Laktat und LDH.....	20
3.7	Statistik.....	21
4	ERGEBNISSE.....	22
4.1	Laktat in Sputum und BAL von CF- und Non-CF-Patienten.....	22
4.2	LDH in Sputum und BAL von CF- und Non-CF-Patienten	24
4.3	Korrelation von Laktat und LDH, FEV ₁ sowie CRP	25
4.4	Laktat, LDH und FEV ₁ bei Exazerbation und Therapie	27
4.5	Stabilität von Laktat und LDH.....	32
4.6	Bakterienidentifizierung und -quantifizierung	34
4.7	Laktat und identifizierte Erreger im CF-Sputum	38
4.8	Patientenverläufe	39

5	DISKUSSION	42
5.1	PMN als Quelle des Laktats im Sputum.....	43
5.2	Klinische Bedeutung von Laktat und LDH.....	44
5.3	Laktat und LDH in Sputum und BAL von CF- und Non-CF-Patienten	45
5.4	Laktat, LDH und FEV ₁ bei Exazerbation und Therapie	47
5.5	Stabilität von Laktat und LDH.....	49
5.6	Bakterien und Laktat im Sputum	49
5.7	Gegenüberstellung mit etablierten Markern	51
6	ZUSAMMENFASSUNG	54
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	ANHANG	64
9	THESEN	65

Tabellarischer Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN & SYMBOLE

4-AAP	4-Aminoantipyrin
Abb.	Abbildung
ASL	Airway surface liquid
AZ	Allgemeinzustand
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>B. stercoris</i>	<i>Bacteroides stercoris</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHI	Brain-Heart-Infusion Agar
BS	Bronchialsekret
bzw.	beziehungsweise
CDC	CDC-Anaerobier-Agar
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COL	Columbia-Agar
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DCBSA	Dichlorbenzolsulfonsäure
FEV ₁	forcierte Einsekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität
GOÄ	Gebührenordnung für Ärzte
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	interzelluläres Adhaesionsmolekül -1
IGF 1	Insulin like growth faktor 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
i.v.	intravenös
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
KBE	koloniebildende Einheiten
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
µmol	Mikromol

mg/l	Milligramm/Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MPO	Myeloperoxidase
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NF-κB	Nuclear factor Kappa B
p	statistische Signifikanz
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphat buffered Saline
PMN	Polymorphonuclear leucocytes (neutrophils)
<i>Pr. corporis</i>	<i>Prevotella corporis</i>
<i>Pr. loeschii</i>	<i>Prevotella loeschii</i>
r	Pearson Korrelationskoeffizient
RG	Rasselgeräusche
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCS	Schädler-Agar
SMG	<i>Streptococcus-milleri</i> -group
<i>S. saccharolyticus</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	vascular endothelial growth factor
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1 EINLEITUNG

1.1 CYSTISCHE FIBROSE

Mit einer Inzidenz von 1:2500 Neugeborenen ist die Cystische Fibrose (synonym: Mukoviszidose, CF) die häufigste schwerwiegende autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der westlichen Industrienationen. Die Ursache der Erbkrankheit ist eine Mutation in einem 230 kb großen Gen auf Chromosom 7 (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989), welches für den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) kodiert (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Aktuell sind mehr als 1962 verschiedene Mutationen des betreffenden Gens gelistet (Cystic Fibrosis Mutation Database, letztes Update April 2011; Zugriff am 22.12.2013). Am häufigsten handelt es sich um die $\Delta F508$ -Mutation (Zielenski und Tsui, 1995). Dabei liegt eine Deletion von Phenylalanin an Position 508 des Gens vor (Riordan et al., 1989). Der CFTR fungiert in der apikalen Membran von schleimsezernierenden Zellen als Chloridionenkanal. Die Folge einer Mutation ist ein Defekt der Chloridionensekretion. Durch Fehlen des osmotischen Gradienten und somit weniger Wasser an der Epitheloberfläche wird ein zäher Mukus auf den CFTR-exprimierenden Epithelien gebildet (Ratjen und Döring, 2003). Am stärksten ist der Respirationstrakt von diesen Veränderungen betroffen. Ein chronisch produktiver Husten und die Besiedlung der Atemwege mit pathogenen Bakterien gelten als mögliches Zeichen einer CF (Ratjen und Döring, 2003). Die pathophysiologischen Veränderungen der Lunge sind zum großen Teil für die verminderte Lebenserwartung der CF-Patienten von durchschnittlich 35 Jahren verantwortlich (Rogers et al., 2005).

Eine Vielzahl der CF-Patienten fällt bereits in den ersten Lebenstagen durch einen Mekoniumileus auf (Allan et al., 1981). Dem Mekoniumileus äquivalent im Jugendlichen- und Erwachsenenalter ist das distale intestinale Obstruktionssyndrom (Allan et al., 1981). Hepatische Erkrankungen sowie Insuffizienzen der Fortpflanzungsorgane können im weiteren Krankheitsverlauf hinzukommen. Männliche Betroffene sind in 98 % der Fälle infertil, die weibliche Fertilität ist nahezu normal. Ebenso betroffen ist die Bauchspeicheldrüse als CFTR-exprimierendes Organ. Exokrine Pankreasinsuffizienzen sind bei nahezu 90 % aller CF-Patienten bekannt, häufig liegt zusätzlich ein Diabetes mellitus vor (Ratjen und Döring, 2003). Je nach dem, ob das CFTR-Protein nur geringfügig exprimiert wird, fehlerhaft strukturiert ist oder komplett fehlt, imponieren die Symptome der Multiorganerkrankung schwächer oder stärker (Ratjen und Döring, 2003).

Als Goldstandard in der Diagnostik gilt, neben den typischen klinischen Symptomen, das Ergebnis des Schweißtests (Di Sant'Agnese et al., 1953; Rosenstein und Cutting, 1998; Ratjen und Döring, 2003; Castellani et al., 2008). Dabei ist ein hoher Natriumchloridanteil im Schweiß messbar. Durch Genotypisierung der häufigsten CFTR-Mutationen kann die Diagnose bestätigt werden (Rosenstein und Cutting, 1998).

Im Krankheitsverlauf treten neben stabilen Krankheitsphasen immer wieder bronchopulmonale Exazerbationen auf. Die Patienten beklagen dann einen vermehrten Husten und Auswurf und eine Verschlechterung des Allgemeinzustands (AZ). Definitionsgemäß handelt es sich um eine Exazerbation, wenn 4 der unten aufgeführten Kriterien erfüllt sind, (Fuchs et al., 1994). Ein solcher Zustand bedeutet für die Patienten meist eine Hospitalisierung mit intravenöser Antibiotikatherapie über 10 bis 14 Tage (Döring et al., 2012). Im Rahmen der Diagnostik zur Objektivierung des Zustands erfolgen nach Anamnese und körperlicher Untersuchung des Patienten unter anderem Blutentnahmen, Untersuchung von Sputum-Proben, Röntgen des Thorax, Lungenfunktionsmessungen und gegebenenfalls auch eine Bronchoalveoläre Lavage (BAL). Bei einer BAL können zelluläre Bestandteile aus dem Respirationstrakt gewonnen und untersucht werden.

Zeichen einer Exazerbation [Fuchs et al., 1994]:

- Veränderungen des Sputums (z.B. Hämoptysen)
- Vermehrter Husten
- Vermehrte Dyspnoe
- Allgemeines Unwohlsein
- Zunehmender Erschöpfungszustand
- Lethargie
- Temperaturen > 38 °C
- Anorexie und/oder Gewichtsverlust
- Nasennebenhöhlensymptome
- Veränderungen bei Perkussion/Auskultation
- Abfall der Lungenfunktionsparameter von mindestens 10 %
- Röntgenologisch sichtbare infektassoziierte Lungenveränderungen

Die Therapie der Erkrankung erfolgt aktuell hauptsächlich symptomatisch. Die Patienten erhalten in regelmäßigen Abständen geplante antibiotische Behandlungen. Das Auftreten einer Exazerbation erfordert zusätzliche intensive Antibiotikatherapie, inhalativ und intravenös verabreicht (Döring und Høiby, 2004; Ratjen, 2009).

Zur Therapie stehen orale, intravenöse und inhalative Antibiotika zur Verfügung. Orale Antibiosen werden vor allem bei jüngeren und gesünderen CF-Patienten verwendet. Bei älteren Patienten werden vermehrt intravenöse Therapien eingeleitet. Unabhängig von der Art der Applikation der antibiotischen Therapie kommt es zu einer Verbesserung der Lungenfunktionswerte im Rahmen der Antibiose. Allerdings zeigt sich bei intravenöser Therapie eine prozentual größere Verbesserung der Lungenfunktion im Vergleich zur oralen Therapie (Wagener et al., 2013).

Neben den antibiotischen Medikamenten stehen auch immunmodulatorische Medikamente, Protease-Inhibitoren, Mukolytika, Ionenkanalblocker und ebenso Pankreasenzyme bei der Behandlung zur Verfügung. Kausale Therapien sind bisher nur wenig aussichtsreich (Ratjen, 2009; Döring et al., 2012).

1.2 CHRONISCHE BAKTERIELLE LUNGENINFEKTION

Im Krankheitsgeschehen der CF stehen die pathophysiologischen Veränderungen der Lunge im Vordergrund. Der zähe Mukus auf dem Respirationsepithel führt zu einer verminderten mukoziliären Clearance und chronisch bakterieller Besiedlung der CF-Lunge (Worlitzsch et al., 2002; Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003), (Abb. 1a, 1b, 1c, 1d). Die Infektion der Atemwege führt zum Einstrom von Neutrophilen Granulozyten (Abb. 1f) mit einhergehender Inflammation (Ratjen, 2009; Worlitzsch et al., 2002). Im Rahmen des Inflammationsgeschehens wiederum werden Substanzen produziert, die die Mukussekrektion anregen. Somit entsteht ein Kreislauf aus Sputumretention, Infektion und Inflammation (Ratjen 2009; Ulrich et al., 2010).

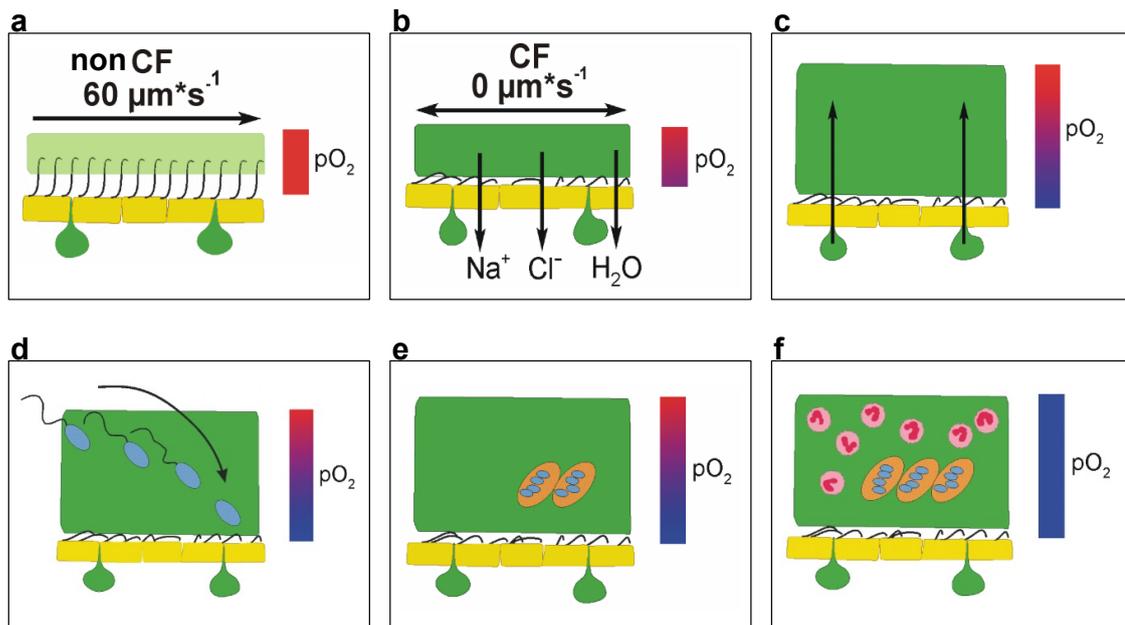


Abbildung 1: Schematische Darstellung der pathogenetischen Veränderungen des CF-Respirationsepithels, die zur Infektion der CF-Atemwege führen: a) Bei gesunden Menschen befindet sich über den Zilien des Respirationsepithels mit der periciliären Flüssigkeitsschicht (airway surface liquid, ASL) eine weitere niedrig-viskose Schleimschicht. Es herrscht ein normaler epithelialer Sauerstoffverbrauch und innerhalb der ASL besteht kein Sauerstoffgradient. Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ist hoch (Roter Balken), sodass ein normaler Gasaustausch stattfinden kann. Eingewanderte Fremdkörper oder Bakterien können auf dem ASL mittels Cilienschlag aus der Lunge transportiert werden b) Bei CF-Patienten kommt es durch den defekten Chloridionenkanal zu einer Volumenreduktion innerhalb des ASL, welcher gemeinsam mit dem zähen Mukus die mukoziliäre Clearance verschlechtert. c) Es kommt zu Mukushypersekretion und Sekretretention mit Bildung von Mukusplaques. Durch den erhöhten Sauerstoffverbrauch des Respirationsepithels nimmt der pO_2 innerhalb der Mukusplaques ab. Es bilden sich hypoxische Areale in den Mukusplaques. d) Bakterien, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*, gelangen in die Mukusplaques. e) *P. aeruginosa* organisiert sich in sogenannten Makrokolonien und produziert vermehrt Alginate. f) Der pO_2 nimmt mit zunehmender Makrokoloniedichte und vermehrtem Einstrom von Neutrophilen Granulozyten im Rahmen des chronischen Entzündungsgeschehens weiter ab (Blauer Balken) (Worlitzsch et al., 2002).

Die Mukusplaques, in denen hypoxische Zustände herrschen, werden von fakultativen und obligaten Anaerobiern besiedelt (Worlitzsch et al., 2002; Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009). *P. aeruginosa* und *S. aureus* produzieren Exopolysaccharide wie Alginate (Hassett et al., 1996) oder Poly-N-Succinyl Glukosamine (McKenney et al., 1999) bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Dies fördert die Bildung von Makrokolonien und schützt die Bakterien vor der Zerstörung durch reaktive Sauerstoffverbindungen (Döring und Worlitzsch, 1995; Worlitzsch et al., 2002), welche

von PMN gebildet werden. Dabei kommt es zu einem weiteren Sauerstoffverbrauch durch die PMN (Kolpen et al., 2014) und damit zu vermehrten hypoxischen Zuständen innerhalb der zähen Mukusplaques. *P. aeruginosa* wird in der Literatur häufig als obligater Aerobier bezeichnet. Da mit der Nitratatmung (Yoon et al., 2002; Yoon et al., 2006; Kolpen et al., 2014), der Argininfermentation (Vander Wauven et al., 1984) und der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat und Azetat (Eschbach et al., 2004; Schreiber et al., 2006) bisher mindestens 3 Wege bekannt sind, für *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen zu metabolisieren, wird *P. aeruginosa* in der vorliegenden Arbeit als fakultativer Anaerobier bezeichnet.

Während bei den meisten CF-Patienten in den ersten Lebensjahren eine Besiedlung der Atemwege mit *Staphylococcus aureus* oder *Haemophilus influenzae* nachweisbar ist, kommt mit zunehmendem Lebensalter *P. aeruginosa* am häufigsten vor (Abb. 2), (nach Koch und Høiby, 1993). Auch *Stenotrophomonas maltophilia* und *Burkholderia cepacia complex*-Bakterien können bei einigen CF-Patienten nachgewiesen werden (Koch und Høiby, 1993). Diese Bakterien werden als CF-Haupterreger bezeichnet (Rogers et al., 2004). Bei einem Patienten sind in der Regel mehrere Erreger im CF-Sputum nachweisbar. Dabei ist ein Erreger jedoch stets dominant (Worlitzsch et al., 2009). In über 61 % der Fälle handelt es sich dabei um *P. aeruginosa*.

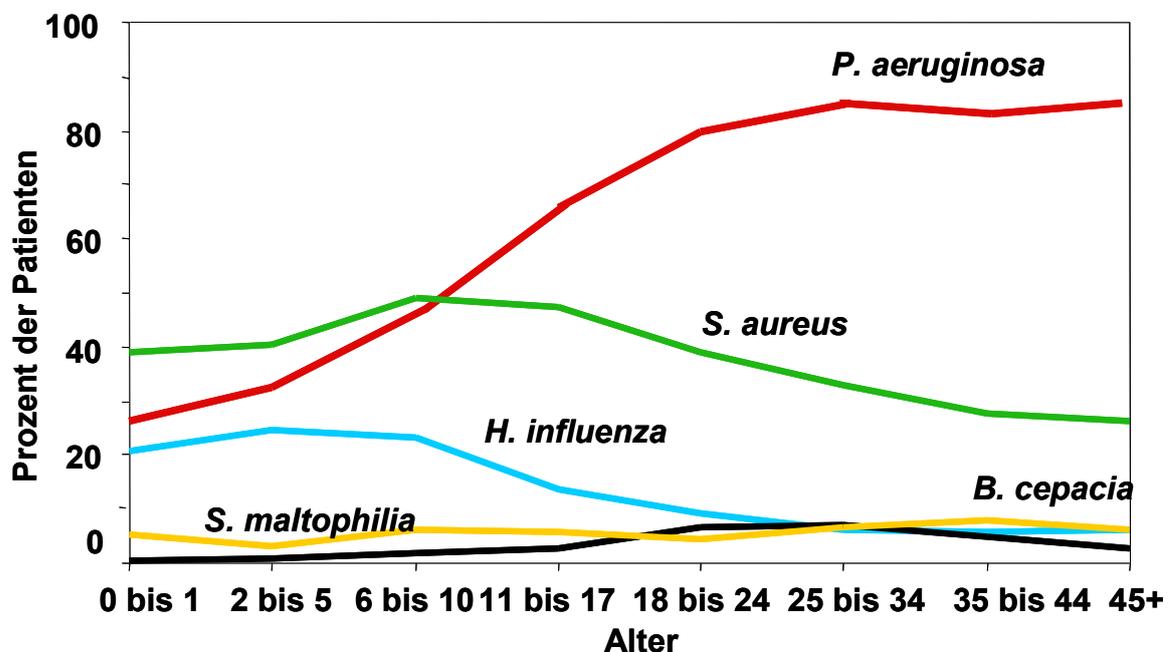


Abb. 2: Bakterienbesiedlung der CF-Atemwege in Abhängigkeit vom Lebensalter des Patienten [nach Koch und Høiby 1993]

Ziel einer antibiotischen Therapie bei Frühinfektion ist zunächst die Eradikation von *P. aeruginosa* (Valerius et al., 1991; Döring und Høiby, 2004). Im Laufe des Lebens kommt es bei den meisten Patienten jedoch trotzdem zu einer chronischen Infektion mit *P. aeruginosa*. Die Bakterien können dann nicht mehr eradiziert werden (Döring et al., 2012). Der Erfolg einer antibiotischen Therapie wird dann hauptsächlich am allgemeinen Zustand des Patienten und der Lungenfunktionswerte gemessen.

1.3 INFLAMMATION UND NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IN DER CF-LUNGE

Die chronische Infektion der CF-Lunge zieht eine chronische Inflammation nach sich. Die Atemwege der CF-Patienten sind charakterisiert durch einen von neutrophilen Granulozyten dominierten Inflamationsprozess, der vor allem auf der Oberfläche des Lungenepithels stattfindet (Konstan et al., 1994). PMN (polymorphkernige neutrophile Granulozyten) finden sich in großen Mengen in den kleinen Kapillaren, vor allem in der Lunge, aber auch im Knochenmark, der Leber und der Milz (Peters, 1998). Im Rahmen des Inflamationsgeschehens findet eine Migration von PMN, Makrophagen und T-Zellen durch Zytokine, Zelladhäsions-Moleküle und Chemotaxis aus dem Gefäßsystem in das Lungengewebe und den im Bronchialsystem gelegenen Mukus statt (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003; Downey et al., 2007, Downey et al., 2009). Dabei stellt IL-8 den größten Reiz für die PMN dar (Sekido et al., 1993; Folkesson et al., 1995; Matsumo et al., 1997). Substanzen, die im Rahmen der Inflammation freigesetzt werden, führen zu einer vermehrten Kollagensynthese im Bronchialgewebe (Konietzko et al., 1995; Ulrich et al., 2010). Durch Elastasen, die hauptsächlich von den PMN sezerniert werden, findet ein verstärkter Elastinabbau im CF-Lungengewebe statt (Goldstein und Döring, 1986; Viglio et al., 2000, Ulrich et al., 2010). Vermehrter Elastinabbau und Kollagensynthese führen zur typischen Fibrosierung des Lungengewebes (Abb. 3), bronchialer Wandverdickung sowie der Ausbildung von Bronchiektasen (Bedrossian et al., 1976; Sobonya und Taussig 1986; Durieu et al., 1998; Tiddens et al., 2000), was durch eine Verlängerung des Diffusionsweges den Gasaustausch erschwert (Konietzko et al., 1995). Eine erhöhte Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor- κ B) und TNF α (Tumornekrosefaktor α) führt durch eine Stimulation der CF-Epithelzellen zur vermehrten Sekretion von proinflammatorischem IL-8 (DiMango et al. 1995, DiMango et al. 1998, Strieter et al. 2002; Berger, 2002) und damit zu einem vermehrten Einstrom von PMN. Antiinflammatorisches IL-10 (Interleukin-10) wird nachweislich vermindert gebildet (Chmiel et al., 1999). Die im Rahmen des komplexen

Inflammationsvorgangs sezernierten Zytokine schädigen das CF-Lungengewebe kontinuierlich (Ratjen 2009; Ulrich et al., 2010).

Eine anhaltende Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter FEV₁ (forcierte Einsekundenkapazität) und FVC (forcierte Vitalkapazität) sind als Folge dieser Umbauprozesse zu registrieren. Die Lungenfunktionsparameter FEV₁ und FVC gelten als sensitivste Prognosefaktoren für CF-Patienten (Aurora et al., 2000). Eine FEV₁ < 30 % ist mit einer Mortalität von 50 % in 2 Jahren assoziiert (Kerem et al., 1992). Nicht nur im Bronchialsystem, auch in den Alveolen ist ein Inflammationsgeschehen nachweislich vorhanden. Proinflammatorische Moleküle wie NF-κB, IGF-1 (insulin like growth factor-1) und ICAM-1 (intercellular adhaesion molecule-1) werden dort ebenso exprimiert. In den CFTR-exprimierenden Pneumozyten Typ II konnte ebenso eine Akkumulation des proinflammatorischen Moleküls Ceramid registriert werden (Ulrich et al., 2010).

