

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEUE BIOMARKER ZUR DIAGNOSESTELLUNG DER SPONTAN
BAKTERIELLEN PERITONITIS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sophia Helke Sabine
Rusch (geb. Scherm)

2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I

Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NEUE BIOMARKER ZUR DIAGNOSESTELLUNG DER SPONTAN
BAKTERIELLEN PERITONITIS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sophia Helke Sabine
Rusch (geb. Scherm)

2022

Dekan: Dipl.-Phys. Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling, MHBA

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Haimerl, MHBA

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2022

„Fortschritt gibt es nicht ohne Veränderung. Wer sein Denken nicht ändern kann,
kann gar nichts ändern.“

– *George Bernard Shaw* –

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	5
1.1 Leberzirrhose	5
1.2 Aszitesflüssigkeit	11
1.3 Spontan bakterielle Peritonitis	11
1.3.1 Pathogenese	12
1.3.2 Diagnostik	20
1.3.3 Therapie	23
1.3.4 Prophylaxe	23
1.4 Potenzielle Biomarker und diagnostische Alternativen	25
1.4.1 Esteraseaktivität von Leukozyten im Urin	25
1.4.2 Calprotectin	25
1.4.3 Lactoferrin	27
1.4.4 Komplementfaktor C3	28
1.4.5 Nachweis bakterieller DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
1.5 Zielsetzung	29
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Material	30
2.1.1 Geräte und Laborbedarf	30
2.1.3 Software	30
2.1.4 Puffer und Reagenzien	31
2.1.5 ELISA-Kits	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Probenaufbereitung	32
2.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
2.2.2.1 Calprotectin	33
2.2.2.2 S100a12	33
2.2.2.3 Lactoferrin	34
2.2.2.4 C3a	34
2.2.2.5 IP-10	35
2.2.2.6 IL-6	35
2.2.2.7 IL-8	36
2.2.2.8 IL-10	36
2.2.3 Bicinchoninsäure-Protein-Assay (BCA)	36

3	ERGEBNISSE	38
3.1	Kohortenbeschreibung	38
3.2	Inflammatorische Aktivität bereits vor definitionsgemäßer Grenze einer spontan bakteriellen Peritonitis nachweisbar – neue Frühmarker einer SBP	40
3.3	Interleukine und IP-10 eignen sich nicht als Biomarker im Krankheitsbild einer SBP	41
3.4	Komplementfaktor C3a zeigt eine tendenzielle Reduktion bei spontan bakterieller Peritonitis	45
3.5	Lactoferrin-Konzentration ist bei einer spontan bakteriellen Peritonitis erhöht	47
3.6	Erhöhung der Calprotectin-Konzentration bei spontan bakterieller Peritonitis und Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf	50
3.7	S100a12 als potenzieller Biomarker zur Diagnostik und Beurteilung des Krankheitsverlaufes bei spontan bakterieller Peritonitis.....	54
4	DISKUSSION	58
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
7	LITERATURVERZEICHNIS	65
8	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	
9	DANKSAGUNG	
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	

1 EINLEITUNG

1.1 Leberzirrhose

Die Leber hat eine zentrale Stellung in der Regulation der metabolischen Abläufe des Körpers. Somit ist es nicht überraschend, dass