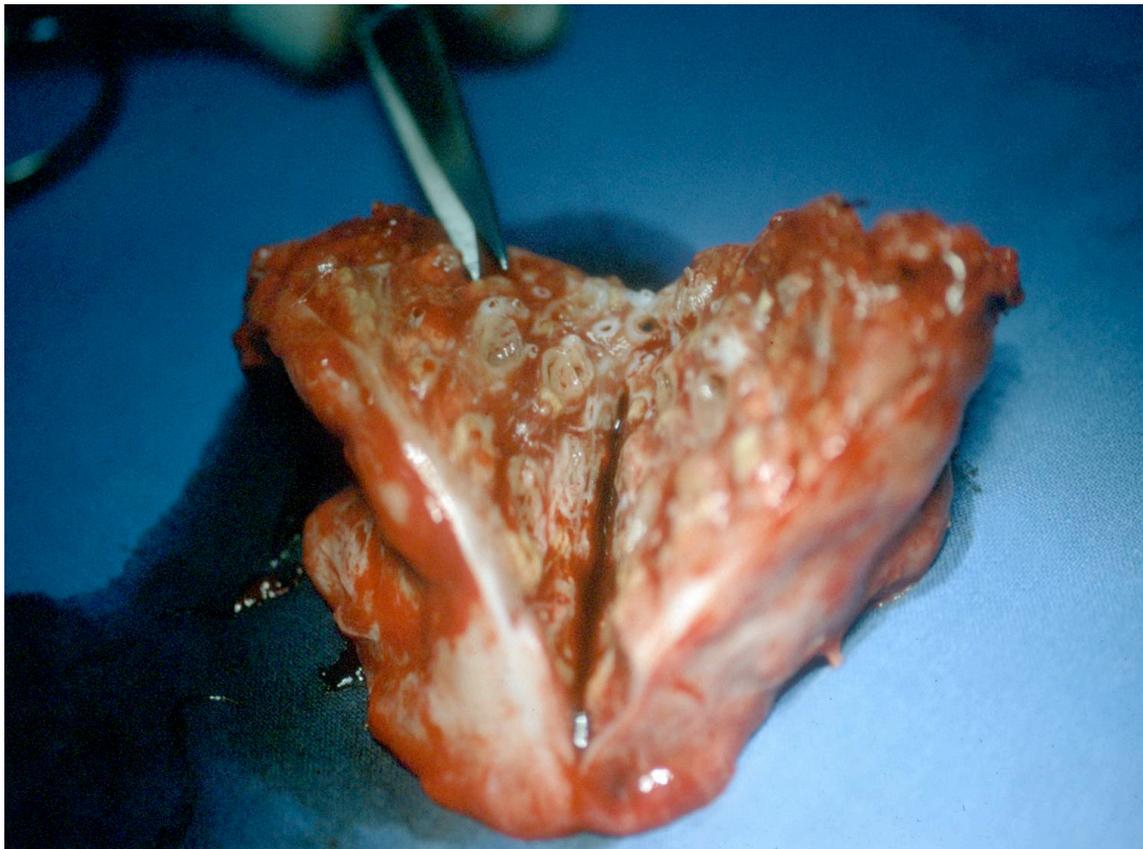


Abb. 3: Explorationsschnitt durch einen explantierten fibrotischen CF-Lungenlappen mit chronischer *P. aeruginosa*-Infektion (mit Genehmigung von PD Dr med habil Worlitzsch)

Die Veränderungen der Lunge als Folge der chronischen Lungeninfektion sind der entscheidendste Faktor für die verminderte Lebenserwartung der CF-Patienten (Rosenfeld et al., 2001).

1.4 LAKTAT IM SPUTUM VON CF-PATIENTEN

Laktat ist ein Stoffwechselprodukt, das aerob und anaerob sowohl von Bakterien als auch von menschlichen Zellen gebildet wird. Im Rahmen der Glykolyse entsteht aus Glucose Pyruvat, welches auf 3 verschiedenen Wegen (Horn, 2005; Linnemann und Köhl, 2005) metabolisiert werden kann: Reduktion von Pyruvat mithilfe von LDH zu Laktat (Abb. 4), komplette Oxidation zu CO_2 und H_2O unter aeroben Bedingungen durch die Atmungskette, oder der Umbau zu Ethanol.

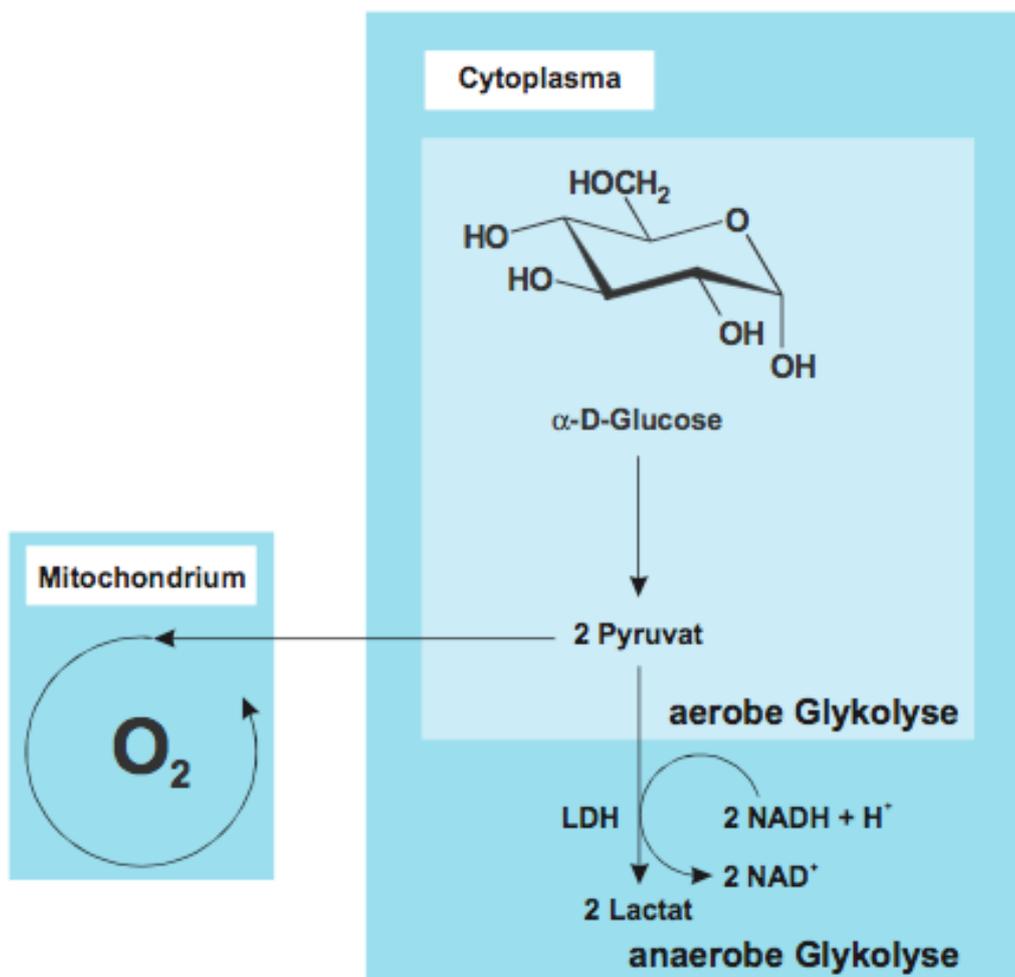


Abb. 4: Pyruvat als Produkt der Glykolyse kann unter anaeroben Bedingungen zu Laktat reduziert werden [Linnemann und Köhl, 2005]

Seit kurzem ist bekannt, dass in praktisch jeder CF-Sputum-Probe Laktat nachweisbar ist (Bensel, 2009). Es wurde untersucht, ob die CF-Haupterreger als Produzenten des Laktats in Frage kommen. *P. aeruginosa* ist unter anaeroben Bedingungen in der Lage, aus Glukose Pyruvat und schließlich Laktat zu bilden und somit ein Langzeitüberleben unter anaeroben Bedingungen zu erreichen (Eschbach et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass *P. aeruginosa* und *B. cepacia* unter anaeroben Bedingungen *in vitro* praktisch kein Laktat produzieren. *S. aureus* produzierte lediglich in der logarithmischen Wachstumsphase kleine Laktatmengen (Bensel, 2009). Dass das Laktat hauptsächlich von den ebenso im Mukus enthaltenen PMN gebildet wird, wurde mithilfe von Buffy Coats (Leukozytenkonzentrate) ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass PMN unter anaeroben Bedingungen nahezu 3 mal soviel Laktat produzieren, als unter aeroben Bedingungen (Bensel, 2009). Das von den PMN produzierte Laktat ist demnach ein im Inflammationsgeschehen sezerniertes Produkt, das die Aktivität der PMN widerspiegelt.

Seit kurzem ist bekannt, dass auch in der Lunge von Patienten mit Idiopathischer Lungenfibrose (IPF) erhöhte Laktat-Konzentrationen messbar sind (Kottmann et al., 2012). Auch bei der IPF sind die PMN zahlreich in der Lunge vorhanden (Hunninghake et al., 1981; Ulrich et al., 2010; Worlitzsch et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass das Laktat die Myofibroblastendifferenzierung in der IPF-Lunge induziert (Kottmann et al., 2012). Welchen Einfluss das Laktat auf das CF-Lungengewebe hat, ist bisher nicht geklärt.

1.5 LAKTATDEHYDROGENASE IM SPUTUM VON CF-PATIENTEN

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisch gelöstes Enzym, das in vielen Geweben vorkommt. Es sind 5 Isoenzyme bekannt. LDH 1 und 2 finden sich hauptsächlich in Herzmuskel, Erythrozyten und Nierenzellen. LDH 3 stammt hauptsächlich aus Milz, Lunge, Lymphknoten, Thrombozyten und endokrinen Drüsen. LDH 4 und 5 finden sich vor allem in Leber und Skelettmuskel. Eine Erhöhung der Gesamt-LDH kann bei akutem Myokardinfarkt, Lebererkrankungen, Lungenembolie oder auch Skelettmuskelschäden und Nierenerkrankungen vorkommen (Halwachs-Baumann, 2011). Ebenso wie Laktat ist auch LDH im CF-Sputum nachweisbar (Bensel 2009). Ob LDH als Entzündungsmarker im CF-Krankheitsgeschehen geeignet ist, ist bisher unklar.

1.6 ENTZÜNDUNGSMARKER ZUR THERAPIEÜBERWACHUNG

Um den Erfolg von antiinflammatorischer und antiinfektiver Therapie zu kontrollieren, wird die Spirometrie zur Überprüfung der Lungenfunktion verwendet. Bei erfolgreicher Therapie sollte es zu einer Verbesserung der gemessenen Lungenfunktion wie der FEV₁ kommen. Die Messung der Lungenfunktion mittels Spirometrie oder Bodyplethysmographie setzt eine gewisse Compliance des Patienten voraus und ist dazu körperlich anstrengend. Die Ergebnisse eines Patienten können daher sehr variieren (Aurora et al., 2000).

Hinzu kommt, dass in fortgeschrittenen Krankheitsstadien die Lungenfunktionswerte durch die strukturelle Schädigung der Lunge schlecht sind und auch unter einer Therapie nicht wesentlich gebessert werden können. Der Therapieerfolg ist dann nur schwer festzustellen. Weitere objektivere Messmethoden wie Marker könnten Krankheits- und Therapieverläufe genauer und vergleichbarer detektieren.

Traditionelle Marker sind beispielsweise LDH und CRP. Sie werden in der Routinediagnostik zahlreicher Krankheitsbilder angewendet, um einen Zellschaden (LDH) oder eine Entzündung (CRP) zu registrieren. Wird im Serum eine LDH-Konzentration >250 U/l gemessen, so ist davon auszugehen, dass ein Zellschaden im Körper vorliegt. Durch Bestimmung des Isoenzym-Typs wäre eine Eingrenzung der Lokalisation möglich (Tiller und Stein, 2005; Dörner, 2009). CRP ist ein Akute-Phase-Protein, das mit einer Verzögerung von 12 bis 24 Stunden eine Entzündung im Serum anzeigt. Der Referenzwert für das CRP im Serum liegt bei <5 mg/l. Wird dieser überschritten, so ist ein entzündlicher Prozess wahrscheinlich. Das CRP liefert keine Information zur Entzündungslokalisation. Stärkster Stimulus für eine CRP-Erhöhung ist eine bakterielle Entzündung (Bühler et al., 2003; Tiller und Stein, 2005; Dörner, 2009).

Mehrere Substanzen wurden bereits auf ihre Fähigkeit, als Entzündungsmarker im CF-Krankheitsgeschehen zu fungieren, untersucht. Es stellte sich heraus, dass proinflammatorische Marker wie PMN-Elastase, TNF- α und auch IL-8 aus Serum oder Sputum nicht geeignet sind, eine akute Entzündung im CF-Krankheitsverlauf anzuzeigen (Wolter et al., 1999).

Die Serumwerte von VEGF (vascular endothelial growth factor) sind bei CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht und sinken nach Behandlung einer akuten

Exazerbation wieder (McColley et al., 2000). KL-6, ein Muzin, welches von Pneumozyten Typ II und Clarazellen gebildet wird, ist ein sensitiver Serummarker für verschiedene interstitielle Lungenerkrankungen wie exogen allergische Alveolitis und pulmonale Sarkoidose (Kohno et al., 1989; Kobayashi und Kitamura, 1996). Ohshimo et al. untersuchten 2009, ob KL-6 auch für die CF als non-invasiver Marker in Frage kommt. Es konnte demonstriert werden, dass KL-6 besser zwischen Gesunden und CF-Patienten differenziert als CRP und LDH (Ohshimo et al., 2009). KL-6 sei den Untersuchungen zu Folge ein geeigneter Marker für einen strukturellen Lungenschaden. Demnach kann damit eine fortgeschrittene Fibrose registriert werden, aber beispielsweise keine Diagnosestellung erfolgen.

Im Sputum von CF-Patienten wurden hohe Konzentrationen von extrazellulärer Myeloperoxidase (MPO) gemessen (Meyer und Zimmermann, 1993). MPO ist ein von den PMN gebildetes Enzym, das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Sauerstoffradikale umwandelt. Diese spielen eine wesentliche Rolle für die Immunabwehr des Wirts und gelten deshalb als Marker einer PMN-Aktivierung und Atemwegsinflammation (Worlitzsch et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der MPO im CF-Sputum mit den Lungenfunktionsparametern umgekehrt korreliert (Regelmann et al., 1995).

Das Messen von MPO im Sputum, das Erfassen von H_2O_2 im Atemkondensat und die Messung der PMN-Elastase sind im Rahmen von Studien durchführbar, als Routinediagnostikmaßnahmen in der Klinik jedoch eher ungeeignet. Es handelt sich demnach nicht um einfach messbare und stabile Markersubstanzen.

In einer aktuellen Metaanalyse wurden von Shoki et al. (2013) 78 Serummarker, die im Zusammenhang mit CF stehen, bewertet. Dabei handelte es sich hauptsächlich um inflammatorische Zytokine, Akute Phase Proteine und Marker von oxidativem Stress. Es zeigte sich, dass CRP den Krankheitsverlauf gut widerspiegeln kann und somit als Entzündungsmarker der CF im Blut gut geeignet ist (Shoki et al., 2013).

Es lässt sich zusammenfassen, dass bestimmte Marker eher wenig geeignet sind (PMN-Elastase, $TNF-\alpha$ und IL-8) und einige eher besser geeignet scheinen, den CF-Krankheitsverlauf zu überwachen (KL-6 und VEGF). Routinemäßig bestimmt wird bisher jedoch weiterhin lediglich das CRP. Die bisher untersuchten Marker haben sich offenbar aus unterschiedlichen Gründen nicht etabliert.

2 ZIELSTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Laktat als Entzündungsmarker im Sputum von CF-Patienten zu evaluieren. Im Einzelnen sollten dazu folgende Aspekte *in vivo* und *in vitro* untersucht werden:

- Bestimmung der Laktat- und LDH-Konzentration im CF-Sputum
- Messung von Laktat und LDH-Werten in BAL-Proben von CF-Patienten
- Korrelation der Laktat-Werte mit dem jeweiligen klinischen Zustand der Patienten (CRP und FEV₁)
- Vergleich der Laktat- und LDH-Konzentrationen im Sputum von Non-CF-Patienten
- Vergleich der Laktat- und LDH-Konzentrationen in BAL-Proben von Non-CF-Patienten
- Identifizierung und Quantifikation der im Sputum enthaltenen Bakterien
- Korrelation von Keimzahlen und Laktat-Werten im CF-Sputum
- Testen der Stabilität von Laktat unter verschiedenen äußeren Bedingungen
- Vergleich der Stabilität von Laktat und LDH

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 PATIENTEN

3.1.1 CF-Patienten

Es nahmen 27 Patienten, bei denen im Vorfeld die Diagnose CF durch einen Schweißtest und eine Genotypisierung bestätigt wurde, an den Untersuchungen teil. Alle Patienten waren in regelmäßiger Betreuung in der CF-Ambulanz des Universitätsklinikums und der Poliklinik für Innere Medizin I, Halle (Saale). Es handelte sich dabei um 14 Männer und 13 Frauen. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug $31,2 \pm 10,9$ Jahre. Die Altersspanne lag zwischen 21 und 67 Jahren. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erteilte am 06.04.2006 ein positives Votum (siehe Anhang Seite 64).

Es wurden insgesamt 82 Sputum-Proben der 27 CF-Patienten nach einem standardisierten Verfahren bearbeitet. Die Sputumexpektoration erfolgte stets spontan, ohne Induktion. Die Patienten, die sich bei der Vorstellung zum Teil in einer akuten Exazerbation befanden, gaben das Sputum direkt in der Ambulanz ab. In Abhängigkeit vom klinischen Zustand der Patienten erfolgte eine weitere Therapie entweder unter ambulanten oder stationären Bedingungen. Das Sputum wurde in sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen (Art.-Nr. 17-1020, TPP Products AG, Trasadingen, Schweiz) entgegen genommen. Die Bearbeitung erfolgte unmittelbar nach Erhalt der Sputum-Probe.

Zusätzlich konnten 22 Proben von 3 CF-Patienten während der Durchführung einer BAL gewonnen werden. Die BAL erfolgte dabei jeweils durch einen Oberarzt/eine Oberärztin in der endoskopischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Halle. Bei nativen Proben wurde unverdünnter Mukus direkt endobronchial abgesaugt. Nach Lavage mit Kochsalzlösung erhaltene Proben wurden entsprechend der Verdünnung weiterbearbeitet. Des Weiteren erfolgte die Zuordnung der Probe zum jeweiligen Segmentbronchus, aus der sie gewonnen wurde. Die BAL-Proben wurden anschließend in gleicher Weise wie die Sputum-Proben bearbeitet.

Wenn vorhanden, wurden den abgegebenen Proben klinische Angaben wie der aktuelle Allgemeinzustand, Auskultationsbefund, CRP- und Lungenfunktionswerte beigeordnet. Zeitnahe Lungenfunktionswerte lagen für 53 Proben vor, sie wurden als

altersentsprechende FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde) angegeben.

3.1.2 Non-CF-Patienten

Zum Vergleich wurden 8 Sputum-Proben und 10 BAL-Proben von 14 Patienten mit anderen Lungenerkrankungen als CF untersucht. Dazu gehörten 7 Patienten mit einem Bronchialkarzinom, 11 der 14 Patienten hatten eine chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), 2 Patienten mit einer Pneumonie, und jeweils 1 Patient mit pulmonalen Metastasen, Pleuraerguss, und V. a. Sarkoidose. Alle Patienten, die eine Sputum-Probe abgeben konnten, litten an einer COPD. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenabgabe in stationärer Behandlung auf der Station für Pneumologie des Departments für Innere Medizin I. Es handelte sich hierbei um 13 Männer und eine Frau. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug $63,0 \pm 8,0$ Jahre. Die Altersspanne lag zwischen 49 und 78 Jahren. Die Proben wurden in gleicher Weise wie die Proben der CF-Patienten bearbeitet.

3.2 BEARBEITUNG DER SPUTUM- UND BAL-PROBEN

Das spontan von den Patienten expektorierte Sputum wurde in sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und direkt nach Erhalt weiter verarbeitet. Dazu wurde das Gewicht der Proben ermittelt (Feinwaage Adventure ARA 520, Ohaus GmbH, Gießen, Deutschland). Um das zähe Sputum (Abb. 6) weiter verarbeiten zu können, musste es zunächst verdünnt werden. Das Sputum wurde 1 zu 1 mit autoklavierter Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (phosphat buffered saline, PBS) versetzt und durchmischt (Reagenzglasschüttler, Reax-Top, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Deutschland). Die 1 : 20 verdünnte PBS-Puffer-Stammlösung besteht aus 85 g NaCl, 14,23 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O und 1,35 g KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland), gelöst in 500 ml destilliertem Wasser und hat einen pH-Wert von 7,4.

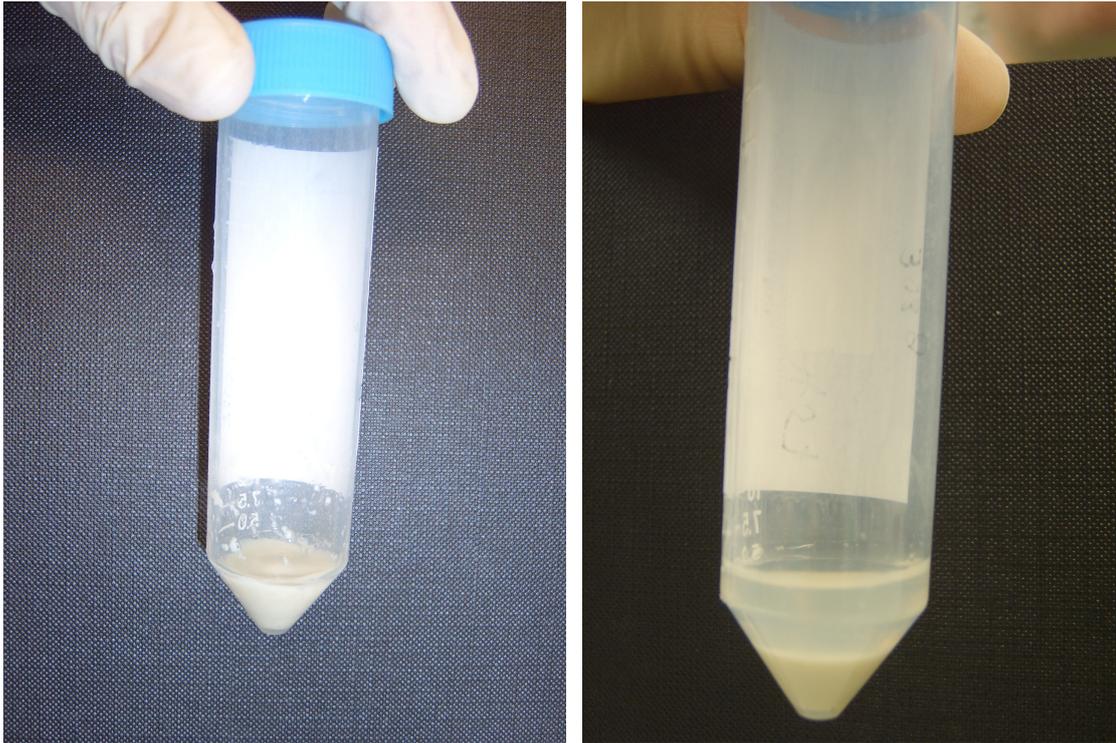


Abb. 6: Links: Falcon-Röhrchen mit Sputum vor der Bearbeitung
Rechts: Nach Zusetzen von Phosphat gepufferter Kochsalzlösung und Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 min

Aus der Sputum-PBS-Lösung im Falcon-Röhrchen wurden 100 μ l steril abpipettiert (Eppendorf-Pipette, Art.-Nr. B007.1, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland; Pipettenspitze, Art.-Nr. B007.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und zur anschließenden Bakterienquantifikation und -identifikation in ein steriles Eppendorf-Röhrchen (Reaktionsgefäß 1,5 ml, Art.-Nr. 7551.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Native Proben aus den BAL-Untersuchungen wurden wie die Sputum-Proben behandelt. Verdünnte BAL-Proben wurden nicht noch einmal verdünnt. Die weitere Verarbeitung war analog zu den Sputum-Proben.

Das Falcon-Röhrchen mit dem verdünnten Sputum wurde nun mit einem entsprechenden Gegengewicht für 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Abb. 6). Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein Präparateglas (Gewindepräparateglas mit Schraubkappe, Art.-Nr. 391H6110, Scherf Europa GmbH, Meiningen, Deutschland) gegeben (Abb. 7).

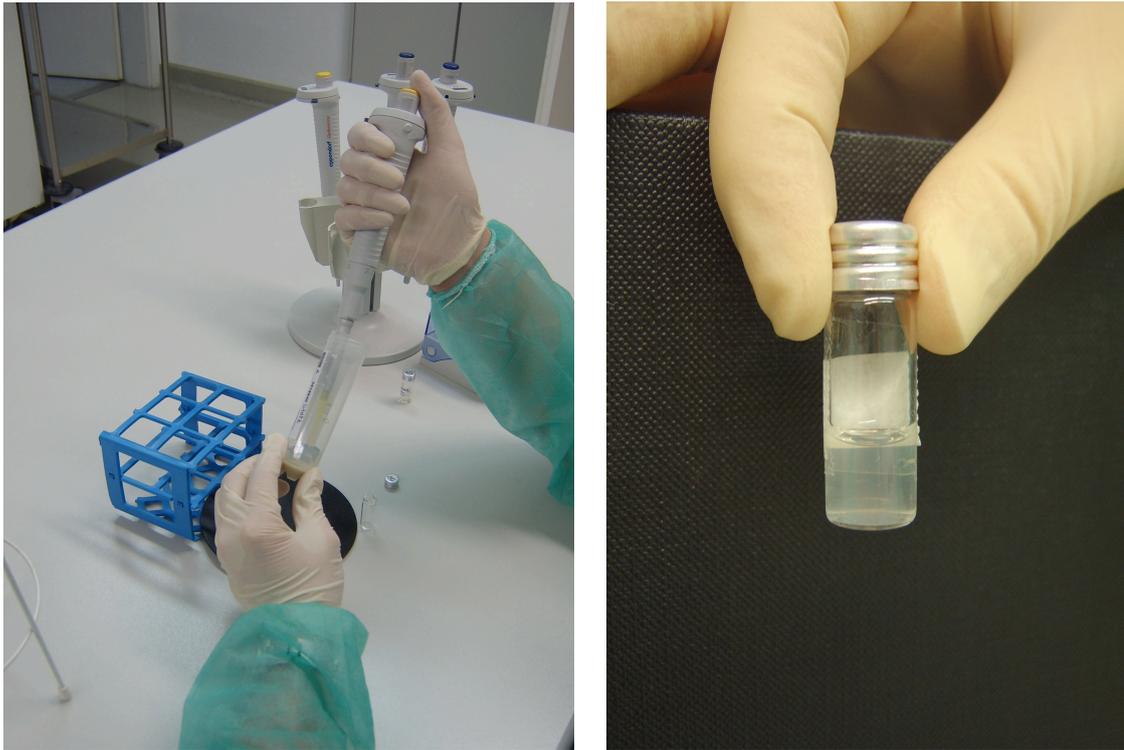


Abb. 7: Links: Der Überstand wird nach Zentrifugierung abgehoben
Rechts: Überstand in Präparateglas abgefüllt

Es wurden mindestens 300 µl des Überstandes zur Bestimmung der Laktat- und LDH-Konzentration in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle gesendet. Die restliche überstehende Lösung wurde für weitere Untersuchungen in ein steriles Präparateglas gegeben und bei -51°C eingelagert. Auch das restliche Sputum wurde im Falcon-Röhrchen der Lagerung bei -51°C zugeführt.

3.3 LAKTAT- UND LDH-MESSUNG

Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle erfolgte die quantitative Bestimmung der Laktat- und LDH-Konzentration mit dem SYNCHRON®-System (Synchron LX System, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Dies ist ein automatisches Testsystem zur spektrophotometrischen Bestimmung von L-Laktat. Das optimale Probenvolumen zur Messung beträgt 300 µl. Diese wurden in ein Primärröhrchen gegeben. Die Zugabe des LAC-Reagenz (Kit Art.-Nr.: 445875, Beckman Coulter GmbH) erfolgte automatisch. Die Laktatoxidase wandelt Laktat in Pyruvat um. Dabei entsteht gleichzeitig Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dies reagiert bei Katalysierung durch Peroxidase mit Dichlorbenzolsulfonsäure (DCBSA) und 4-Aminoantipyrin (4-AAP) zu einem Chromophor. Das entstandene Chromophor bewirkt eine Änderung der Extinktion, welche bei einer Wellenlänge von 520 nm überwacht wird. Die Extinktionsänderung ist direkt proportional zur Laktat-Konzentration.

Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte ebenfalls mit dem SYNCHRON[®]-System als kinetisch enzymatische Methode. Zur Probe wurde das LD-Reagenz (Kit Art.-Nr.: 442655, Beckman Coulter GmbH) automatisch dazugegeben. Bei der daraufhin erfolgenden Reaktion katalysiert LDH die reversible Oxidation von L-Laktat zu Pyruvat. Dabei erfolgt gleichzeitig die Reduktion von β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu reduziertem β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH). Die Reaktion bewirkt eine Extinktionsänderung, welche vom System bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wurde. Diese Extinktionsänderung ist direkt proportional zur LDH-Aktivität und dient dem System zur Berechnung des Wertes.

3.4 BAKTERIENQUANTIFIZIERUNG

Als Vorbereitung für die Herstellung einer Verdünnungsreihe wurden 10 sterile Eppendorf-Röhrchen mit 900 μ l sterilem PBS-Puffer befüllt und beschriftet. Um das zähe Sputum pipettieren zu können, wurde der Probe bereits die gleiche Menge PBS-Puffer hinzugefügt. Aus dieser Lösung wurden 100 μ l für eine Verdünnungsreihe mit 10 Verdünnungsstufen entnommen. Die 100 μ l Bakteriensuspension wurden in das erste vorbereitete Eppendorf-Röhrchen gegeben und auf dem Schüttelrührer durchmischt. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe wurden mit einer neuen sterilen Pipettenspitze wiederum 100 μ l entnommen und in das nächste Eppendorf-Röhrchen mit 900 μ l sterilem PBS-Puffer gegeben und erneut durchmischt. Dieser Vorgang wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} wiederholt.

Als Nährmedium zur Anzucht wurden die den Bedürfnissen der Bakterien entsprechenden Agarplatten verwendet. Zur Quantifikation und Identifikation der Aeroben bzw. fakultativen Anaerobier wurden Columbia-Agar-Platten (Art.-Nr. PB5008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland), (COL-Platte) verwendet. Für die obligaten Anaerobier wurden Schaedler-Agar-Platten (Schaedler-Agar, Art.-Nr. 43401, bioMérieux® sa, Marcy-l'Étoile, Frankreich), (SCS-Platten) und CDC-Agar-Platten (Art.-Nr. PA256506, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) benötigt. Für jede Verdünnungsstufe waren im Sinne einer Doppelbestimmung 2 Felder vorgesehen. Jeweils zweimal 10 μ l wurden aus einem Eppendorf-Röhrchen entnommen und in dem entsprechenden Feld auf der Agar-Platte aufgetragen.

Die SCS-Platten zur Identifikation anaerober Bakterien wurden daraufhin direkt in die Anaerobierbank (Modular Atmosphere Controlled System, MG500, Meintrup dws, Lähden-Holte, Deutschland) gebracht und für mindestens 48 Stunden bei 37 °C

bebrütet. Die COL-Platten zur Identifikation aerober bzw. fakultativ anaerober Bakterien wurden im aeroben Brutschrank (Heraeus Typ B6420, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet.

Nach der jeweiligen Bebrütung erfolgte die Auszählung der Platten für jeden makroskopisch und mikroskopisch (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) sichtbaren Bakterienstamm separat. In einer Sputum-Probe konnten bis zu 5 unterschiedliche aerobe Erreger entdeckt werden. Jeder Bakterienstamm erhielt eine Subkulturbezeichnung. Jeweils eine isoliert stehende Kolonie eines Stammes wurde zur Durchführung der Identifikation entnommen und auf einer für diese Subkultur beschrifteten Agar-Platte ausgestrichen (Einweg-Impfschlinge, Art.-Nr. 731101, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland). Anschließend wurde dieser Dreiösenausstrich entsprechend aerob oder anaerob bebrütet. Damit lag zu jedem in der Verdünnungsreihe angewachsenen Erreger die Keimzahl vor. Im Anschluss erfolgte die Identifikation (Abb. 8).



Abb. 8: Dreiösenausstrich nach Quantifizierung und vor Identifizierung. Links: identifiziert als *P. aeruginosa*. Rechts: identifiziert als *S. aureus*.

3.5 BAKTERIENIDENTIFIZIERUNG

Nach 24 Stunden aerober Bebrütung wurden die COL-Platten mit dem Dreiösenausstrich der aeroben bzw. fakultativ anaeroben Bakterien dem Brutschrank zur weiteren Bearbeitung entnommen. Zuvor wurden die Platten auf Verunreinigungen kontrolliert. Lediglich Subkulturen, die sich einheitlich und nicht verunreinigt darstellten, wurden identifiziert.

Zunächst wurde eine Gram-Färbung angefertigt. Auf einem Objektträger (Art.Nr. M 7620, Süsse GmbH, Gudensberg, Deutschland) wurde eine Bakterienkolonie mit einem Tropfen steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung (isotonische Kochsalzlösung, steril, Art.-Nr. 30911P, B. Braun, Melsungen, Deutschland) getrocknet und hitzefixiert. Verwendet wurde ein Gramfärbe-Set (Färbe Set, Gram-color modifiziert, phenolfrei, Art.-Nr. 1.01603-0001, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Bakterien konnten in gramnegativ und grampositiv eingeteilt werden.

Zur weiteren Identifikation der Bakterien wurden standardisierte Testverfahren verwendet. Als teilautomatisches Identifikationssystem wurde das Vitek[®] Senior-System (Senior Modell 120, bioMérieux) benutzt. Die speziellen Testkarten des Systems enthalten Mikroküvetten, in denen sich unterschiedliche biochemische Substrate befinden. Die Substrate werden durch die Bakterien spezifisch metabolisiert. Diese Metabolisierung ändert die Lichtdurchlässigkeit der Testkarten und kann so vom Vitek[®]-System erfasst werden. Es wurde eine Kolonie mittels steriler Impföse abgehoben und in ein mit 1,8 ml 0,45 %-iger NaCl-Lösung (Art.-Nr. V 1204, bioMérieux sa) gefülltes steriles Röhrchen (Art.-Nr. 55.476, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegeben. Die Bakteriensuspension sollte einem vorgegebenen McFarland-Standard entsprechen. Die Vitek[®]-Testkarte wurde im Ständer in die Vitek[®]-Kammer gestellt. Durch den Unterdruck wird die Vitek[®]-Testkarte mit der Bakteriensuspension befüllt. Anschließend wurde die Vitek[®]-Testkarte in der Inkubator-Ableseeinheit platziert. Die Vitek[®]-Testkarten werden bei 35°C bebrütet und in einem Intervall von 30 min auf veränderte Lichtdurchlässigkeit überprüft. Nach 2 bis 18 Stunden entsteht ein Reaktionsmuster, welches von der Vitek[®]-Software ausgewertet wird. Anhand des Reaktionsmusters gibt das Vitek[®]-System an, um welchen Erreger es sich handelt und mit welcher Wahrscheinlichkeit dies zutrifft. Lag die Wahrscheinlichkeit unter 85 %, wurde auf das BD-BBL-Crystal-Identifikationssystem zurückgegriffen.

Das BD-BBL-Crystal-Set besteht aus einem Inokulum (BBL Crystal Enteric/Stool ID Inoculum Fluid) und einem Kammer-Stempel-System, in dem sich unterschiedliche Substrate befinden. Die Bakterien reagieren mit den Substraten im Kammer-Stempel-System. Dabei entstehen Farbumschläge, welche für die Bakterien spezifisch sind.

Je nachdem, ob es sich um einen grampositiven (BD BBL Crystal) oder einen gramnegativen (BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID Kit) Erreger handelte, musste das entsprechende Set ausgewählt werden. Es wurde eine Kolonie von der COL-Platte mittels sterilem Wattestäbchen (Watteträger, Art.-Nr. 132436, Böttger, Bodenmais,

Deutschland) abgehoben, in das entsprechende Inokulum-Röhrchen gegeben und durchmischt. Die Bakteriensuspension mit vorgegebenem McFarland-Standard wurde in das Kammer-System gefüllt und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurde ein BD-Crystal-Stempel hineingesteckt. Nach circa 30 Sekunden wurde das Kammer-Stempel-System umgedreht, mit der jeweiligen Subkulturbezeichnung beschriftet und im aeroben Brutschrank bei 37°C gelagert. Nach 18 Stunden wurde das Identifikationssystem ausgewertet. Vor der Auswertung erfolgte ein Oxidase-Test (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art.-Nr. 231746, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), ein Katalase-Test (ID Color Katalase (ID-Ase), Art.-Nr. 55561, bioMérieux sa) und ein Latexagglutinations-Test (Staphaurex Plus, Art.-Nr. ZL 33, remel, Lenexa, KS, USA). Mit den Ergebnissen der Tests sowie den Informationen der BD-Crystal-Karten erfolgte die Auswertung der Identifikation mit Hilfe der BD-Crystal-Software.

In Vorbereitung auf die Identifikation der obligat anaeroben Bakterien wurde eine Gramfärbung durchgeführt. Die Identifikation wurde mit dem biochemischen Identifikationssystem RapID™ ANA II und der dazugehörigen Software ERIC™ (Eric Software, Elektronisches RapID™ Kompendium, Version 1.0. Art.-Nr. R 8323600, remel) durchgeführt. Es wurden mehrere Kolonien einer Subkultur mittels sterilem Watteträger abgehoben und in das RapID™ ANA II Inokulum-Röhrchen gegeben (1 ml, Art.-Nr. 8325102, remel). Die Inokulum-Lösung sollte eine OD entsprechend McFarland-Standard 3,0 erreichen. Die Lösung wurde in das RapID ANA II Panel (Art.-Nr. R8311002, remel) gegossen. Die Panels wurden nun für 4 Stunden bei 37 °C im aeroben Brutschrank gelagert. Zunächst konnten die Ergebnisse als unterschiedlicher Farbumschlag in den Reaktionskammern 1-10 abgelesen und dokumentiert werden. Danach wurde in die Reaktionskammern 3 bis 9 das RapID™ ANA II Reagenz und in die Reaktionskammer 10 das RapID™ ANA II Spot-Indolreagenz gegeben. Alle Ergebnisse zusammen ergaben einen Microcode. Dieser Microcode wird mit den Informationen zum Gramfärbeverhalten und der Angabe der Morphologie der Bakterien in die ERIC™ Software eingegeben. Das System gibt an, um welchen obligat anaeroben Erreger es sich handelt und mit welcher Wahrscheinlichkeit dies zutrifft. Bei einer Wahrscheinlichkeit unter 80 %, wurde die Identifikation wiederholt. Wenn die Ergebnisse wiederholt unter 80 % lagen, wurde die Subkultur ausgeschlossen.

3.6 STABILITÄT VON LAKTAT UND LDH

Es wurde untersucht, ob die Laktat- und LDH-Werte bei verschiedener Lagerung stabil bleiben. Dafür wurden die Überstände von 18 Sputum-Proben unterschiedlichen

Lagerungsbedingungen zugeführt. Ausgewählt wurde die Lagerung im Kühlschrank bei $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie im Gefrierschrank bei $-51 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Für jede dieser 18 Sputum-Proben wurden 5 sterile Präparategläschen mit dem bei der Zentrifugation erzeugten Überstand befüllt. Glas 1 wurde sofort ins Zentrallabor des Universitätsklinikums zur Laktat- und LDH-Bestimmung gegeben. Glas 2 und 3 wurden der Lagerung bei $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank zugeführt. Glas 4 und 5 wurden bei $-51 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ im Gefrierschrank eingelagert. Glas 2 und Glas 4 wurden nach 7 d der Kühlung entnommen und zur Bestimmung ins Zentrallabor gegeben. Nach 30 d erfolgte dies ebenso für Glas 3 und Glas 5 (Tab. 1).

Tab. 1: Lagerung und Zeitpunkt der Laktat- und LDH-Messung

Zeitpunkt der Messung	Ohne Lagerung	Lagerung bei $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	Lagerung bei $-51 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
Nach 0 Tagen	Glas 1	-	-
Nach 7 Tagen	-	Glas 2	Glas 4
Nach 30 Tagen	-	Glas 3	Glas 5

3.7 STATISTIK

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm STABW) angegeben. Unterschiede zwischen metrischen Variablen wurden mit Hilfe des t-Tests analysiert und die Korrelation mittels Pearson Korrelationskoeffizient r bestimmt. Es wurde keine Adjustierung für mehrfaches Testen vorgenommen, damit sind alle p -Werte als explorativ zu interpretieren.

4 ERGEBNISSE

4.1 LAKTAT IN SPUTUM UND BAL VON CF- UND NON-CF-PATIENTEN

In 81 unverdünnten Sputum-Proben von CF-Patienten wurde die Laktat-Konzentration bestimmt. Die Laktat-Werte lagen bei $3,1 \pm 2,8$ mmol/l, es wurden Werte zwischen 0,1 mmol/l und 12,4 mmol/l erfasst. In 8 untersuchten Sputum-Proben von 7 Non-CF-Patienten waren Laktat-Werte zwischen 0,3 und 2,6 mmol/l messbar. Die mittlere Laktat-Konzentration im Non-CF-Sputum war mit $1,5 \pm 0,9$ mmol/l niedriger als im CF-Sputum ($p=0,118$) (Abb. 9).

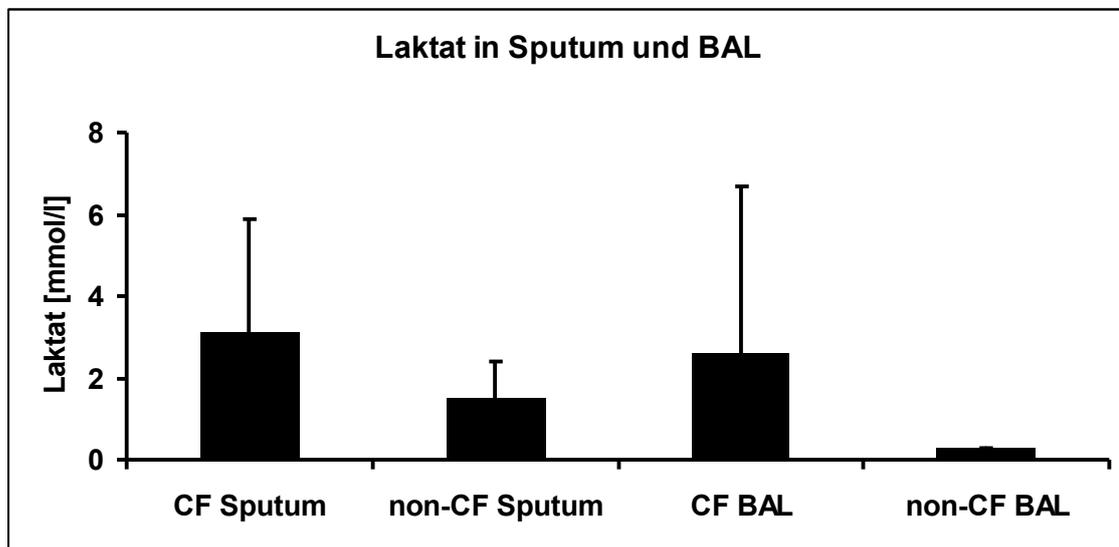


Abb. 9: Laktat in Sputum von CF-Patienten (n=81) und von Non-CF-Patienten (n=8) sowie in unterschiedlich stark verdünnten BAL-Proben von CF-Patienten (n=22) und Non-CF-Patienten (n=10).

Bei 4 fraktionierten BAL wurde in 22 Proben von 3 CF-Patienten die Laktat-Konzentration untersucht. In allen Proben war Laktat nachweisbar. Die Laktat-Werte lagen bei $2,6 \pm 4,1$ mmol/l (Abb. 9). Es wurden Werte zwischen 0,1 und 16,8 mmol/l gemessen. Die nativen Laktat-Werte zu Beginn der fraktionierten BAL waren stets die höchsten in der Untersuchung ermittelten Werte. Bei zunehmender Verdünnung mit NaCl (die während der einzelnen Lavagen unterschiedlich durchgeführt wurde) verringerten sich die Konzentrationen in den Proben.

Es war kein relevanter Unterschied zwischen den Laktat-Werten in CF-Sputum und CF-BAL zu registrieren ($3,1 \pm 2,8$ mmol/l vs. $2,6 \pm 4,1$ mmol/l), wobei sich die Laktat-

Werte während einer BAL sehr stark änderten (Abb. 10). Dies beeinflusst die Aussagekraft dieses Vergleichs deutlich.

In 10 BAL-Proben von 9 Non-CF-Patienten wurde in allen Proben Laktat nachgewiesen. Die Werte lagen bei $0,3 \pm 0$ mmol/l (Abb. 9). Dabei waren Werte zwischen 0,3 und 0,4 mmol/l zu registrieren. Es besteht demnach ein deutlicher Unterschied zwischen den Laktat-Werten in Non-CF-Sputum und Non-CF-BAL, der durch die Lavagen während der BAL bedingt ist. Auch bei den Non-CF-Patienten kommt es in Abhängigkeit von der Menge des in der BAL angesaugten Sputums zu starken Fluktuationen der Laktat-Werte.

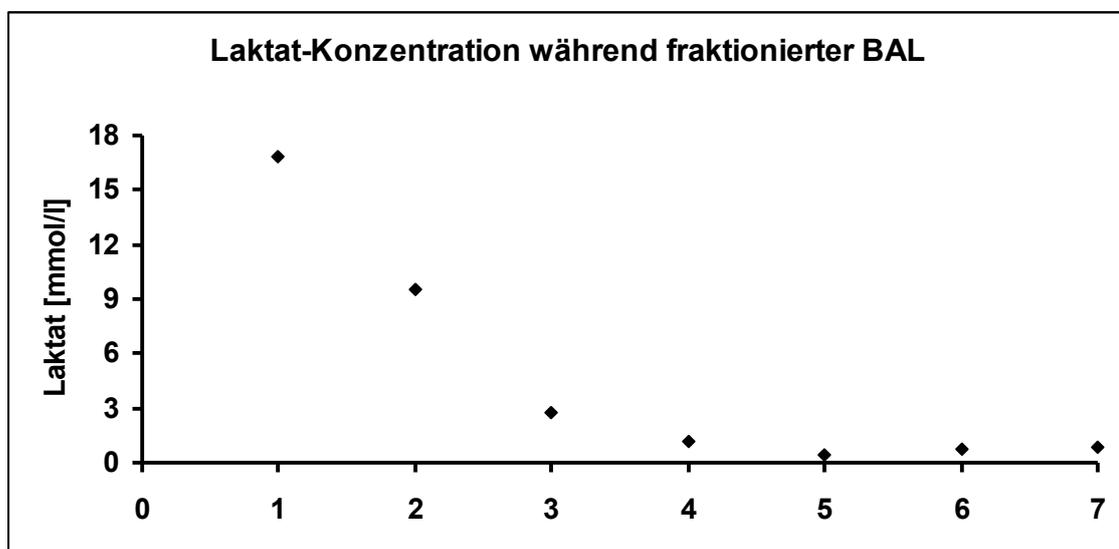


Abb. 10: Exemplarischer Verlauf der Laktat-Konzentrationen während einer fraktionierten BAL eines CF-Patienten. 1 = nativ, 2 bis 7 = erste bis sechste Lavage

Die Laktat-Konzentrationen im Sputum der CF-Patienten ($3,1 \pm 2,8$ mmol/l) sind gegenüber denen im Sputum der Non-CF-Patienten ($1,6 \pm 0,9$ mmol/l) erhöht ($p = 0,12$). Auch die Laktat-Konzentrationen in der BAL sind bei CF-Patienten höher als bei Non-CF-Patienten ($2,6 \pm 4,1$ mmol/l vs. $0,3 \pm 0,0$ mmol/l, $p = 0,09$). Die fraktionierte BAL bei CF-Patienten begann meist mit dem Absaugen von unverdünntem Mukus, was die hohen Laktat-Werte erklärt. Bei den Non-CF-Patienten dagegen war in keinem Fall sichtbarer Mukus vorhanden, so dass nicht abgesaugt, sondern bereits mit einer Lavage begonnen wurde. Dies erklärt die starken Unterschiede der Laktat-Konzentrationen in BAL von CF- und Non-CF-Patienten. In Abb. 10 ist exemplarisch der Verlauf der Laktat-Konzentration in einer fraktionierten BAL bei einem CF-Patienten dargestellt. Die Laktat-Konzentration ist nach zunehmender Spülung geringer.

4.2 LDH IN SPUTUM UND BAL VON CF- UND NON-CF-PATIENTEN

In 67 Sputum-Proben von CF-Patienten wurde die LDH-Konzentration gemessen. Die LDH-Werte betragen $119,7 \pm 96,3 \mu\text{mol/l}$ s, sie lagen zwischen $4,0 \mu\text{mol/l}$ s und $446,4 \mu\text{mol/l}$ s (Abb. 11). In 8 Sputum-Proben von 7 Non-CF-Patienten waren LDH-Werte zwischen $5,8$ und $58,8 \mu\text{mol/l}$ s messbar. Die mittlere LDH-Konzentration lag bei $19,4 \pm 17,7 \mu\text{mol/l}$ s. In 16 BAL-Proben von 3 CF-Patienten wurde die LDH-Konzentration bestimmt. Diese lag bei $84,5 \pm 166,4 \mu\text{mol/l}$ s. Die Werte lagen zwischen $2,7$ und $637,5 \mu\text{mol/l}$ s. In 10 BAL-Proben von 9 Non-CF-Patienten wurde in allen Proben LDH nachgewiesen. Die Werte lagen bei $5,1 \pm 7,3 \mu\text{mol/l}$ s, dabei waren Werte zwischen $0,3$ und $24,8 \mu\text{mol/l}$ s zu registrieren (Abb. 11).

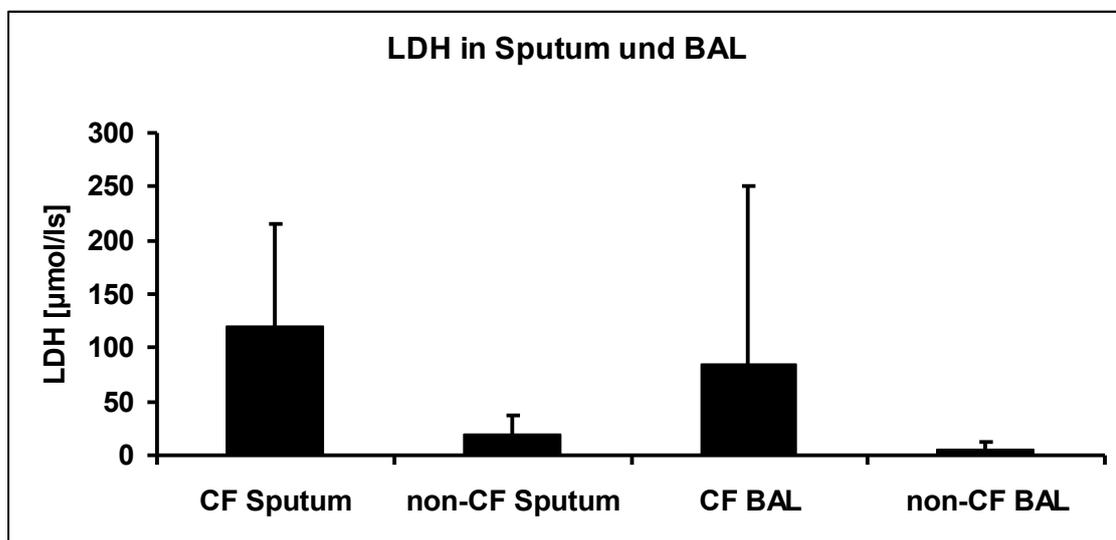


Abb. 11: LDH in Sputum von CF-Patienten (n=67) und von Non-CF-Patienten (n=8) sowie in unterschiedlich stark verdünnten BAL-Proben von CF-Patienten (n=27) und Non-CF-Patienten (n=16).

Die Mittelwerte der LDH-Konzentrationen waren in den Sputum-Proben von CF-Patienten höher als von Non-CF-Patienten ($119,7 \pm 96,3 \mu\text{mol/l}$ s vs. $19,4 \pm 17,7 \mu\text{mol/l}$ s, $p = 0,005$). Die LDH-Werte in den BAL-Proben von CF-Patienten waren höher als in den BAL-Proben von Non-CF-Patienten ($84,5 \pm 166,4 \mu\text{mol/l}$ s vs. $5,1 \pm 7,3 \mu\text{mol/l}$ s, $p = 0,15$). Die LDH-Konzentrationen in den Sputum-Proben sind höher als in den BAL-Proben ($119,7 \pm 96,3 \mu\text{mol/l}$ s vs. $84,5 \pm 166,4 \mu\text{mol/l}$ s für CF und $19,4 \pm 17,7 \mu\text{mol/l}$ s vs. $5,1 \pm 7,3 \mu\text{mol/l}$ s für Non-CF), was durch die Verdünnung der Proben bei der Lavage zu erklären ist (Abb. 11). Auch für die Messung der LDH-Werte gilt das oben Gesagte über die unterschiedlichen Verdünnungen bei der fraktionierten BAL.

4.3 KORRELATION VON LAKTAT UND LDH, FEV₁ SOWIE CRP

Es wurde der Zusammenhang zwischen Laktat und LDH im Sputum von 67 CF-Patienten ermittelt. Die Laktat- und LDH-Werte im CF-Sputum haben eine hohe positive Korrelation ($r = 0,87$; $p = <0,0001$). Eine hohe LDH-Aktivität geht mit einer hohen Laktat-Konzentration im CF-Sputum einher (Abb. 12). Die hohe Korrelation zwischen Laktat und LDH im Sputum spricht für eine gemeinsame Quelle, höchstwahrscheinlich die zahlreichen PMN im Sputum.

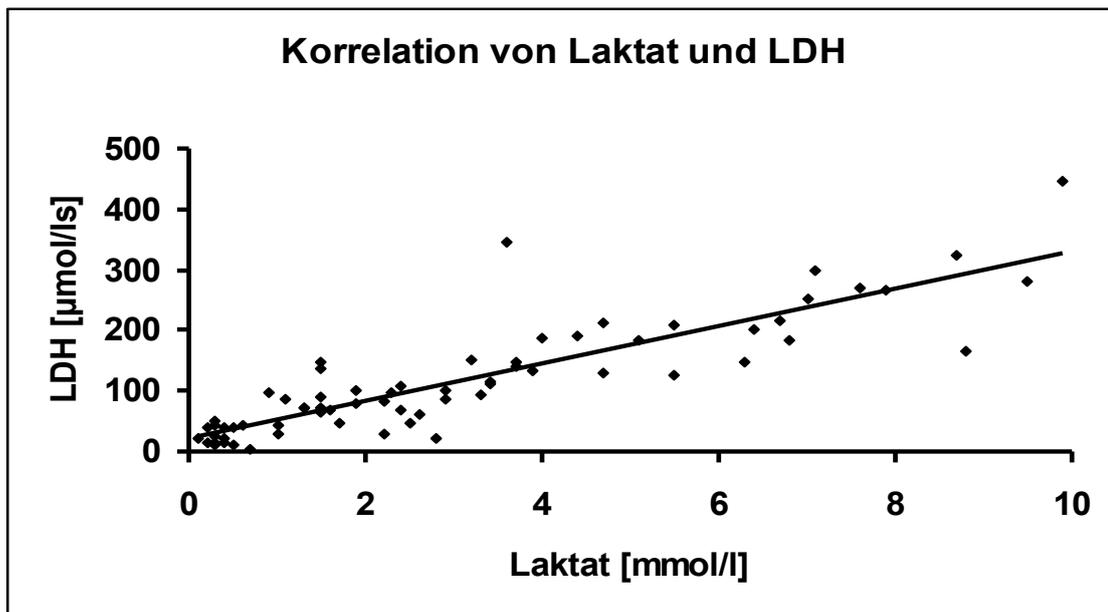


Abb. 12: Hohe Korrelation ($r = 0,87$; $p = <0,0001$) von Laktat- und LDH-Konzentration im CF-Sputum ($n = 67$).

Die FEV₁ von 53 CF-Patienten betrug $46,0 \pm 19,9$ %. Die Werte lagen zwischen 16,5 und 99,6 %. Es wurde der Zusammenhang zwischen Laktat und FEV₁ im CF-Sputum ermittelt. Es fand sich eine schwache negative Korrelation von Laktat im Sputum und der FEV₁ ($r = -0,34$; $p = 0,012$), (Abb. 13). Die schwach negative Korrelation beruht auf dem gemeinsamen Faktor einer starken Entzündung als Ursache für einen hohen Laktat-Wert und eine reduzierte Lungenfunktion (Abb. 13, Abb. 14).

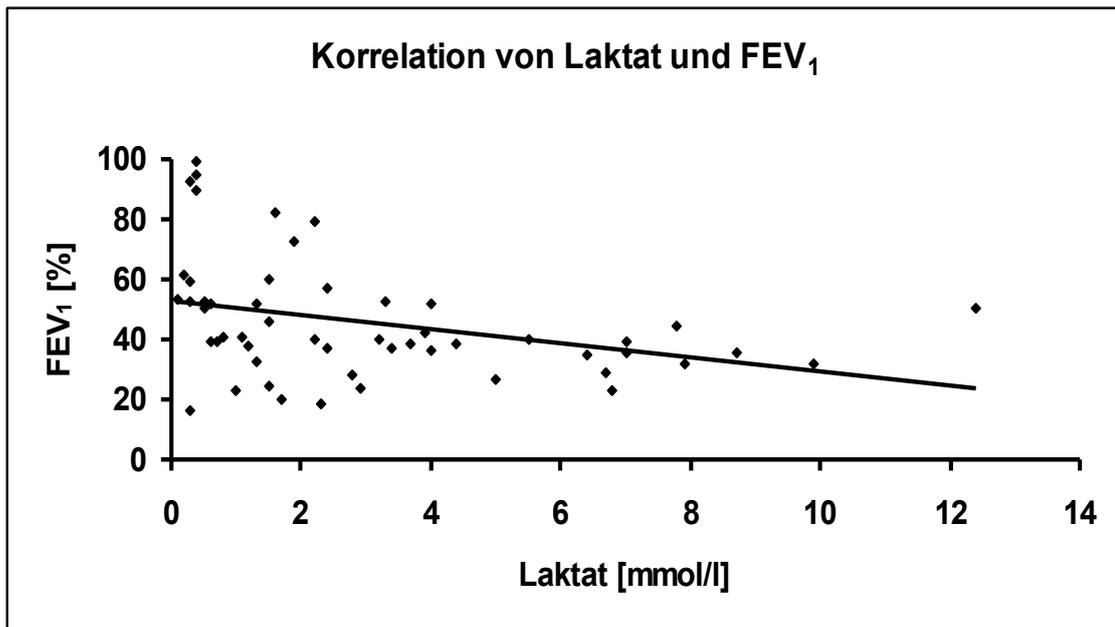


Abb. 13: Negative Korrelation ($r = -0,34$) von Laktat-Konzentration und FEV₁ ($n = 53$; $p = 0,012$).

In Abb. 14 wurde der exemplarische Verlauf von Laktat und FEV₁ bei einem Patienten dargestellt. Die Linien verlaufen annähernd gespiegelt. Bei niedrigeren Laktat-Werten sind höhere FEV₁-Werte zu verzeichnen und *vice versa* (Abb. 14).

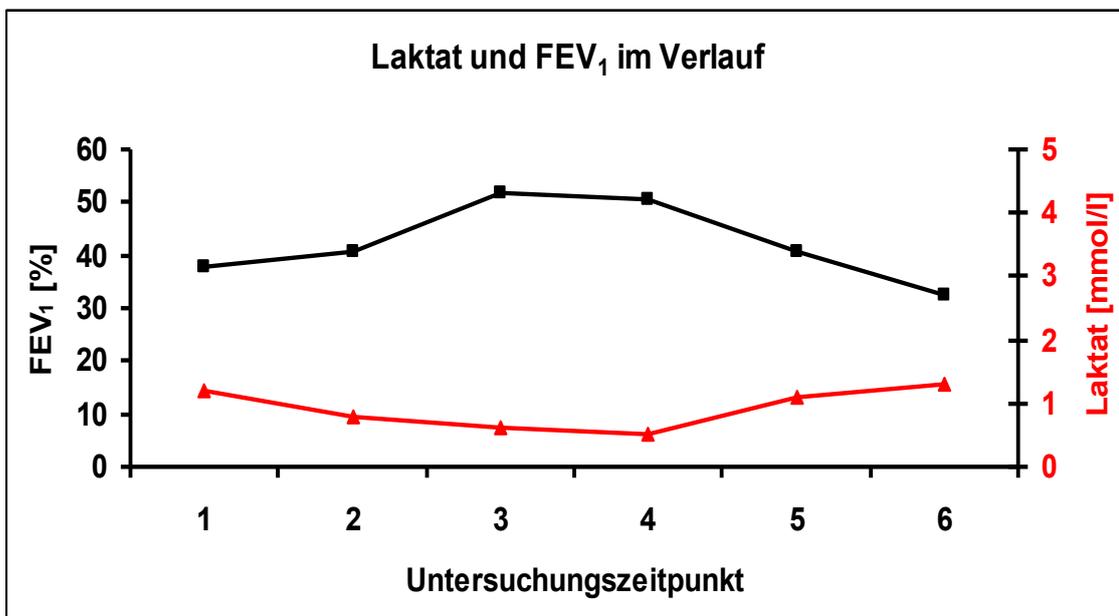


Abb. 14: Verlauf von FEV₁ und Laktat im Zeitraum von 5 Monaten bei einem exemplarischen Patienten. Daten der Untersuchung: 1 = 01.07.2008; 2 = 23.07.2008; 3 = 30.09.2008; 4 = 21.10.2008; 5 = 25.11.2008; 6 = 09.12.2008

Die Ermittlung des Zusammenhangs der Laktat-Konzentration im Sputum und des CRP im Serum bei 32 CF-Proben ergab eine schwache positive Korrelation ($r = 0,33$; $p = 0,065$). Der Korrelationskoeffizient liegt damit noch unter dem für Laktat und FEV_1 ermittelten Wert (Abb. 13, Abb. 15).

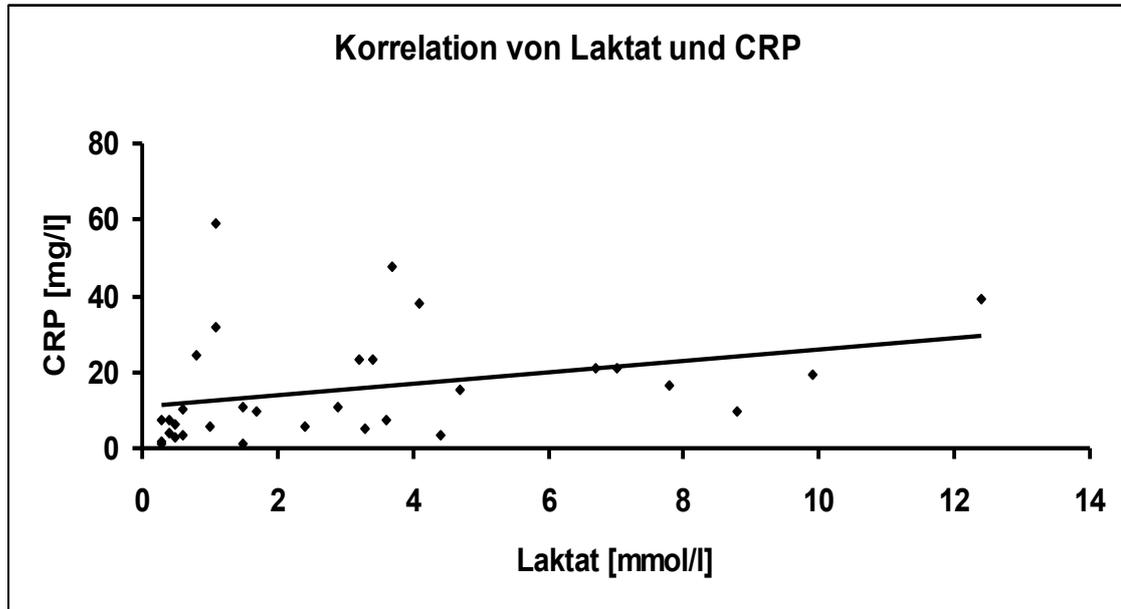


Abb. 15: Schwache positive Korrelation ($r = 0,33$; $p = 0,065$) von Laktat-Konzentration im Sputum und CRP im Serum ($n = 32$)

4.4 LAKTAT, LDH UND FEV_1 BEI EXAZERBATION UND THERAPIE

In 13 Fällen konnten zu einem jeweiligen Patienten, der sich in Exazerbation befand, die Laktat- und LDH-Werte aus dem Sputum vor und während einer i.v.-Antibiotikatherapie ermittelt werden. Die Laktat-Werte betragen während der akuten Exazerbation $5,2 \pm 3,3$ mmol/l und unter laufender i.v.-Antibiotikatherapie $1,9 \pm 2,1$ mmol/l. Es zeigte sich eine signifikante ($p = 0,006$) Verringerung des Laktat-Wertes unter der Therapie (Abb. 16).

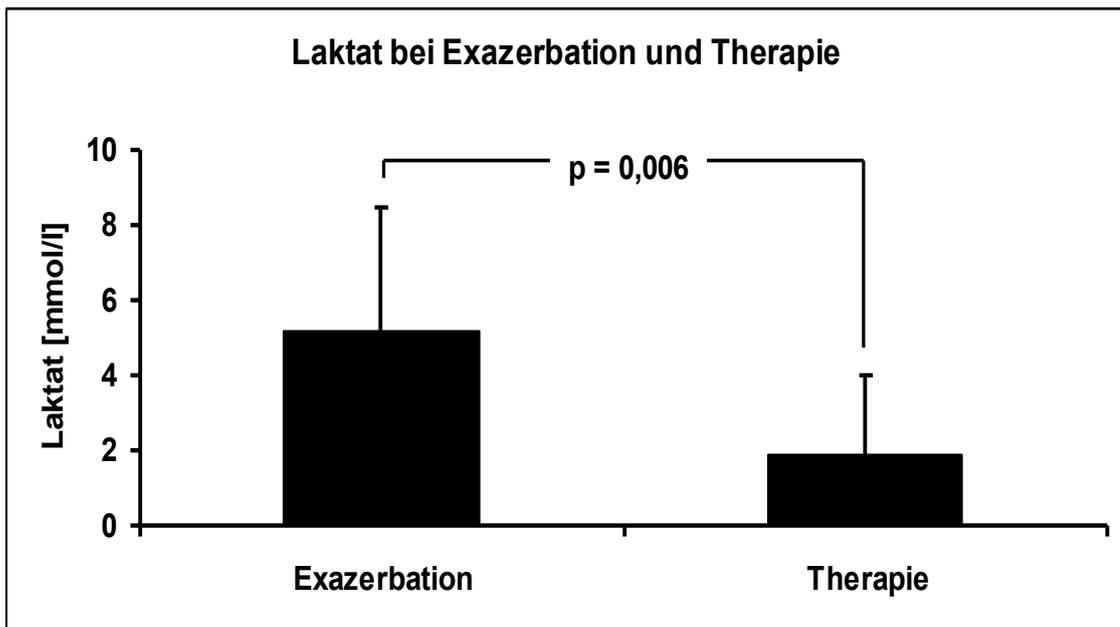


Abb. 16: Laktat in Sputum-Proben von CF-Patienten (n=13) bei Exazerbation und während Therapie

Bei 12 von 13 Probenpaaren (92,3 %) fiel der Laktat-Wert unter i.v.-Antibiotikatherapie (Abb. 17). Bei 8 von 9 Probenpaaren (88,9 %) fiel auch der LDH-Wert unter der intravenösen antibiotischen Therapie.

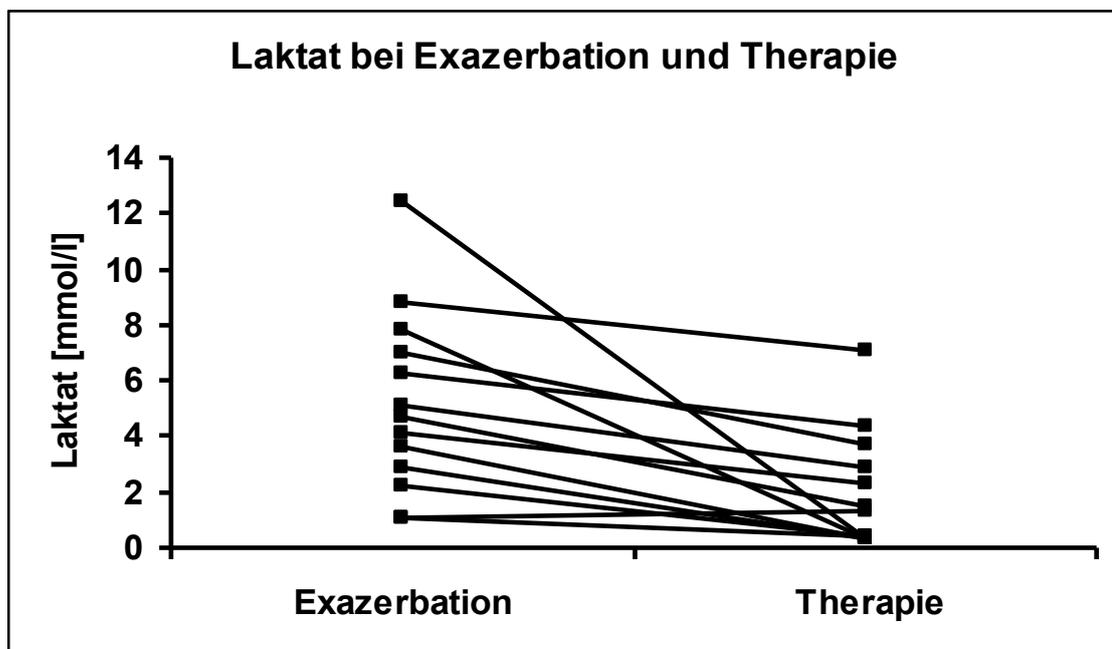


Abb 17: Einzeldarstellung der Laktat-Werte bei Exazerbation und während antibiotischer Therapie. Bei 12 von 13 Probenpaaren nimmt der Laktat-Wert während der Therapie ab.

Es konnte während der intravenösen Antibiotikatherapie zudem ein deutlicher Abfall der LDH-Werte registriert werden. Während einer akuten Exazerbation lagen die LDH-Werte im Mittel bei $197,0 \pm 91,4 \mu\text{mol/l}$ s und während i.v.-Antibiose bei $113,8 \pm 83,6 \mu\text{mol/l}$ s (Abb. 18). Der Unterschied verfehlt die statistische Signifikanz nur knapp ($p = 0,054$).

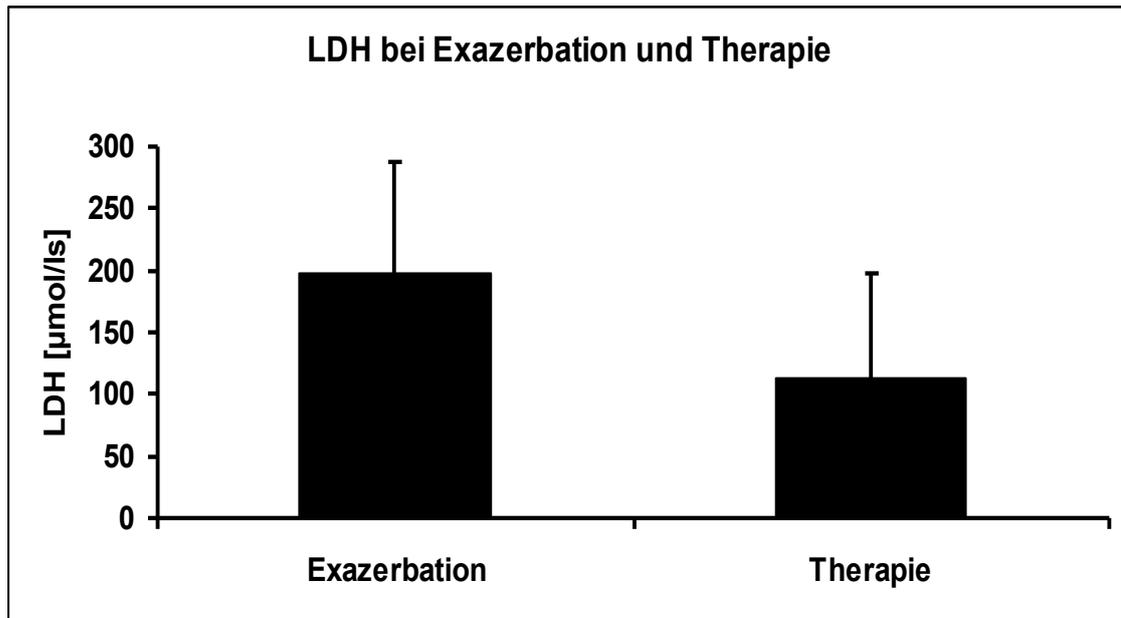


Abb. 18: LDH in Sputum-Proben von CF-Patienten (n=9) bei Exazerbation und während Therapie ($p = 0,054$)

Während sich die Laktat-Werte bei Exazerbation und Therapie signifikant änderten, war für LDH kein signifikanter Unterschied zu registrieren. Dies beruht möglicherweise auf der hohen Standardabweichung sowie auf der im Vergleich zum Laktat schlechteren Stabilität des Enzyms LDH, wie auch die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen (Abb. 23) zeigten.

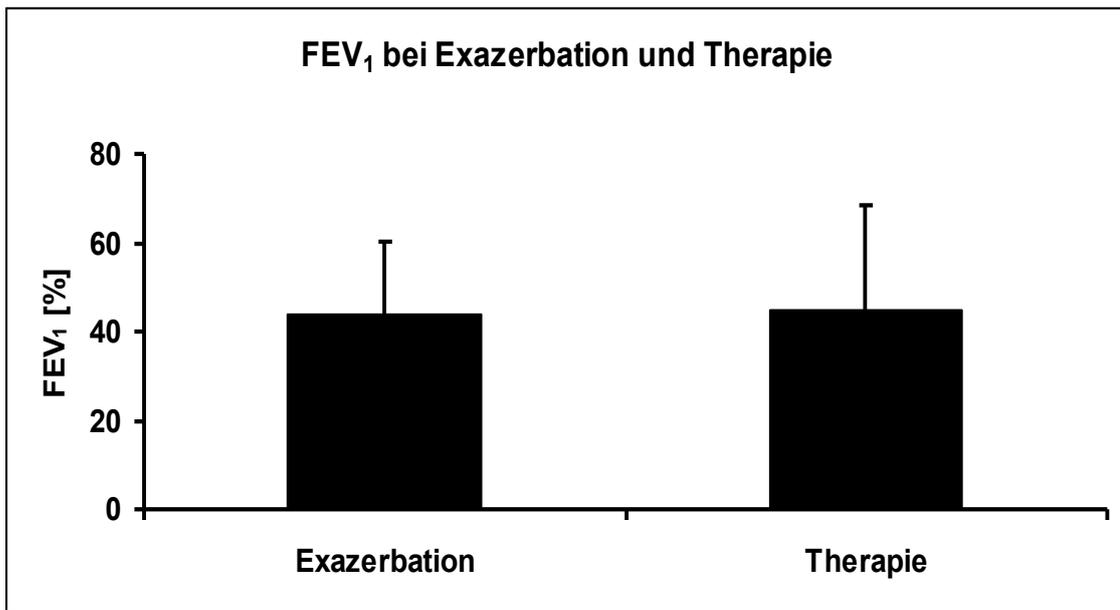


Abb. 19: FEV₁ von CF-Patienten (n=7) bei Exazerbation und während Therapie (p=0,94)

Bei 7 von 13 Probenpaaren konnten zusätzlich zu den Laktat- und LDH-Werten auch die FEV₁ zur Objektivierung des klinischen Zustands ermittelt werden. Die FEV₁-Werte bei Exazerbation betragen $43,9 \pm 16,2$ %. Die FEV₁-Werte während Therapie betragen $44,7 \pm 23,8$ % (Abb. 19). Es lässt sich nur eine geringe Verbesserung der FEV₁ während der Therapie eruieren (p = 0,94).

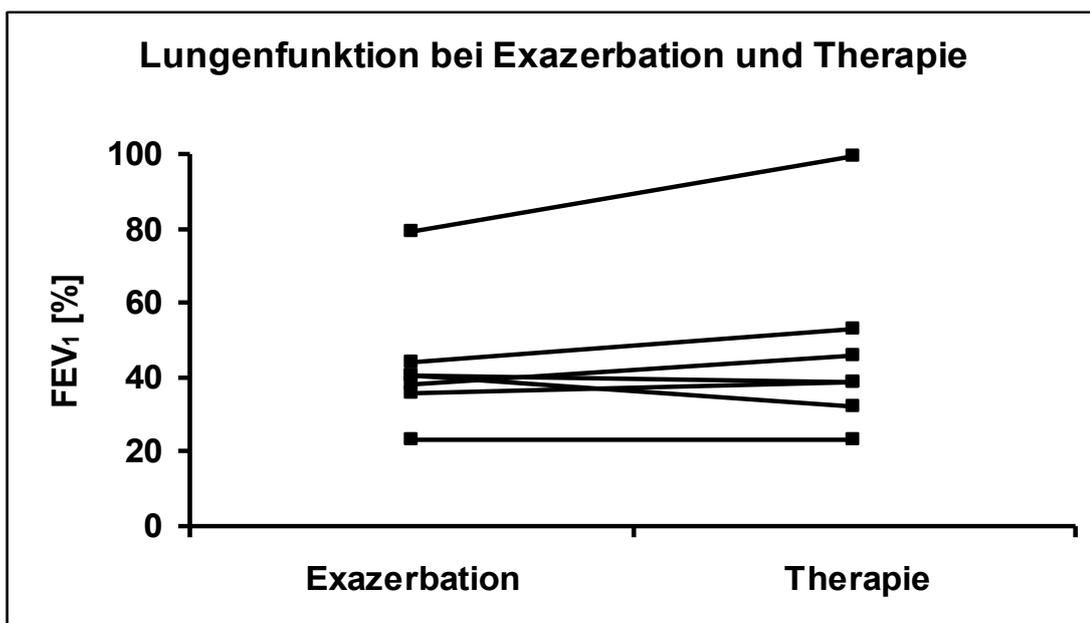


Abb 20: Einzeldarstellung der FEV₁-Werte bei Exazerbation und während antibiotischer Therapie.

Bei 5 von 7 Probenpaaren kam es zu einer Verbesserung der FEV₁ unter i.v.-Antibiose. Die FEV₁ besserte sich bei diesen Fällen zwischen 0,2 und 20,5 %. Bei allen 5 Probenpaaren, bei denen es zu einer Verbesserung der Lungenfunktion kam, wurden im Verlauf reduzierte Laktat-Werte im Sputum gemessen. Bei 2 von 7 Probenpaaren kam es unter der i.v. Antibiose dagegen zu einer Verschlechterung der gemessenen FEV₁ (Abb. 20). Die FEV₁ verschlechterte sich dabei einmal um 1,7 % und einmal um 8,3 % unter der i.v.-Antibiose. Bei diesen Paaren kam es unter der i.v.-Antibiose gleichzeitig zu einem Abfall des Laktat-Wertes von 6,3 auf 4,4 mmol/l bzw. zu einem Anstieg des Laktat-Wertes von 1,1 auf 1,3 mmol/l. Während es zu einem signifikanten Abfall der Laktat-Werte im Sputum (p-Wert = 0,006) unter der i.v.-Antibiose kam, veränderten sich die FEV₁ unter der i.v.-Antibiose nicht vergleichbar (p = 0,94) (Abb. 19, Abb. 20). In Abb 20 wird deutlich, dass es nur zur einer relevanten Verbesserung der Lungenfunktion kommt, wenn die Ausgangs-FEV₁-Werte noch vergleichsweise hoch sind. Bei einem Probenpaar verbesserte sich die FEV₁ von 79,1 auf 99,6 %. Da es bei den CF-Patienten jedoch im Laufe des Lebens zu einem fibrotischen Lungengewebsumbau mit irreversibler Beeinträchtigung der Lungenfunktion kommt, ist einer erhebliche Verbesserung der FEV₁-Werte nicht zu erwarten.

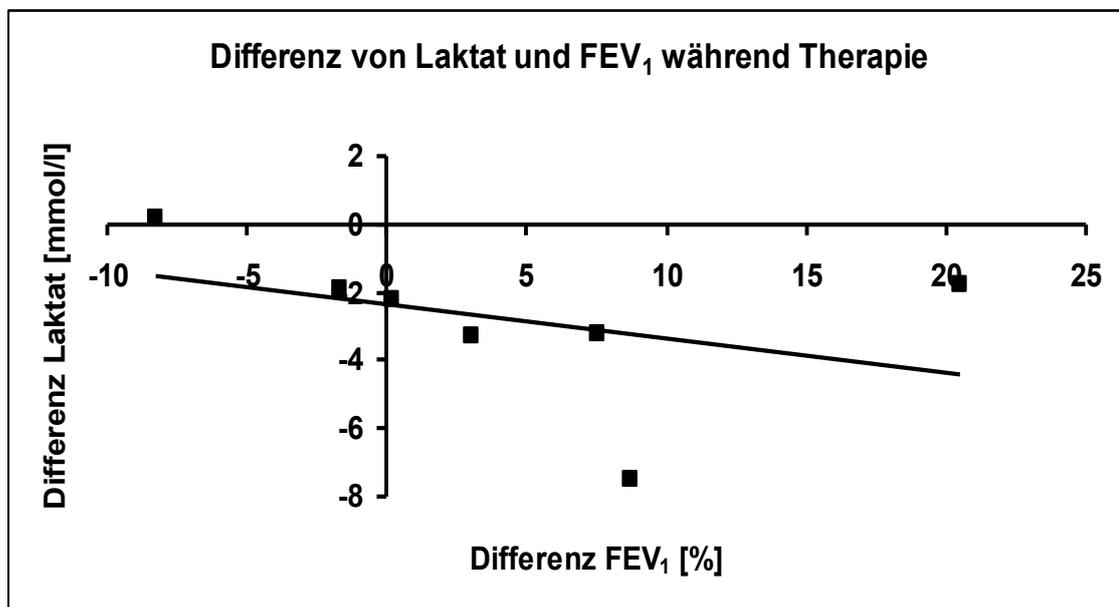


Abb. 21: Veränderung der Laktat-Werte während i.v.-Antibiotikatherapie mit dazugehöriger Änderung der FEV₁.

Bei 5 von 7 Probenpaaren waren gleichzeitig eine Abnahme des Laktat-Wertes und eine Zunahme der FEV₁ während der Therapie zu verzeichnen (Abb. 21, rechter unterer Quadrant). Bei einem Paar verschlechterte sich die FEV₁ bei gleichzeitiger Abnahme der Laktat-Konzentration (Abb. 21, linker unterer Quadrant). Bei einem

weiteren Paar kam es bei Abnahme der FEV₁ zu einer Zunahme der Laktat-Konzentration (Abb. 21, linker oberer Quadrant). Es kam also in 6 von 7 Fällen zu einer gegenläufigen Entwicklung von Laktat-Konzentration und FEV₁. Lediglich in einem Fall war der Verlauf gleichsinnig.

4.5 STABILITÄT VON LAKTAT UND LDH

Die Untersuchungen zur Stabilität von Laktat im Überstand von bearbeiteten Sputum-Proben mit Lagerung im Kühlschrank bei 6 °C ergaben, dass die Laktat-Werte am Abnahmetag, nach 7 Tagen und nach 30 Tagen weitgehend gleich waren. Alle 3 Mittelwerte lagen bei 3,2 mmol/l. Der größte zu registrierende Unterschied nach 7 und 30 Tagen lag bei 0,5 mmol/l. Ein Unterschied von 0,1 mmol/l und weniger, was den Schwankungen der Messwerte des Zentrallabors entspricht, war nach 7 Tagen bei 11 von 16 Proben und nach 30 Tagen bei 8 von 16 Proben nachweisbar. Bei Lagerung im Gefrierschrank bei - 51 °C veränderte sich der Laktat-Wert im Vergleich zum Abnahmetag nach 7 Tagen ebenfalls nicht. Der Mittelwert vor Lagerung lag bei 3,2 mmol/l und nach 7 Tage Lagerung ebenfalls bei 3,2 mmol/l. Der größte zu registrierende Unterschied lag bei 0,4 mmol/l. Bei 12 von 16 Proben lag der Unterschied bei 0,1 mmol/l oder weniger. Auch nach 30 Tagen Lagerung im Gefrierschrank änderte sich der Mittelwert der Laktat-Werte mit 3,3 mmol/l im Vergleich zu dem Wert am Abnahmetag mit 3,2 mmol/l nur minimal (Abb. 22).

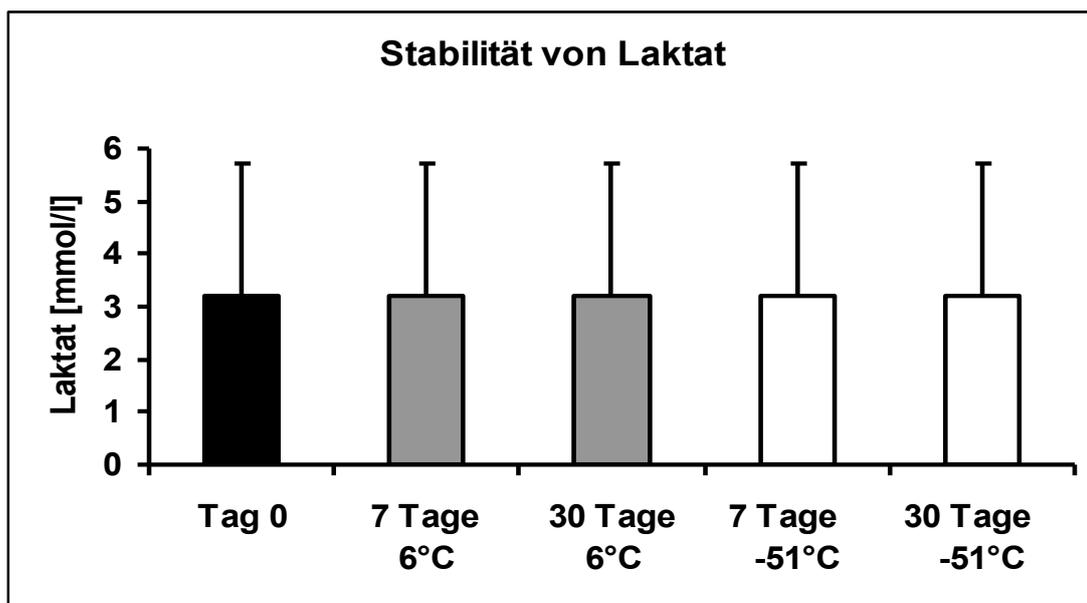


Abb. 22: Stabilität von Laktat mit Vergleich der Werte am Abnahmetag, bei Lagerung bei 6 °C für 7 und 30 Tage sowie bei Lagerung bei -51°C für 7 und 30 Tage

Laktat im Überstand von bearbeiteten Sputum-Proben ist demnach sowohl bei Lagerung im Kühlschrank bei 6 °C als auch bei Lagerung im Gefrierschrank bei -51 °C als stabil anzusehen. Dies gilt sowohl für eine 7-Tage-Lagerung als auch für eine 30-Tage-Lagerung (Abb. 22).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Stabilität von LDH im Überstand von bearbeiteten Sputum-Proben zeigten, dass sich der LDH-Mittelwert nach Lagerung im Kühlschrank bei 6 °C bereits nach 7 Tagen deutlich von 110,3 auf 92,8 µmol/l_s reduzierte. Nach 30 Tagen reduzierte sich dieser mit 64,5 µmol/l_s auf nahezu die Hälfte des Ausgangswertes. Bei 8 von 12 Proben war nach Lagerung im Kühlschrank bereits nach 7 Tagen ein Unterschied von > 10 µmol/l_s vorhanden, nach 30 Tagen bei 11 von 12 Proben.

Die Lagerung im Gefrierschrank bei -51 °C hatte nach 7 Tagen kaum einen Einfluss auf den LDH-Wert. Der Mittelwert änderte sich von 110,3 auf 110,8 µmol/l_s. Bei 8 von 12 Proben blieb der Unterschied < 10 µmol/l_s. Nach 30 Tagen reduzierte sich der LDH-Mittelwert jedoch deutlich von 110,3 auf 97,9 µmol/l_s (Abb. 23).

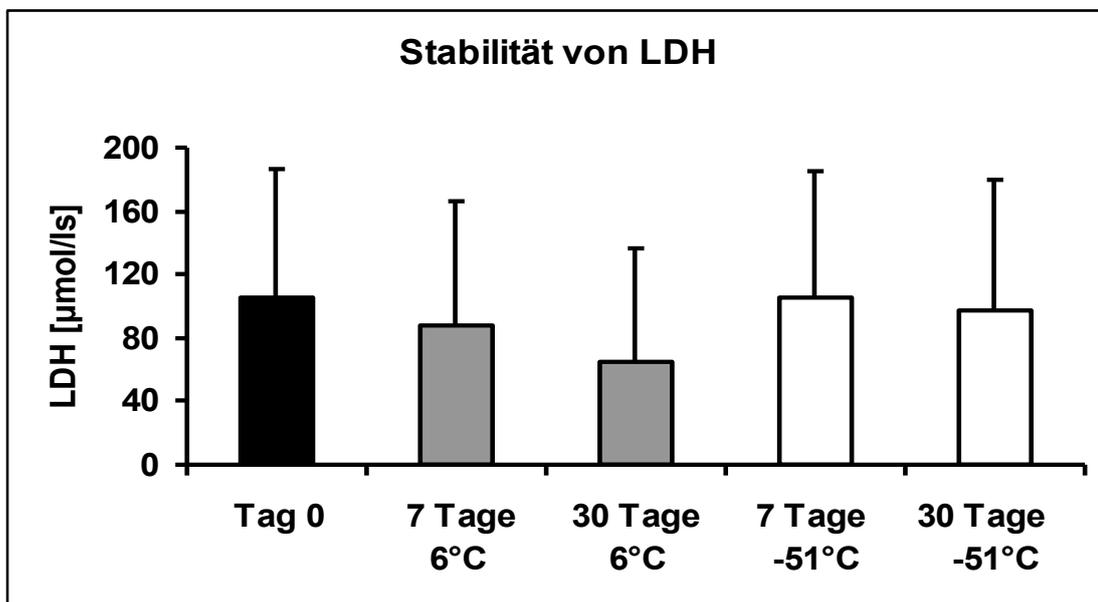


Abb. 23: Stabilität von LDH mit Vergleich der Werte am Abnahmetag, bei Lagerung bei 6 °C für 7 und 30 Tage sowie bei Lagerung bei -51°C für 7 und 30 Tage

LDH im Überstand von bearbeiteten Sputum-Proben ist demnach bei Lagerung im Kühlschrank bei 6 °C weder nach 7 noch nach 30 Tagen stabil. Bei der Lagerung im Gefrierschrank bei -51 °C sind die Werte zumindest 7 Tage nach Abnahme und

Bearbeitung noch stabil, nach längerer Zeit zeigen sich deutliche Abweichungen (Abb. 23).

4.6 BAKTERIENIDENTIFIZIERUNG UND -QUANTIFIZIERUNG

Neben den Laktat- und LDH-Konzentrationsmessungen erfolgten in 82 Sputum-Proben und 22 BAL-Proben von 27 CF-Patienten sowie 8 Sputum-Proben und 10 BAL-Proben von 14 Non-CF-Patienten die Identifizierung der darin enthaltenen Erreger sowie deren Quantifizierung.

Bei 13 CF-Patienten (48,1 %) konnte bei aerober Anzucht der fakultative Anaerobier *P. aeruginosa* als dominanter Erreger in Sputum- und BAL-Proben identifiziert werden. *S. aureus* wurde bei 8 Patienten (29,6 %) als dominanter Erreger nachgewiesen. In 7 Fällen (25,9 %) handelte es sich bei *B. cepacia* um den dominanten Erreger der Patienten. Bei 3 Patienten lag eine Koinfektion von *P. aeruginosa* und *S. aureus* vor. *P. aeruginosa* war demnach der am häufigsten nachgewiesene CF-Haupterreger in den hier untersuchten CF-Sputum- und BAL-Proben (Tab. 2). Damit lag eine für CF-Patienten typische Besiedlung vor.

Des Weiteren wurden in 15 Proben vergrünende Streptokokken in hohen Keimzahlen nachgewiesen. Da zunächst davon ausgegangen wurde, dass es sich um eine orale Kontamination handelt, erfolgte anfänglich keine weitere Identifizierung. In einigen BAL-Proben wurden jedoch direkt aus der Lunge vergrünende Streptokokken nachgewiesen. Im späteren Verlauf wurden daher auch vergrünende Streptokokken identifiziert und quantifiziert. Dabei wurden folgende Spezies nachgewiesen: *S. salivarius* und *S. sanguinis* (Tab. 2). Auch anaerobe Streptokokken der *Streptococcus-milleri-group* (SMG) konnten identifiziert werden.

Tab. 2: Erregernachweis in Sputum und BAL von 27 CF-Patienten bei aerober Anzucht

Genus	Spezies	Proben	Patienten
<i>Pseudomonas spp.</i>		47	17
	<i>aeruginosa</i>	43	13
	<i>putida</i>	2	2
	<i>fluorescens</i>	2	2
<i>Staphylococcus spp.</i>		32	13
	<i>aureus</i>	21	8
	<i>sciuri</i>	10	4
	<i>simulans</i>	1	1
<i>Burkholderia spp.</i>	<i>cepacia</i>	16	7
Vergrünende Streptokokken		15	7
<i>Streptococcus spp.</i>		5	5
	<i>salivarius</i>	4	4
	<i>sanguinis</i>	1	1
<i>Micrococcus spp.</i>	<i>sedentarius</i>	1	1
<i>Stomatococcus spp.</i>	<i>mucilaginosus</i>	3	2
<i>Achromobacter spp.</i>	<i>xylooxidans</i>	2	1
<i>Sphingomonas spp.</i>	<i>paucimobilis</i>	1	1
<i>Pasteurella spp.</i>	<i>multocida</i>	1	1
<i>Vibrio spp.</i>	<i>alginoliticus</i>	1	1
<i>Pantoea spp.</i>	<i>agglomerans</i>	1	1
<i>Aeromonas spp.</i>	<i>veronii biovar veronii</i>	1	1
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>faecalis</i>	1	1

Tab. 3: Erregernachweis in Sputum und BAL von 27 CF-Patienten bei anaerober Anzucht

Genus	Spezies	Proben	Patienten
<i>Veillonella spp.</i>		19	10
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>saccharolyticus</i>	11	10
<i>Streptococcus spp.</i>		7	4
	<i>intermedius</i>	3	2
	<i>constellatus</i>	3	1
	<i>anginosus</i>	1	1
<i>Bacteroides spp.</i>		3	3
	<i>stercoris</i>	2	2
	<i>tectum</i>	2	2
<i>Clostridium spp.</i>		3	3
	<i>hastiforme</i>	2	2
	<i>novyi A</i>	1	1
<i>Prevotella spp.</i>		2	2
	<i>loeschii</i>	1	1
	<i>corporis</i>	1	1
<i>Mobiluncus spp.</i>		3	3
	<i>curtisii</i>	2	2
	<i>mulieris</i>	1	1
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>acidophilus</i>	1	1
<i>Bifidobacterium spp.</i>		1	1
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	<i>tetradus</i>	1	1
<i>Actinomyces spp.</i>	<i>israelii</i>	1	1

Ebenso wurden obligate, aerotolerante und mikroaerophile Anaerobier in zahlreichen Sputum- und BAL-Proben nachgewiesen, obwohl keine Spezialmedien zu deren Identifikation angewendet wurden. Die am häufigsten nachgewiesenen anaeroben Erreger waren *Veillonella spp.*, *S. saccharolyticus* und *Streptococcus spp.* (Tab. 3).

Tab. 4: Erregernachweis in Sputum und BAL von 14 Non-CF-Patienten bei aerober Anzucht

Genus	Spezies	Proben	Patienten
<i>Staphylococcus spp.</i>		5	5
	<i>aureus</i>	2	2
	<i>cohnii spp. cohnii</i>	1	1
	<i>epidermidis</i>	1	1
	<i>haemolyticus</i>	1	1
<i>Streptococcus spp.</i>			
	<i>intermedius</i>	4	4
	<i>pneumoniae</i>	2	2
	<i>anginosus</i>	1	1
	<i>parasanguis</i>	1	1
	<i>oralis</i>	1	1
	<i>vestibularis</i>	1	1
<i>Stomatococcus</i>	<i>mucilaginosus</i>	4	4
<i>Lactococcus spp</i>		3	3
	<i>lactis</i>	2	2
	<i>lactis spp. cremoris</i>	1	1
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	2	1
<i>Micrococcus</i>	<i>sedentarius</i>	1	1
<i>Corynebacterium</i>	<i>bovis</i>	1	1
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	1	1
<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	1	1
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1	1

Auch in Sputum- und BAL-Proben von Non-CF-Patienten waren aerobe Bakterien nachweisbar (Tab. 4). Die CF-Haupterreger *P. aeruginosa* und *B. cepacia* wurden in keiner Non-CF-Probe nachgewiesen. *S. aureus* war in CF- und auch in Non-CF-Proben nachweisbar.

Ebenso wurden in einigen Non-CF-Proben anaerobe Bakterien nachgewiesen, obwohl keine Spezialmedien verwendet wurden. Sie waren jedoch weitaus seltener und insgesamt in weniger Spezies als in CF-Proben nachweisbar. *S. saccharolyticus* und *S. constellatus* waren sowohl in CF- als auch in Non-CF-Proben zu finden (Tab. 5).

Tab 5: Erregernachweis in Sputum und BAL von 14 Non-CF-Patienten bei anaerober Anzucht

Genus	Spezies	Proben	Patienten
<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	3	3
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	1	1
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>prevotii</i>	1	1

4.7 LAKTAT UND IDENTIFIZIERTE ERREGER IM CF-SPUTUM

Die Laktat-Konzentrationen in den Sputum-Proben in Abhängigkeit vom nachweisbaren Erreger betragen $3,6 \pm 2,8$ mmol/l (*P. aeruginosa*), $3,8 \pm 3,0$ mmol/l (*S. aureus*), $2,4 \pm 2,2$ mmol/l (*B. cepacia*), $2,1 \pm 2,4$ mmol/l (*S. saccharolyticus*) und $2,5 \pm 1,9$ mmol/l (*Veillonella spp.*). Sie waren demnach am höchsten in den Proben, in denen *S. aureus* nachgewiesen wurde, und am niedrigsten in den Proben mit Nachweis von *S. saccharolyticus* (Abb. 24). Dabei war die Anzahl der untersuchten Proben aufgrund des vorgegebenen Keimspektrums unterschiedlich. Es besteht jedoch kein relevanter Unterschied zwischen den Proben mit Nachweis von *S. aureus* mit höheren Laktat-Werten, und den Proben mit Nachweis von *S. saccharolyticus* mit niedrigeren Laktat-Werten ($p = 0,11$).

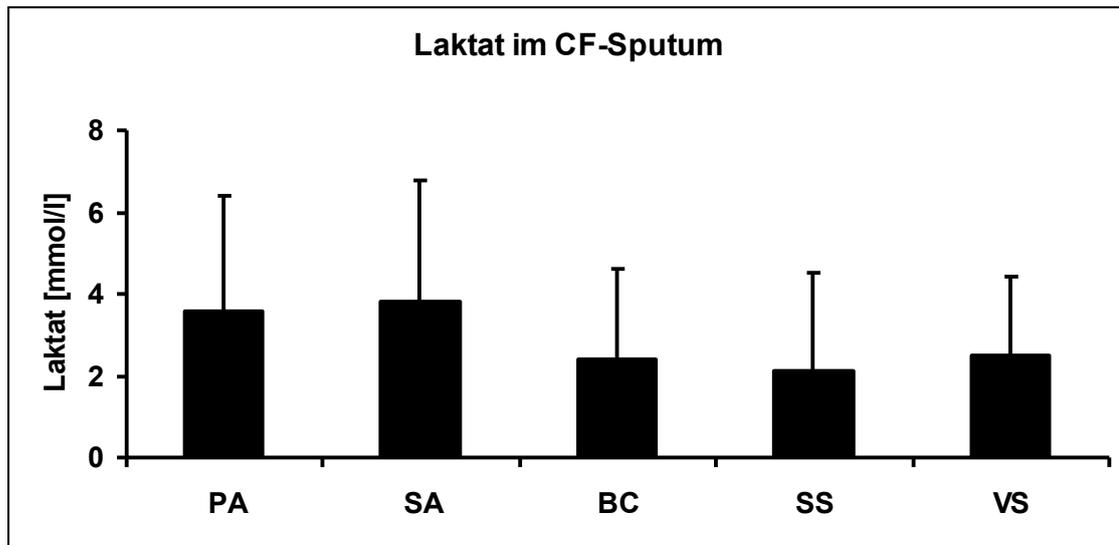


Abb. 24: Laktat-Konzentration im CF-Sputum mit Nachweis von *P. aeruginosa* (PA, n=42), *S. aureus* (SA, n=14), *B. cepacia* (BC, n=10), *S. saccharolyticus* (SS, n=11) und *Veillonella spp.* (VS, n=13)

4.8 PATIENTENVERLÄUFE

Für Patienten, die mehr als 5 Sputum- und BAL-Proben abgaben, wurden Patientenverläufe erstellt. Für den jeweiligen Beobachtungszeitraum wurden neben Laktat- und LDH-Konzentrationen Angaben zum Allgemeinzustand, Erreger und Keimzahlen in Sputum und BAL, Laborwerte und Lungenfunktionsmessungen dokumentiert.

Es folgt die Darstellung für einen exemplarischen Patienten: In einem Zeitraum von 5 Monaten war bei dem Patienten stets *B. cepacia* als dominanter Erreger nachweisbar. Die Keimzahlen von *B. cepacia* waren in stabilen Krankheitsphasen ($5,0 \times 10^8$ und $1,4 \times 10^9$ KBE/ml) vergleichbar mit den Werten bei Exazerbation ($1,5 \times 10^9$, $1,5 \times 10^9$ und 6×10^9 KBE/ml). Zunächst als orale Kontamination gedeutete Streptokokken (daher keine weitere Identifizierung) wurden in der BAL in hohen Keimzahlen direkt aus der Lunge gewonnen und als *Str. constellatus* identifiziert. Weitere im Sputum und in der BAL identifizierte Erreger waren die obligaten Anaerobier *B. stercoris*, *Pr. loeschii*, *Pr. corporis* und *Veillonella spp.* Die Keimzahlen der Erreger aus expektoriertem Sputum und BAL waren vergleichbar (Tab. 6).

Tab. 6: Angaben zum klinischen Zustand, in Sputum und BAL nachweisbaren Erregern (ggf. mit Keimzahlen in KBE/ml) sowie CRP, FEV₁ und Laktat-Konzentration eines exemplarischen Patienten

Probe	Klinische Angaben	Erreger	CRP [mg/l]	FEV ₁ [%]	Laktat [mmol/l]
St 1 01.07.08	Exazerbation seit 26.06.; i.v.-Antibiose	k.A.	72,2	37,9	1,2
St 8 23.07.08	AZ noch leicht reduziert	k.A.	24,0	40,5	0,8
St 41 30.09.08	Orale Antibiose, Wohlbefinden	<i>B. cepacia</i> 5x10 ⁸ Streptokokken 3,5x10 ⁷	3,6	51,6	0,6
St 51 21.10.08	Orale Antibiose, Wohlbefinden	<i>B. cepacia</i> 1,4x10 ⁹	6,2	50,4	0,5
St 61 25.11.08	Exazerbation	<i>B. cepacia</i> 1,5x10 ⁹ <i>Bact. stercoris</i> 1,5x10 ⁷ <i>Pr. loeschii</i> 1,5x10 ⁷	31,8	40,7	1,1
St 62 09.12.08	Nach i.v.-Antibiose keine Besserung, schlechter AZ	<i>B. cepacia</i> 1,5x10 ⁹ <i>Veillonella spp.</i> 2x10 ⁶	51,4	32,4	1,3
Br 12 09.12.08	Nach i.v.-Antibiose, keine Besserung, BAL, schlechter AZ	<i>B. cepacia</i> 6x10 ⁹ <i>Str. constellatus</i> 2,5x10 ⁶ <i>Pr. corporis</i> 1,2x10 ⁷ <i>Veillonella spp.</i> 4x10 ⁶	51,4	32,4	2,6

Die Laktat-Werte in stabilen Krankheitsphasen lagen zwischen 0,5 und 0,8 mmol/l. Bei Exazerbation lagen die Werte zwischen 1,1 und 1,3 mmol/l. Die Höhe der Laktat-Werte und die Schwankungen sind im Vergleich zu anderen CF-Patienten eher gering. Ein Unterschied zwischen den Krankheitsphasen ist jedoch erkennbar (stabiler AZ < 1,0 mmol/l vs. Exazerbation > 1,0 mmol/l). Die Höhe der Laktat-Werte ist demnach individuell unterschiedlich, kann aber bei einem bestimmten Patienten im Verlauf verglichen werden. Als Quelle des Laktats gelten die PMN, deren Anzahl beim

Einstrom in die CF-Lunge bei Exazerbation wahrscheinlich ebenso individuell ist. Die FEV₁-Werte lagen zwischen 32,4 (schlechter AZ) und 51,6 % (unter Therapie). In diesem exemplarischen Patientenverlauf sind ebenfalls bei hohen CRP-Werten im Rahmen von Exazerbationen für den Patienten individuell hohe Laktat-Werte im Sputum zu gleicher Zeit zu registrieren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Laktat-Konzentration in Sputum- und BAL-Proben bei CF-Patienten höher ist als bei Non-CF-Patienten. Auch die LDH-Konzentration in Sputum- und BAL-Proben von CF-Patienten ist höher als bei Non-CF-Patienten. Es konnte eine starke positive Korrelation von Laktat und LDH im CF-Sputum und eine schwache negative Korrelation von Laktat und FEV₁ registriert werden. Des Weiteren fand sich eine schwache positive Korrelation von Laktat im Sputum und CRP im Serum. Die Laktat-Werte im CF-Sputum sind bei Exazerbation mit $5,2 \pm 3,3$ mmol/l signifikant höher als während Therapie mit $1,9 \pm 2,1$ mmol/l ($p = 0,006$). Auch die LDH-Werte fallen während der Therapie einer Exazerbation von $197,0 \pm 91,4$ μ mol/l auf $113,8 \pm 83,6$ μ mol/l ($p = 0,054$). Die Mittelwerte der FEV₁ dagegen änderten sich während der Therapie einer Exazerbation kaum ($p = 0,94$). Bei den Versuchen zur Stabilität konnten für Laktat keine Veränderungen der Werte unabhängig von Lagerungszeit und -bedingungen festgestellt werden. Das bei den Untersuchungen ermittelte Keimspektrum der Patienten entspricht der typischen Keimbesiedlung der CF-Lunge. Die Laktat-Konzentration im CF-Sputum ist nicht von den im Sputum enthaltenen Bakterienspezies oder der Keimzahl abhängig.

5 DISKUSSION

Im Krankheitsverlauf der CF kommt es rezidivierend zu pulmonalen Exazerbationen, welche in 25% der Fälle mit einer bleibenden Verschlechterung der Lungenfunktion einhergehen (Sanders et al., 2010). Als der entscheidendste Faktor für die verminderte Lebenserwartung der CF-Patienten gilt die Verschlechterung der Lungenfunktion als Folge der chronischen Lungeninfektion und -inflammation (Rosenfeld et al., 2001). Um den Krankheitsverlauf der CF-Patienten besser überwachen und frühzeitig eine pulmonale Exazerbation erkennen zu können, werden Entzündungsmarker benötigt (Wolter et al., 1999).

Die Diagnose einer akuten Exazerbation bei Patienten mit CF ist schwierig, da konventionelle Anzeichen einer Infektion wie zum Beispiel Fieber, erhöhte Leukozytenzahlen, Verschlechterung der Lungenfunktion und positive Sputum-Kulturen nicht immer hilfreich sind (Smith et al., 1988). Die FEV₁ gilt trotzdem als Goldstandard in der Diagnostik einer akuten pulmonalen Exazerbation der CF (Fuchs et al., 1994; Gibson et al., 2003; Rabin et al., 2004; Heijerman et al., 2009). Als Faktoren mit dem stärksten Vorhersagewert einer akuten Exazerbation und damit als Entscheidungshilfe für eine antibiotische Therapie erwiesen sich neben der FEV₁ auch eine erhöhte Hustenfrequenz, neu aufgetretene Rasselgeräusche und Hämoptysen (Fuchs et al., 1994; Rabin et al., 2004). Andere Indikatoren für eine Infektion und Inflammation könnten die Diagnosestellung und damit ebenso die Überwachung des Krankheitsverlaufs und der Therapie vereinfachen (Wolter et al., 1999; Ratjen und Döring, 2003; Rabin et al., 2004).

In früheren Studien wurden unter anderem IL-8, TNF- α , Neutrophile Elastase- α -1-Protease Inhibitor-Komplex (NE Komplex) und α -1-Protease Inhibitor (α -1-PI) in Exazerbations- und stabilen Krankheitsphasen bei CF-Patienten im Sputum und Blutserum untersucht. Dabei zeigte sich, dass die im Sputum messbaren Zytokine und Inflammationsmarker eine akute Exazerbation nicht sicher anzeigen können. Die FEV₁ war jedoch nur knapp nicht signifikant (Wolter et al., 1999). Bisher konnte keine der neueren untersuchten Markersubstanzen Einzug in den klinischen Alltag finden. Klinisch etabliert ist neben der FEV₁ lediglich das CRP im Serum als Markersubstanz einer akuten Entzündung. Beide Parameter, FEV₁ und CRP, besitzen dabei jedoch neben den bekannten Vorteilen auch Nachteile. Es konnte gezeigt werden, dass das CRP im Gegensatz zu weiteren zahlreichen untersuchten Markern als am weitesten

verbreitete und damit gut zu bewertende Markersubstanz, das Potenzial besitzt, klinischen Nutzen zu bringen (Shoki et al., 2013). Shoki et al. untersuchten jedoch lediglich Substanzen im Blutserum. Substanzen im Sputum der CF-Patienten wurden nicht evaluiert.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit Laktat im Sputum von Patienten mit CF als möglicher Entzündungsmarker evaluiert werden. Dazu erfolgten unter anderem die Messung der Laktat-Konzentration in Sputum und BAL von CF- und Non-CF-Patienten, bei akuter Exazerbation und während Therapie sowie der Vergleich mit anerkannten Markern wie der FEV₁ und CRP.

5.1 PMN ALS QUELLE DES LAKTATS IM SPUTUM

PMN kommen im Blutstrom in großen und kleinen Blutgefäßen vor. Bei fehlender Inflammation befinden sich große Mengen der PMN in Kapillargefäßen hauptsächlich in der Lunge, aber auch in Leber, Milz und Knochenmark (Peters, 1998). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es durch Zytokine, Zelladhäsion-Moleküle und Chemotaxis zu einer Migration der PMN aus dem Gefäßsystem in das Lungengewebe (Downey et al., 2007). Dabei stellt IL-8 den größten Reiz für die PMN dar (Sekido et al., 1993; Folkesson et al., 1995; Matsumo et al., 1997).

Bensel (2009) ermittelte in einer Studie bei 25 CF-Patienten erhöhte Laktat-Konzentrationen im Sputum. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die PMN sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen Laktat produzieren. Unter anaeroben Bedingungen war die Laktatmenge sogar nahezu dreimal so hoch (Bensel et al., 2011). In *in vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass in den zähen Mukusplaques anaerobe Verhältnisse vorherrschen (Worlitzsch et al., 2002; Yoon et al., 2002). Diese Bereiche werden von fakultativen und obligaten Anaerobiern (Tunney et al., 2008) sowie von zahlreichen PMN besiedelt.

Auch die CF-Haupterreger wurden auf ihre Laktat-Produktion als eine mögliche Quelle des im Sputum enthaltenen Laktats untersucht (Bensel et al., 2011). *P. aeruginosa* produziert weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen Laktat. *S. aureus* produziert unter anaeroben Bedingungen in der anfänglichen exponentiellen Wachstumsphase geringe Mengen Laktat. Unter aeroben Bedingungen wurden in der Wachstumsphase kurzzeitig hohe Laktat-Werte gemessen. Jedoch überwiegt bei *S. aureus* nach einigen Stunden der Laktatverbrauch, sodass *S. aureus* insgesamt nur

in geringem Maße an der Laktatbildung im Sputum teilnimmt. Bei *B. cepacia* zeigten sich ähnliche Laktatbildungseigenschaften wie bei *P. aeruginosa*. *B. cepacia* hat zusätzlich einen höheren Laktatverbrauch als *P. aeruginosa* (Bensel et al., 2011). Die CF-Haupterreger sind demnach nicht für die hohen Laktat-Werte im CF-Sputum verantwortlich.

Das im Sputum messbare Laktat stammt demnach von den PMN, die im Rahmen des Inflammationsgeschehens einer akuten Exazerbation in die Lunge einströmen und unter anaeroben Bedingungen in den Mukusplaques nachweislich vermehrt Laktat bilden. Laktat könnte demnach hypothetisch als Indikator eines aktuellen Inflammationszustands und damit Marker einer akuten Exazerbation fungieren.

Während nun Laktat im CF-Sputum bekanntermaßen erhöht ist (Bensel, 2009), erbrachten Untersuchungen der Serumlaktat-Werte bei CF-Patienten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Nikolaizik et al., 1998). Dies bestätigt die Annahme, dass nach massenhaftem Einstrom der PMN in die CF-Lunge eine gesteigerte Laktatproduktion in den anaeroben Mukusplaques stattfindet.

5.2 KLINISCHE BEDEUTUNG VON LAKTAT UND LDH

Im klinischen Alltag wird die Laktatmessung im Blut vor allem auf Intensivstationen zur Überwachung von Patienten verwendet. Es ist bekannt, dass erhöhte Serum-Laktat-Werte mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität im Zusammenhang stehen (Aduen et al., 1994; Grzybowski 1996; Moore et al., 2001). Bei Patienten in klinisch kritischem Zustand kommt es durch ein vermindertes Sauerstoffangebot, erhöhten Sauerstoffverbrauch oder inadäquate Sauerstoffverwertung zu einer Hypoxie im Gewebe (Fall und Szerlip, 2005) und damit zu einem anaeroben Metabolismus mit erhöhter Laktat-Konzentration (Nguyen et al., 2004). Die Laktat-Werte im Blutserum steigen dann messbar an.

Zu Vergleichszwecken wurden neben den Laktat- auch die LDH-Werte in den Proben ermittelt. Die LDH katalysiert die Bildung von Laktat aus Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$. Es werden im Blutserum 5 unterschiedliche Isotypen der LDH unterschieden. Die LDH kann in fast allen Zell- und Organsystemen nachgewiesen werden. Deutlich erhöhte Laktat-Werte findet man bei Herzerkrankungen einschließlich Myokardinfarkt, Skelettmuskelerkrankungen, Erkrankungen der Leber und der Gallenwege,

hämolytischen Anämien, perniziösen Anämien, mechanischer Hämolyse bei künstlichen Herzklappen, Leukämien und anderen malignen Erkrankungen (Bruhn et al., 2011).

5.3 LAKTAT UND LDH IN SPUTUM UND BAL VON CF- UND NON-CF-PATIENTEN

Es konnte gezeigt werden, dass in jeder CF-Sputum-Probe Laktat vorhanden ist. Die durchschnittliche Laktat-Konzentration betrug $3,1 \pm 2,8$ mmol/l. Dabei war eine Spanne der Laktat-Werte von 0,1 bis 12,4 mmol/l feststellbar. Laktat ist demnach, unabhängig von dem jeweiligen Krankheitszustand des CF-Patienten, immer nachweisbar. Es konnten dabei aber auch große individuelle Unterschiede bei der Höhe der Laktat-Werte beobachtet werden. Während es bei einigen Patienten im Rahmen einer Exazerbation nur zu einem geringen Anstieg des Laktat-Wertes kam (siehe Abb. 14), waren bei anderen Patienten stets relativ hohe Laktat-Werte im Verlauf mit ebenso großer Schwankung zwischen stabilen Krankheitsphasen und Exazerbationen zu registrieren. Die Werte sollten demnach für den einzelnen Patienten im Verlauf individuell betrachtet werden.

Laktat konnte ebenso in den Sputum-Proben von Non-CF-Patienten ermittelt werden. Die mittlere Laktat-Konzentration im Sputum dieser Patienten lag bei $1,5 \pm 0,9$ mmol/l. Damit liegt dieser Wert, wie erwartet, deutlich unter der mittleren Laktat-Konzentration im CF-Sputum ($3,1 \pm 2,8$ mmol/l). Laktat im Sputum ist demnach nicht spezifisch für CF. Es war ebenso in der von PMN dominierten chronischen Lungenerkrankung COPD (Mannino et al., 2003) nachweisbar, wenn auch in geringerer Konzentration.

Zur Einschätzung der Bedeutung der Dimension der durchschnittlichen Laktat-Konzentration von $3,1 \pm 2,8$ mmol/l kann bei fehlenden Referenzwerten im Sputum zunächst lediglich der Laktat-Wert im Blutplasma herangezogen werden. Als Referenzwert im venösen Blutplasma gilt eine Konzentration von 0,5 bis 2,2 mmol/l (Tiller und Stein, 2005). Die im CF-Sputum ermittelten durchschnittlichen Werte liegen demnach über der als physiologisch geltenden Spanne der Laktat-Werte im Blutplasma, die im Non-CF-Sputum ermittelten Werte liegen innerhalb des Referenzbereichs. Die hier gemessenen Werte sind ebenso vergleichbar mit den von Bense (2009) ermittelten Daten, die ergaben, dass durchschnittlich $2,9 \pm 3,1$ mmol/l Laktat in einem CF-Sputum nachweisbar sind.

Es konnte eine schwach positive Korrelation zwischen Laktat im Sputum und CRP im Serum von CF-Patienten ermittelt werden ($r = 0,33$; $p = 0,065$). Es existiert demnach ein Zusammenhang zwischen der etablierten CF-Markersubstanz CRP (Shoki et al., 2013) und dem untersuchten Laktat. Hohe Laktat-Werte im Sputum korrelieren mit hohen CRP-Werten im Serum. Während der Anstieg des Laktats auf einer gesteigerten Produktion durch die PMN beruht, stellt die bakterielle Entzündung an sich den größten Stimulus für einen CRP-Anstieg dar (Bühler et al., 2003; Tiller und Stein, 2005; Dörner, 2009). Des Weiteren ist jedoch zu berücksichtigen, dass CRP als systemischer Entzündungsmarker nicht nur den Zustand der Lunge widerspiegelt.

Auch in den CF-BAL-Proben war Laktat messbar. Die mittlere Laktat-Konzentration lag bei $2,6 \pm 4,1$ mmol/l und damit niedriger als im CF-Sputum. Die höchsten Werte waren dabei in nativem Mukus nachweisbar. Je mehr NaCl-Spülungen im Ablauf der BAL durchgeführt wurden, desto stärker waren die Proben verdünnt und die Laktat-Werte demnach erwartungsgemäß niedriger. Dies erklärt die relativ hohe Standardabweichung bei der Angabe der mittleren Laktat-Konzentration. Die mittlere Laktat-Konzentration in den Non-CF-BAL-Proben lag bei $0,3 \pm 0$ mmol/l und damit ebenso deutlich unter dem Wert der CF-Patienten. Da bei den Non-CF-Patienten kaum Mukus im Bronchialsystem vorhanden war, wurden selten native Proben gewonnen. Dies erklärt die stets sehr niedrigen Laktat-Werte. Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Laktatmessung in verdünnten BAL-Proben nicht sinnvoll ist.

Die Gewinnung der Sputum- und BAL-Proben zur Laktat-Messung unterscheidet sich deutlich. Sputum wird ohnehin mehrmals täglich von einem CF-Patienten expektoriert und der Personal- sowie Materialaufwand für die Laktat-Messung ist entsprechend gering. Vor der Durchführung einer BAL erfolgt ein ausführliches ärztliches Aufklärungsgespräch über mögliche Risiken und Komplikationen der Untersuchung. Der personelle, technische und ökonomische Aufwand für die Durchführung ist hoch. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Patienten in vielen Fällen sediert werden müssen, was wiederum ein mögliches Risiko darstellt. Bei starken Hustenstößen während der Untersuchung kann es zu Bronchuseinrissen kommen. Für CF-Patienten in kritischem Zustand ist zu berücksichtigen, dass es zu einer transienten Verschlechterung der Lungenfunktion nach BAL kommen kann (Hien, 2012). Die nicht-invasive Gewinnung der CF-Sputum-Proben ist demnach wesentlich einfacher als die Gewinnung der BAL-Proben und durch den fehlenden Verdünnungseffekt kann die Bestimmung im Sputum genauer erfolgen.

Bei der Angabe einer durchschnittlichen Laktat-Konzentration für alle bearbeiteten CF-Sputen werden sowohl die Konzentrationen aus Sputen von Patienten in stabilen Krankheitsphasen in einem vergleichsweise guten Allgemeinzustand sowie aus Sputen von Patienten in akuten Exazerbationen zusammengefasst. Dass der Wert trotzdem im Vergleich zum Plasma-Referenzwert relativ hoch ist, ist insofern nicht überraschend, da in der CF-Lunge ein chronischer Infektions- und Inflammationszustand besteht (Koch und Høiby, 1993; Döring und Høiby, 2004; Ratjen, 2009; Ulrich et al., 2010).

Die mittlere LDH-Konzentration im CF-Sputum lag bei $119,7 \pm 96,3 \mu\text{mol/l}$, bei Non-CF-Patienten dagegen bei $19,4 \pm 17,7 \mu\text{mol/l}$. Die mittlere LDH-Konzentration in den CF-BAL lag bei $84,5 \pm 166,4 \mu\text{mol/l}$, bei Non-CF-BAL dagegen bei $5,1 \pm 7,3 \mu\text{mol/l}$. Damit liegen die LDH-Werte der CF-Patienten in Sputum und BAL deutlich über den Werten der Non-CF-Patienten. Die Ursache dafür ist analog zum Laktat bei der hohen PMN-Konzentration in der CF-Lunge zu suchen. Das hauptsächlich von den PMN mittels LDH im Rahmen des Inflammationsgeschehens gebildete Laktat (Bensel, 2009) kann als Maß für deren Aktivität in der CF-Lunge gelten. Für eine gemeinsame Quelle beider Substanzen spricht die hohe positive Korrelation von Laktat und LDH im CF-Sputum ($r = 0,86$, Abb. 12).

Der Referenzwert für LDH im Serum liegt bei unter 65-jährigen Patienten bei $< 262 \text{ U/l}$ (Tiller und Stein, 2005). Dies entspricht mit einem Umrechnungsfaktor von 0,0167 in etwa $4,37 \mu\text{mol/l}$ (<http://www.medizin.uni-greifswald.de/klinchem/index.php?id=361> [Zugriff am 01.12.2013]). Somit liegt die im CF-Sputum ermittelte durchschnittliche LDH-Konzentration deutlich über der physiologischen Höchstgrenze im Serum. Dies erlaubt jedoch keine direkte Bewertung des ermittelten Durchschnittswertes, es stellt lediglich eine Hilfe zur Einschätzung der Höhe dar. Auch für die LDH gilt, dass keine Referenzwerte aus Sputum oder BAL von Gesunden bekannt sind. Es fällt jedoch auf, dass die LDH-Werte in Sputum und BAL der Non-CF-Patienten dem Referenzbereich deutlich näher sind als die Werte der CF-Patienten.

5.4 LAKTAT, LDH UND FEV₁ BEI EXAZERBATION UND THERAPIE

In 13 Fällen konnten Sputumpare, d.h. eine Sputum-Probe bei Exazerbation und eine weitere Sputum-Probe während Therapie eines CF-Patienten, untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Laktat-Konzentration im Sputum von CF-Patienten bei Exazerbation mit $5,2 \pm 3,3 \text{ mmol/l}$ signifikant höher war als die Laktat-Konzentration im Sputum während antibiotischer Therapie mit $1,9 \pm 2,1 \text{ mmol/l}$ ($p = 0,006$). Der Wert lag

bei Exazerbation oberhalb und während der Therapie im Referenzbereich für Laktat im venösen Blutplasma. Bei einer infektgetriggerten Exazerbation im Krankheitsverlauf einer CF kommt es zum massenhaften Einstrom von PMN, Makrophagen und T-Zellen in die Lunge (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003; Downey et al., 2009). Da das im Sputum messbare Laktat zu großen Teilen von den PMN gebildet wird (Bensel, 2009), ist während einer akuten Exazerbation eine erhöhte Konzentration nachweisbar. Erfolgt nun die resistenzgerechte inhalative oder intravenöse antibiotische Therapie bei Exazerbation, kommt es neben der bakteriziden bzw. bakteriostatischen Wirkung des Antibiotikums zu einer Modulation des Entzündungsgeschehens. Die Anzahl der PMN in der CF-Lunge nimmt ab (Gibson et al., 2003; Ratjen und Döring, 2003; Downey et al., 2009). Der Allgemeinzustand und die Lungenfunktion des Patienten sind wieder gebessert (Fuchs et al., 1994). Die Laktat-Konzentration im Sputum nimmt ebenso wieder ab.

Die LDH-Werte der 13 untersuchten Sputumpaare lagen bei Exazerbation mit $197,0 \pm 91,4 \mu\text{mol/l}$ s höher als mit $113,8 \pm 83,6 \mu\text{mol/l}$ s während Therapie ($p = 0,053$). Die Tendenz ist bei LDH also ebenso vorhanden, das Ergebnis ist jedoch nicht statistisch signifikant. Eine mögliche Ursache dafür könnte die schlechtere Stabilität von LDH im Vergleich zu Laktat sein.

Laktat im CF-Sputum ist somit potenziell geeignet, den aktuellen Krankheitszustand der Patienten widerzuspiegeln. Der Parameter ändert sich erheblich, je nach dem ob ein akuter Exazerbationszustand vorliegt oder dieser adäquat therapiert wird. Dies qualifiziert den Parameter als möglichen Entzündungsmarker im Sputum beim CF-Krankheitsgeschehen.

Werden die Ergebnisse der CF-Sputumpaare genauer betrachtet, fällt auf, dass bei einem Probenpaar die Laktat-Konzentration von $1,1 \text{ mmol/l}$ während der Therapie auf $1,3 \text{ mmol/l}$ anstieg. Die LDH-Konzentration jedoch fiel in diesem Falle von $87,6 \mu\text{mol/l}$ s auf $72,6 \mu\text{mol/l}$ s. Initial hatte der Patient eine allgemeine Zustandsverschlechterung und Flankenschmerzen angegeben. Nach 15 Tagen intravenöser antibiotischer Therapie war keine Besserung eingetreten und zusätzlich bestand Fieber. Die FEV₁-Werte fielen von $40,7 \%$ am 1. Therapietag auf $32,4 \%$ an Tag 15, was die fehlende klinische Verbesserung objektiviert. Die Keimzahl von *B. cepacia* vor und während der Therapie blieb unverändert hoch ($1,5 \times 10^9 \text{ KBE/ml}$). Die antibiotische Behandlung ist hier vermutlich fehlgeschlagen. Die Laktat-Konzentration und die FEV₁-Werte spiegeln dies wider, die LDH-Konzentration im Sputum nicht.

Während die Laktat-Konzentration im CF-Sputum während Therapie signifikant abnimmt, ändern sich die FEV₁-Werte dagegen kaum. Bei Exazerbation lagen die Werte im Mittel bei $43,9 \pm 16,2$ % und während Therapie bei $44,7 \pm 23,8$ % ($p = 0,94$). Es konnte eine schwache negative Korrelation ($r = -0,34$; $p = 0,012$) von Laktat im CF-Sputum und der FEV₁ ermittelt werden. Die schwach negative Korrelation beruht auf dem gemeinsamen Faktor einer starken Entzündung als Ursache für einen hohen Laktat-Wert und eine schlechte Lungenfunktion. Bei 7 Probenpaaren waren gleichzeitig Laktat-Werte und FEV₁ bei Exazerbation und Therapie bekannt. Bei 5 dieser 7 Paare kam es im Verlauf der Therapie gleichzeitig zu einer Zunahme der FEV₁ und einer Abnahme der Laktat-Konzentration im Sputum als Zeichen einer suffizienten Therapie. Bei einem dieser 7 Paare kam es zu einer Abnahme der FEV₁ bei gleichzeitiger Zunahme der Laktat-Konzentration als mögliches Zeichen einer ineffektiven Therapie.

5.5 STABILITÄT VON LAKTAT UND LDH

Um die Eignung von Laktat als Entzündungsmarker zu testen, wurde die Stabilität bei Kühl- und Gefrierschranktemperaturen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Laktat im direkten Vergleich zu LDH stabiler ist. Laktat im Überstand von bearbeiteten Sputum-Proben war sowohl bei Lagerung im Kühlschrank für 7 und für 30 Tage stabil, als auch bei Lagerung im Gefrierschrank für 7 und für 30 Tage. LDH war lediglich bei Lagerung im Gefrierschrank für 7 Tage stabil. Bei Lagerung bei +6°C kam es zu einem deutlichen Abfall der LDH-Werte im Überstand. Laktat zeigte keine Veränderungen der Konzentration unabhängig von Lagerungszeit und -temperatur.

Dieses Ergebnis spricht für die Eignung von Laktat als Entzündungsmarker im CF-Krankheitsgeschehen. Nicht nur unter stationären Bedingungen, wo eine Laborbestimmung bereits kurz nach Sputumexpektoriation erfolgen kann, sind die Laktat-Werte stabil. Auch im ambulanten Bereich, wo Laborfahrten gegebenenfalls nur ein- oder zweimal täglich erfolgen, kann durch Lagerung der Laktatüberstände im Kühl- oder Gefrierschrank eine verlässliche Bestimmung Laktat-Werte erfolgen.

5.6 BAKTERIEN UND LAKTAT IM SPUTUM

Als dominante Erreger im CF-Sputum konnten *P. aeruginosa* (48,1 %), *S. aureus* (29,6 %) und *B. cepacia* (25,9 %) ausgemacht werden. Bei 3 Patienten lag eine Koinfektion von *P. aeruginosa* und *S. aureus* vor. Damit lag in der hier vorliegenden Studie eine für CF-Patienten typische Bakterienbesiedlung der Lunge vor. Sowohl die

identifizierten Spezies als auch die Dominanz von *P. aeruginosa* entsprechen der bekannten CF-Infektionssituation (Koch und Højby, 1993).

Es wurde untersucht, ob die im Sputum nachweisbaren CF-Haupterreger und die am häufigsten nachgewiesenen Anaerobier, *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.*, einen Einfluss auf die Höhe des im Sputum messbaren Laktats haben. Dabei stellte sich heraus, dass in den Proben mit *S. aureus* mit $3,8 \pm 3,0$ mmol/l die höchste und in Proben mit *S. saccharolyticus* mit $2,1 \pm 2,4$ mmol/l die niedrigste Laktat-Konzentration messbar war. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht registriert werden. Dies wurde insofern nicht erwartet, da davon ausgegangen wird, dass das Laktat von PMN in der CF-Lunge gebildet wird (Bensel et al., 2011). Die CF-Haupterreger *P. aeruginosa* und *B. cepacia* produzieren unter anaeroben Bedingungen kein Laktat und *S. aureus* mit 1,9 mmol/l in 24 Stunden im Vergleich zu den PMN wenig Laktat (Bensel et al., 2011). Auch *S. saccharolyticus* und *Veillonella spp.* konnten bei dieser Studie als Laktat-Produzenten ausgeschlossen werden (Bensel et al., 2011).

Es zeigte sich, dass im Sputum nachweisbare Erreger auch nach antibiotischer Therapie in kaum veränderter Keimzahl stets weiterhin nachweisbar waren. Eine Eradikation der Erreger konnte selbst mit einer Therapie, die den klinischen Zustand des Patienten deutlich besserte, nicht erreicht werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein (Tunney et al., 2008; Worlitzsch et al., 2009).

Bei 2 Non-CF-Patienten war *S. aureus* im Sputum nachweisbar. Es waren ebenso SMG-Erreger in den Non-CF-Proben vorhanden. In keiner Probe konnte *P. aeruginosa* identifiziert werden, was die spezifische Rolle dieses Bakteriums bei CF unterstreicht. In 5 von 18 Non-CF-Proben waren Anaerobier nachweisbar. Es handelt sich mit *S. saccharolyticus*, *S. constellatus* und *Peptostreptococcus prevotii* um Spezies, die auch in der CF-Lunge zu finden waren.

Zahlreiche Streptokokken, die zunächst als orale Kontamination gedeutet wurden, wurden aufgrund von positiven aeroben Wachstumskontrollen nicht identifiziert und quantifiziert. Es ist wahrscheinlich, dass z.B. SMG so der Bakterienbestimmung entgangen ist und eigentlich häufiger im Sputum vorhanden war als die absoluten Zahlen es in dieser Studie angeben. Zusammenfassend kann man feststellen, dass Bakterien für die Bildung von Laktat in der CF-Lunge keine hervorragende Rolle spielen.

5.7 GEGENÜBERSTELLUNG MIT ETABLIERTEN MARKERN

Im klinischen Alltag erfolgt eine Objektivierung des Allgemeinzustands der Patienten in den meisten Fällen auch mittels Bestimmung der Lungenfunktionsparameter FEV₁ und FVC. Die Verschlechterung der Lungenfunktion von > 10 % gilt als ein mögliches Kriterium für eine Exazerbation (Fuchs et al., 1994). Eine optimale Therapieüberwachung ist insofern von großer Bedeutung, da eine suffiziente antibiotische Behandlung der infektgetriggerten Exazerbation die Prognose der CF entscheidend beeinflusst (Rogers et al., 2011). Die Bodyplethysmographie ist eine körperlich anstrengende Untersuchung, deren Ergebnis stark von der Compliance des Patienten abhängt. Dadurch können erfasste Werte sehr variieren und die Überwachung des Therapie erschwert werden.

Die im Rahmen des Inflammationsvorgangs bei Exazerbation sezernierten Zytokine schädigen das CF-Lungengewebe kontinuierlich (Ratjen 2009; Ulrich et al., 2010). Verstärkter Elastinabbau (Goldstein und Döring, 1986; Viglio et al., 2000, Ulrich et al., 2010) und vermehrte Kollagensynthese führen zur typischen Fibrosierung des Lungengewebes, bronchialer Wandverdickung sowie der Ausbildung von Bronchiektasen (Bedrossian et al., 1976; Sobonya und Taussig 1986; Durieu et al., 1998; Tiddens et al., 2000). Mit zunehmender Häufigkeit der Exazerbationen kommt es zu einer stetigen Verschlechterung der Lungenfunktion. Diese langfristig erworbenen Strukturveränderungen der Lunge bedingen die im Krankheitsverlauf zu registrierende progressive Einschränkung der Lungenfunktion (Rogers et al., 2004). Patienten, deren Lunge strukturell schon stärker geschädigt ist, haben auch in stabilen Krankheitsphasen relativ schlechte FEV₁- und FVC-Werte. Bei Patienten, deren Lunge noch nicht so stark von den Veränderungen betroffen ist, ist die Spanne der FEV₁- und FVC-Werten zwischen den stabilen Krankheitsphasen und den Exazerbationen größer. Dies ist mit den hier ermittelten Werten nachvollziehbar. Bei einem Patienten bewegten sich die FEV₁-Werte im Beobachtungszeitraum lediglich zwischen 18,4 und 24,3 %, die FVC-Werte zwischen 28,2 und 37,0 l. Bei einem weiteren Patienten war die Spanne dagegen deutlich größer. Die FEV₁-Werte lagen im Beobachtungszeitraum zwischen 79,1 und 99,6 und die FVC-Werte zwischen 106,8 und 116,3 l.

Die Lungenfunktionsparameter sind also durchaus dazu geeignet, einen individuellen Krankheitsverlauf darzustellen. Die Werte verschiedener Patienten sind jedoch nicht miteinander vergleichbar. Ebenso ist eine Bestimmung mit einem gewissen Zeit-, Material- und Personalaufwand verbunden und bedeutet für die schwer kranken

Patienten oft eine große körperliche Anstrengung. Einen weiteren Laborparameter zur Ergänzung der Befunde zu erheben, erscheint sinnvoll. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen kann die Bestimmung von Laktat im Sputum als non-invasiver, stabiler und für die CF geeigneter Entzündungsmarker ergänzend zur Bestimmung der Lungenfunktion empfohlen werden.

Laktat ist geeignet, den Krankheitsverlauf der CF als Markersubstanz zu objektivieren. Zudem erfolgt die Probengewinnung non-invasiv, mit geringstem Materialaufwand (1 Falcon-Röhrchen) und ohne Personalaufwand. Des Weiteren ist Laktat stabil bei Lagerung im Kühl- und im Gefrierschrank, und die Bestimmung ist kostengünstig (Dörner, 2009).

CRP gilt als geeigneter Entzündungsmarker im Serum von CF-Patienten. Dies hatte ein Vergleich von derzeit 78 in der CF-Diagnostik existierenden venösen Markersubstanzen ergeben (Shoki et al., 2013). Laktat wurde bei keiner in dieser Metaanalyse verglichenen Studie untersucht.

Die Bestimmung von CRP erfolgt standardisiert und flächendeckend und kostet etwa das doppelte einer Laktat-Bestimmung (Bühler et al., 2003; Dörner, 2009). Zusätzlich zu den Bestimmungskosten müssen die Material- und Personalkosten für eine venöse Blutentnahme berücksichtigt werden. Die Turbidimetrie und die Nephelometrie sind Verfahren zur quantitativen CRP-Bestimmung. Da unterschiedliche Methoden zur Anwendung kommen, sind die Ergebnisse verschiedener Laboreinrichtungen nicht immer vergleichbar (Bühler et al., 2003).

Die Nachteile des CRP liegen allerdings darin, dass es keinen Hinweis auf die Entzündungslokalisation gibt (Bühler et al., 2003). Ist bei einem CF-Patienten eine CRP-Erhöhung zu registrieren, kann dies sowohl eine Exazerbation als auch beispielsweise einen Harnwegsinfekt bedeuten. Es konnte lediglich eine schwache positive Korrelation von Laktat im Sputum und CRP im Serum ermittelt werden. Möglicherweise kommt dies zustande, weil Laktat im Sputum nur die Situation in der Lunge widerspiegelt, CRP hingegen unspezifisch den gesamten Organismus erfasst.

Die CRP-Bestimmung setzt eine Blutentnahme voraus, die für die CF-Patienten eine weitere invasive Maßnahme bedeutet, während Sputum sowieso mehrmals täglich expektoriert wird. Während jedoch bei jungen Patienten, die noch kein Sputum

expektorieren, eine Laktat-Messung im Sputum nicht möglich ist, kann eine CRP-Bestimmung in jedem Alter erfolgen.

Die LDH-Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels einfachem optischen Test. Dies ist eine preiswerte Methode (Kosten < 5,00 €). LDH ist generell zur Verlaufskontrolle von verschiedenen Erkrankungen geeignet (Dörner, 2009). Um eine sichere Bestimmung zu gewährleisten, sollte die Probe frei von zellulären Bestandteilen sein. Im Nativ-Sputum ist dies nicht zu gewährleisten. Nach Bearbeitung und Separierung des flüssigen Überstands einer Probe, wird die Haltbarkeit des Untersuchungsmaterials mit 1 Woche bei Raumtemperatur angegeben (Dörner, 2009). Dies konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen nicht reproduziert werden. Da die Bestimmung durch verschiedene Inhibitoren (Reagenzienverunreinigungen) beeinflusst wird, zählt die LDH-Methode insgesamt zu den weniger sicheren Verfahren im klinischen Labor (Dörner, 2009).

Die Bestimmung von Zytokinen wie IL-6 und IL-8 sind vergleichsweise kostenintensiv, ebenso wie die Bestimmung der PMN-Elastase (Kosten nach GOÄ aus Bühler et al., 2003). Die Kosten unterliegen Schwankungen, so dass der genaue Preis variiert. Des Weiteren sind individuelle Verträge von Krankenhäusern mit dem jeweiligen Labor ausschlaggebend für den endgültigen Preis. Aber das Verhältnis der Kosten wird annähernd konstant bleiben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Bestimmung von Laktat (< 5,00 €, Dörner, 2009) stets günstiger sein wird als die Bestimmung der zuvor genannten Parameter.

Laktat ist abschließend als geeigneter, non-invasiver Entzündungsmarker in der paraklinischen Diagnostik der CF anzusehen. Es stellt eine kostengünstige, routinemäßig messbare und im klinischen Alltag einfach zu ermittelnde sinnvolle Ergänzung zu der etablierten Markersubstanz CRP im Serum und auch zu der bodyplethysmographisch ermittelten FEV₁ dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der suffizienten Exazerbationstherapie wird eine entscheidende Rolle bei der Verbesserung der Prognose von Patienten mit CF zugesprochen. Als Goldstandard in der Diagnostik der akuten Exazerbation gilt die bodyplethysmographisch zu bestimmende FEV₁. Routinemäßig eingesetzt wird in der Klinik ebenso das im Serum zu ermittelnde CRP. Diese Parameter erwiesen sich als zuverlässig in der Objektivierung des klinischen Zustands, bedeuten jedoch stets einen invasiven Eingriff oder eine große Anstrengung für die oftmals schwer kranken Patienten. Zusätzliche Markersubstanzen wären hilfreich. Es wurden zahlreiche weitere Marker in Blut und Sputum der Patienten untersucht. Bisher konnte sich keiner dieser Marker in der Klinik etablieren.

Seit kurzer Zeit ist bekannt, dass in praktisch jeder CF-Sputum-Probe Laktat messbar ist. Laktat kann unter anaeroben Bedingungen als Produkt der anaeroben Glykolyse aus Pyruvat gebildet werden. Als Produzenten des Laktats konnten die PMN, die im Rahmen des Inflammationsgeschehens in großen Mengen in die CF-Lunge einströmen, ausgemacht werden. Die PMN befinden sich größtenteils in den Mukusplaques, wo nachweislich anaerobe Verhältnisse herrschen. Die CF-Haupterreger *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *B. cepacia* konnten als Laktat-Produzenten ausgeschlossen werden.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war, Laktat als Entzündungsmarker im Sputum von CF-Patienten zu evaluieren. Dazu sollten die Laktat- und LDH-Konzentrationen in CF-Sputum- und BAL-Proben ermittelt werden. Analoge Untersuchungen erfolgten bei Non-CF-Patienten. Die Korrelation von Laktat und LDH, Laktat und CRP sowie von Laktat und FEV₁ sollte untersucht werden. Es sollte ein Vergleich der Laktat-, LDH- und FEV₁-Werte bei Exazerbation und während antibiotischer Therapie erfolgen. Um die Evaluierung als Entzündungsmarker zu komplettieren, sollte untersucht werden, ob Laktat und LDH unter Kühl- und Gefrierbedingungen stabil sind.

Es wurden Sputum-Proben von Patienten bearbeitet, die sich in der CF-Ambulanz der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I an der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) vorstellten. Dabei konnten im Untersuchungszeitraum 82 Sputum- und 22 BAL-Proben von 27 Patienten, darunter 14 Männer und 13 Frauen, bearbeitet werden. Des Weiteren wurden 8 Sputum- und 10 BAL-Proben von 14 Non-CF-Patienten

untersucht. Nach der Bearbeitung der Proben erfolgten die Laktat- und LDH-Messungen spektrophotometrisch im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale). Es erfolgte, wenn vorhanden, die Dokumentation von klinischen Angaben, der aktuellen Lungenfunktionswerte und des CRP. Es wurde ebenso die Identifizierung und -quantifizierung der im Sputum enthaltenen Bakterien durchgeführt. Für Patienten, die mehr als 5 Proben abgaben, wurde ein Patientenverlauf erstellt. Um die Stabilität von Laktat und LDH zu testen, wurden am Abnahmetag, nach 7 und 30 Tagen bei Lagerung unter Kühl- (6 °C) und Gefrierbedingungen (-51 °C) die Laktat- und LDH-Konzentrationen mehrerer Proben bestimmt.

Unabhängig vom individuellen Krankheitszustand war in allen CF-Sputum-Proben Laktat nachweisbar. Es waren durchschnittlich $3,1 \pm 2,8$ mmol/l Laktat und $119,7 \pm 96,3$ µmol/l LDH messbar. Damit lagen die Werte über den für Non-CF-Patienten ermittelten Laktat- und LDH-Konzentrationen im Sputum ($1,5 \pm 0,9$ mmol/l; $19,4 \pm 17,7$ µmol/l). Auch in allen CF-BAL-Proben war Laktat nachweisbar. Die Werte waren höher als bei den Non-CF-BAL-Proben ($2,6 \pm 4,1$ vs. $0,3 \pm 0,0$ mmol/l). Es konnte eine hoch positive Korrelation von Laktat und LDH im Sputum ermittelt werden ($r = 0,86$; $p = < 0,0001$). Die durchschnittlich dokumentierte FEV₁ lag bei $46,0 \pm 19,9$ %. Es konnte eine schwach negative Korrelation von Laktat im Sputum und der FEV₁ ermittelt werden ($r = -0,34$; $p = 0,012$). Es fand sich eine schwach positive Korrelation von Laktat und CRP ($r = 0,33$; $p = 0,065$). Laktat erwies sich im Gegensatz zu LDH als stabil unabhängig von Lagerungszeit und -temperatur.

Es konnte gezeigt werden, dass die Laktat-Konzentration im Sputum bei Exazerbation mit $5,2 \pm 3,3$ mmol/l signifikant höher ist als mit $1,9 \pm 2,1$ mmol/l während Therapie ($p = 0,006$). Die LDH-Konzentration fiel während Therapie von $197,0 \pm 91,4$ µmol/l auf $113,8 \pm 83,6$ µmol/l ($p = 0,054$). Die FEV₁ änderte sich während Therapie kaum.

Die am häufigsten nachgewiesenen CF-Haupterreger waren *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *B. cepacia*. Dies entspricht der für CF typischen Bakterienbesiedlung der Lunge. In zahlreichen Sputum-Proben konnten obligate Anaerobier in hohen Keimzahlen nachgewiesen werden. Am häufigsten handelte es sich dabei um *Veillonella spp.*, *Staphylococcus spp.* und *Streptococcus spp.* In den BAL-Proben konnten obligate Anaerobier direkt aus der CF-Lunge identifiziert werden. Die Bakterien haben allerdings keinen Einfluss auf die Höhe der Laktat-Konzentration im Sputum.

Das Laktat spiegelt die Aktivität der PMN in der CF-Lunge wider. Die chronische Lungeninfektion und das daraus resultierende schwere Inflammationsgeschehen sind typisch für die CF. Auch die COPD ist eine von PMN dominierte chronische Lungenerkrankung. Laktat im Sputum ist demnach nicht spezifisch nur bei der CF vorhanden. Das Ausmaß der Infektion und Inflammation bei der COPD ist jedoch geringer, was die niedrigeren Laktat-Werte in den Non-CF-Proben erklärt.

Es konnte gezeigt werden, dass Laktat als Entzündungsmarker im Sputum von CF-Patienten geeignet ist, den klinischen Zustand des Patienten zu objektivieren. Eine suffiziente Antibiotikatherapie während einer Exazerbation führt zu einer Reduktion der Laktat-Konzentration im Sputum. Dies bedeutet, dass Laktat den Therapieerfolg anzeigen kann. Die Laktat- und LDH-Werte im CF-Sputum haben eine hohe Korrelation, was für eine gemeinsame Quelle beider Parameter spricht. Laktat im Sputum und die FEV₁ korrelieren schwach negativ. Es konnte kein signifikanter Unterschied der FEV₁ bei Exazerbation und Therapie demonstriert werden. Eine Verbesserung der FEV₁ geht mit einer Verringerung der Laktat-Konzentration im Sputum einher. Die Ermittlung der FEV₁ ist stark von der Compliance des Patienten abhängig. Außerdem kommt es mit zunehmender Häufigkeit von stattgehabten Exazerbationen zu bleibenden Strukturschäden der Lunge, welche eine progressive Einschränkung der Lungenfunktion bedingen. Bei stark strukturgeschädigten Lungen sind demnach kaum noch Verbesserungen der Lungenfunktion selbst durch eine suffiziente Therapie zu objektivieren, obwohl es den Patienten klinisch besser geht.

Goldstandard in der Diagnostik der akuten Exazerbation ist weiterhin die FEV₁. Derzeit gilt das CRP als gut geeignete Markersubstanz im CF-Serum. Während dessen Bestimmung lediglich im venösen Blut erfolgen kann, liegt der Vorteil des Laktats im Sputum in der non-invasiven Bestimmung. Das CRP als systemischer Marker kann eine Entzündung nicht lokalisieren, das Laktat hingegen stammt direkt aus der Lunge. Bei jungen CF-Patienten, die noch kein Sputum expektorieren, ist jedoch keine Laktat-Bestimmung möglich. Bei diesen Patienten muss weiterhin auf systemische Marker zurückgegriffen werden. Zusätzlich ist die Messung nicht, wie bei der FEV₁, von der Compliance des Patienten abhängig. Die Bestimmung von Laktat kann einfach und kostengünstig erfolgen und stellt somit eine ausgezeichnete Ergänzung zum etablierten CRP und der FEV₁ dar. Dies ist insofern von großer Bedeutung, da eine optimale Therapieüberwachung und damit eine suffiziente antibiotische Behandlung der Exazerbation die Prognose der CF entscheidend beeinflussen kann.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aduen J, Bernstein WK, Khastgir T, Miller J, Kerzner R, Bhatiani A, Lustgarten J, Bassin AS, Davison L, Chernow B (1994) The use and clinical importance of a substrate-specific electrode for rapid determination of blood lactate concentrations. *Jama* 272(21):1678-85.

Allan J L, Robbie M, Phelan PD, Danks DM (1981) Familial occurrence of meconium ileus. *Europ. J. Pediat.* 135:291-292.

Aurora P, Wade A, Whitmore P, Whitehead B (2000) A model for predicting life expectancy of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 16:1056-60.

Bedrossian CWM, Greenberg SD, Singer DB, Hansen JJ, Rosenberg HS (1976) The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Human Pathol* 7:195-204.

Bensel T (2009) Laktat als anaerobes Stoffwechselprodukt im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose und *in vitro*. Dissertation Universität Halle-Wittenberg.

Bensel T, Stotz M, Borneff-Lipp M, Wollschläger B, Wienke A, Taccetti G, Campana S, Meyer KC, Jensen PØ, Lechner U, Ulrich M, Döring G, Worlitzsch D (2011) Lactate in cystic fibrosis sputum. *J Cyst Fibros* 10:37-44.

Berger M (2002) Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease. *Allergy Asthma Proc* 23:19-25.

Bruhn HD, Junker R, Schäfer H, Schreiber S: *Labormedizin*, 3. Auflage. Schattauer Verlag, Stuttgart, 2011, S. 84-85.

Bühler MN, Hergo ME, Schmidt GK: *Septische postoperative Komplikationen: Atlas für Unfallchirurgen und Orthopäden*. Springer Verlag, Wien, New York, 2003, S. 27-29.

Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, 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, Johansson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti, 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. *J Cyst Fibros* 7:179-196.

Chmiel JF, Konstan MW, Knesebeck JE, Hilliard JB, Bonefield TL, Dawson DV, Berger M (1999) IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas* infection in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 160:2040-2047.

Cystic fibrosis mutation database URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/Statistics-Page.html> [22.12.2013].

DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A (1998) Activation of NF- κ B by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101:2598-2606.

DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A (1995) Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce Interleukin-8. *J Clin Invest* 96:2204-2210.

Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 12(5):549-563.

Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS (2012) Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. *J Cyst Fibros* 11:461-479.

Döring G, Goldstein W, Botzenhart K, Kharazmi A, Schiøtz P, Høiby N and Dasgupta M (1986) Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* 64:597-605.

Döring G, Høiby N for the Consensus Study Group (2004) Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 3:67-91.

Döring G, Worlitzsch D (1995) Reactive oxygen species and arachidonic acid metabolites of polymorphonuclear leukocytes. *Immun Infekt* 23(5):148-57.

Dörner K: *Klinische Chemie und Hämatologie*. 7. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009, S. 258-259.

Downey DG, Bell SC, Elborn JS (2007) Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax* 64: 81-88.

Durieu I, Peyrol S, Gindre D, Bellon G, Durand DV, Pacheco Y (1998) Subepithelial fibrosis and degradation of the bronchial extracellular matrix in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 158:580-8.

Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M (2004) Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* 186:4596-4604.

Fall PJ, Szerlip HM (2005) Lactic acidosis: from sour milk to septic shock. *J intensive Care Med*. 20(5):255-271.

Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC (1995) Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 96:107-116.

Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME (1994) Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 331(10):637-642.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Car Med* 168:918-51.

Goldstein W, Döring G (1986) Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir* 134:49-56.

Grzybowski M (1996) Systemic inflammatory response syndrom criteria and lactic acidosis in the detection of critical illness among patients presenting to the emergency department. *Chest* 110:145.

Halwachs-Baumann G: *Labormedizin, Klinik Praxis Fallbeispiele*. 2. Auflage, Springer, Wien, NewYork, 2011, S. 97.

- Hassett DJ (1996) Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J bacterial*. 178(24):7322-7325
- Heijerman H, Westerman E, Conway S, Touw D, Döring G (2009) Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 8:295-315.
- Hien P: *Praktische Pneumologie*. 2. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2012, S 54.
- Horn F, Moc I, Schneider N Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G: *Biochemie des Menschen*. 3. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2005, S 78, 85.
- Hunninghake GW, Gadek JE, Lawley TJ, Crystal RG (1981) Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 68: 259-269.
- Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H (1992) Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 326:1187-91.
- Kerem BS, Rommens JM, Buchannan JA, Markiewicz D, Cox TK, Charkravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922):1073-1080.
- Kobayashi J, Kitamura S.(1996) Serum KL-6 for the evaluation of active pneumonitis in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 109:1276-82.
- Koch C, Høiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341:1065-1069.
- Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. (1989) New serum Indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest* 96:68-73.
- Kolpen M, Köhl M, Bjarnsholt T, Moser C, Hnasen CR, Liengaard L, Kharazmi A, Pressler T, Høiby N, Jensen PO (2014) Nitrous oxide production in sputum from cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection, *plos one* 9(1):e84353.
- Konietzko N, Wendel H, Wiesner B: *Erkrankungen der Lunge*. Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York, 1994, S. 617-627.
- Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. (1994) Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150:448-54.
- Kottmann RM, Kulkarni AA, Smolnycki KA, Lyda E, Dahanayake T, Salibi R, Honnons S, Jones C, Isern NG, Hu JZ, Nathan SD, Grant G, Phipps RP, Sime PJ (2012) Lactic acid is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and induces myofibroblast differentiation via pH-dependent activation of transforming growth factor- β . *Am J Respir Crit Care Med* 186 (8): 740-751.
- Linnemann M, Köhl M: *Biochemie für Mediziner*. 7. neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2005, S. 249

Mannino DM, Buist AS, Petty TL, Enright PL, Redd SC (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: lung function and mortality in the United States: data from First National health and Nutrition Examination Survey follow up study. *Thorax* 58:388-93.

Matsumoto T, Yokoi K, Mukaida N, Harada A, Yamashit J, Watanabe Y, Matsushima K (1997) Pivotal role of interleukin-8 in acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 62:581-587.

McColley SA, Stellmach V, Boas SR, Jain M, Crawford SE (2000) Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1877-80.

McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284:1523-1527.

Meyer KC, Zimmermann J (1993) Neutrophil mediators, *Pseudomonas* and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J Lab Clin Med.* 121:654-661.

Moore RB, Shapiro NI, Wolfe RE, Smith ES, Bermudez S, Bates D et al. (2001) The value of SIRS Criteria in ED Patients with presumed infection in predicting mortality. *Acad Emerg Med* 8(5):477

Nguyen HB, Rivers EP, Knoblich BP, Jacobsen G, Muzzin A, Ressler JA, Tomlanovich MC (2004) Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and severe shock. *Crit Care Med.* 32:1637-1642.

Nikolaizik WH, Knöpfl B, Leister E, de Boer P, Sievers B, Schöni MH (1998) The anaerobic threshold in cystic fibrosis: Comparison of v- slope method, lactate turn points, and conconi test. *Pediatr Pulmonol* 25:147-153.

Ohshimo S, Bonella F, Grammann N, Starke K, Cui A, Bauer PC, Teschler H, Kohno N, Guzman J, Costabel U (2009) Serum KL-6 as a novel disease marker in adolescent and adult cystic fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 26:47-53.

Peters AM (1998) Just how big is the pulmonary granulocyte pool? *Clin Sci* 94:7-19.

Rabin HR, Butler SM, Wohl ME, Geller DE, Colin AA, Schidlow DV, Johnson CA, Konstan MW, Regelmann WE (2004) Epidemiologic study of cystic fibrosis: pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 37:400-406.

Ratjen F (2009) Cystic Fibrosis: Pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* 54(5):595-602.

Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361:681-689.

Regelmann WE, Siefferman CM, Herron JM, Elliott GR, Clawson CC, Gray BH (1995) Sputum peroxidase activity correlates with the severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 19(1):1-9.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Lok S, Plavisc N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066-1073.

Rogers GB, Carroll MP, Connett GJ, Serisier DJ, Hockey PM, Kehagia V, Jones GR, Bruce KD (2005) Bacterial community diversity in the CF lung. *Pediatr Pulmonol* 28:95-97.

Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD (2004) Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 42(11):5176-5183.

Rogers GB, Hoffman LR, Döring G (2011) Novel concepts in evaluating antimicrobial therapy for bacterial lung infections in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 10: 387-400.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065.

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. *Pediatr Pulmonol.* 32(5):356-66.

Rosenstein BJ, Cutting GR (1998) The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 132: 589-95.

Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Hoffman LR, Redding GJ, Goss CH (2010) Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 182(5):627-632.

Schreiber K, Boes N, Eschbach M, Jaensch L, Wehland J, Bjarnsholt T, Givskov M, Hentzer M, Schobert M (2006) Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol* 188:659-668.

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K (1993) Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 365:654-657.

Shoki AH, Mayer-Hamblett N, Wilcox PG, Sin DD, Quon SB (2013) Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *Chest* 144(5):1659-1670.

Smith AL, Redding G, Doershuk C, Goldmann D, Gore E, Hilman B, Marks M, Moss R, Ramsey B, Rubio T (1988) Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbations in cystic fibrosis. *J Pediatr* 112:547-554.

Sobonya RE, Taussig LM (1986) Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 134:290-5.

Social Science Statistics, URL: www.socscistatistics.com/pvalues/pearsondistribution.aspx [07.01.2014]

Strieter RM, Belperio JA, Keane MP (2002) Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 109:699-705.

Synchron®-Systeme Methodenblatt Lactat

Synchron®-Systeme Methodenblatt Lactat-Dehydrogenase

Tiddens HA, Koopman LP, Lambert RK, Elliott WM, Hop WC, van der Mark TW, de Boer WJ, de Jongste JC (2000) Cartilaginous airway wall dimensions and airway resistance in cystic fibrosis lungs. *Eur Respir J* 15:735-42.

Tiller FW, Stein B: Das klinische Labor. 2. überarbeitete Aufl. ecomed. Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, Landsberg, 2005, S. 277-278.

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Döring G, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn JS (2008) Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177:995-1001.

Ulrich M, Worlitzsch D, Viglio S, Siegmann N, Iadarola P, Shute JK, Geiser M, Pier GB, Friedel G, Barr ML, Schuster A, Meyer KC, Ratjen F, Bjarnsholt T, Gulbins R, Döring G (2010) Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9:217-227.

Universität Greifswald, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Leistungsspektrum, Laborkatalog. <http://www.medizin.uni-greifswald.de/klinchem/index.php?id=361> [Zugriff am 01.12.2013]

Valerius NH, Koch C, Høiby N (1991) Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338:725-726.

Vander Wauven C, Piérard A, Kley-Raymann M, Haas D (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160:928-34.

Viglio S, Iadarola P, Lupi A, Trisolini R, Tinelli C, Balbi B, Grassi V, Worlitzsch D, Döring G, Meloni F, Meyer K, Dowson L, Hill S, Stockley R, Luisetti M (2000) MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. *Eur Respir J* 15:1039-1045.

Wagener JS, Rasouliyan L, VanDevanter DR, Pasta DJ, Regelman WE, Morgan WJ, Konstan MW (2013) Oral, inhaled, and intravenous antibiotic choice for treating pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 48(7):666-73.

Wolter JM, Rodwell RL, Bowler SD, McCormack JG (1999) Cytokines and inflammatory mediators do not indicate acute infection in cystic fibrosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:260-5.

Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G (1998) Catalase, Myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 11:377-383

Worlitzsch D, Meyer KC, Döring G (2013) Lactate levels in airways of patients with cystic fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 188 (1):111.

Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G (2009) Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 15:454-460.

Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109(3):317-325.

Yoon SS, Coakley R, Lau GW, Lyman SV, Gaston B, Karabulut AC, Hennigan RF, Hwang S-H, Buettner G, Schurr MJ, Mortensen JE, Burns JL, Speert D, Boucher RC, Hassett DJ (2006) Anaerobic killing of mucoid Pseudomonas aeruginosa by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *J Clin Invest* 116:436-446.

Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock REW, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ (2002) Pseudomonas aeruginosa anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3:593-603.

Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29:777-807

8 ANHANG

		 MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE - WITTENBERG	
		 Medizinische Fakultät Ethik-Kommission	
<p>Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale)</p> <p>Herrn Oberarzt Dr. D. Worlitzsch Institut für Hygiene Klinikum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Johann-Andreas-Segner-Straße 12</p> <p>06097 Halle</p>			
			
Ihre Zeichen	Ihr Schreiben vom	Unsere Zeichen	Datum
		hm-bü	06.04.2006
<p>Obligate anaerobe Bakterien im Sputum von Patienten mit cystischer Fibrose. Klinische Pilotstudie</p> <p>Sehr geehrter Herr Dr. Worlitzsch,</p> <p>mit Schreiben vom 04.04.2006 zum oben genannten Forschungsvorhaben haben Sie einen überarbeiteten Antrag mit geänderter Patienteninformation und Einverständniserklärung übersandt. Die Auflagen unseres Votums vom 22.03.2006 sind erfüllt.</p> <p>Ich kann Ihnen bestätigen, dass seitens der Ethik-Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens bestehen.</p> <p>Mit freundlichen Grüßen</p> <p> Prof. Dr. med. Stefan Grond Vorsitzender der Ethik-Kommission</p> <p><u>Nachrichtlich</u> Frau Oberärztin B. Wollschläger Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II</p>			<p>Postanschrift: 06097 Halle (Saale)</p> <p>Hausanschrift: Magdeburger Straße 27 06112 Halle (Saale)</p> <p>Geschäftsstelle: Tel 0345 557-4476 Fax 0345 557-4477 E-Mail ethik-kommission@medizin.uni-halle.de Internet: www.medizin.uni-halle.de</p> <p>Steuernummer: 111/144/02550 (Finanzamt Halle-Nord)</p>

9 THESEN

1. Die rechtzeitige und zuverlässige Diagnosestellung einer akuten Exazerbation ist bisweilen schwierig. Goldstandard in der Diagnostik ist die bodyplethysmographisch ermittelte Einsekundenkapazität (FEV₁). Klinisch routinemäßig eingesetzt wird ebenso das CRP im Serum.
2. Weitere Markersubstanzen wären hilfreich für die Diagnostik und Therapieüberwachung. Es wurden zahlreiche Substanzen in Serum und Sputum untersucht. Bisher ist kein weiterer Marker im klinischen Alltag etabliert.
3. Seit kurzem ist bekannt, dass in praktisch jeder CF-Sputum-Probe Laktat nachweisbar ist. Als Quelle des Laktats wurden die Neutrophilen Granulozyten (PMN), die im Rahmen des Inflammationsvorgangs massenhaft in die CF-Lunge einströmen, ausgemacht. Die CF-Haupterreger *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. aureus* produzieren unter anaeroben Bedingungen kein Laktat.
4. In allen CF-Sputum-Proben war Laktat nachweisbar. Es wurde eine mittlere Laktat-Konzentration von $3,1 \pm 2,8$ mmol/l ermittelt. Bei Non-CF-Patienten war diese mit $1,5 \pm 0,9$ mmol/l deutlich niedriger.
5. Es fand sich eine negative Korrelation zwischen Laktat im Sputum und der FEV₁ ($r = -0,34$; $p = 0,012$). Eine schlechte Lungenfunktion geht mit hohen Laktat-Werten einher.
6. Es ließ sich eine positive Korrelation von Laktat und CRP nachweisen ($r = 0,33$, $p = 0,065$). Hohe CRP-Werte im Serum korrelieren mit hohen Laktat-Werten im Sputum.
7. Die Laktat-Konzentration im CF-Sputum ist mit $5,2 \pm 3,3$ mmol/l während Exazerbation signifikant höher als mit $1,9 \pm 2,1$ mmol/l während Therapie ($p = 0,006$). Für LDH und FEV₁ konnte keine signifikante Veränderung registriert werden. Laktat ist demnach in der Lage, den aktuellen klinischen Zustand der CF-Patienten widerzuspiegeln.

8. Laktat ist im Gegensatz zu LDH stabil unter Kühl- und Gefrierbedingungen. Die Werte änderten sich unabhängig von Lagerungstemperatur und -zeit nicht.
9. Die Laktat-Konzentration im CF-Sputum ist unabhängig von der im Sputum nachweisbaren Bakterienspezies sowie der Keimzahl. Vermutlich besteht zur Keimzahl im Sputum lediglich ein indirekter Zusammenhang über die PMN.
10. Laktat ist demnach als non-invasiver, routinemäßig einsetzbarer, kostengünstiger und stabiler Entzündungsmarker in der paraklinischen Diagnostik der CF als Ergänzung zur FEV₁ und CRP geeignet. Eine optimale Diagnosestellung und Therapieüberwachung sind insofern von Bedeutung, da eine suffiziente Therapie einer infektgetriggerten Exazerbation die Prognose der CF entscheidend beeinflusst.

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Martin Stotz | Neuwerk 10 | 06108 Halle

Angaben zur Person

Geburtstag	27.12.1981
Geburtsort	Gera
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Angaben zur Ausbildung

Schulbildung	
07/2000	Albert-Schweizer-Gymnasium, Gera Allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung	
10/2004	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Studium der Humanmedizin
09/2006	1. Staatsexamen
11/2010	2. Staatsexamen
11/2010	Approbation als Arzt

Berufserfahrung & Praktika

09/2000 – 07/2001	Zivildienst beim Patientenbegleitdienst (Waldklinikum, Gera)
09/2001 – 01/2002	Ausbildung zum Rettungssanitäter (Arbeiter- Samariter-Bund, Gera)
10/2003 – 09/2004	1. Ausbildungsjahr zum Physiotherapeuten (Bildungszentrum für Medizinische Heilberufe, Gera)

01/2002 – 09/2004	Arzthelfer in der Praxis für Allgemeinmedizin sowie Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Gemeinschaftspraxis Stotz, Gera)
04/2011 – 03/2013	Assistenzarzt in Weiterbildung in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie (Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dölau)
Seit 05/2013	Assistenzarzt in Weiterbildung in der Klinik für Innere Medizin I (Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dölau)

Halle, 05.02.2014

Martin Stotz

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Halle, 05.02.2014

Martin Stotz

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Halle, 05.02.2014

Martin Stotz

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp, Direktorin des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gilt großer Dank für die freundliche Überlassung dieses Themas sowie für die Anregungen und Kritiken während der Doktorandenseminare.

Herrn PD Dr. med. habil. Dieter Worlitzsch, Oberarzt des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die Unterstützung bei Labor- und Schreifarbeiten und die freundliche Betreuung während der gesamten Zeit.

Frau Dr. med. Bettina Wollschläger, Oberärztin der Klinik für Innere Medizin I, und dem Team der CF-Ambulanz gilt mein Dank für die freundliche Mithilfe beim Einholen der Proben und die gute Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Andreas Wienke, stellvertretender Direktor des Instituts für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gilt großer Dank für die statistische Beratung.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors für Krankenhaushygiene des Institutes für Hygiene der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gilt mein großer Dank für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die stets freundliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern, meiner Familie und ganz besonders meiner Frau Anne Stotz danke ich von Herzen.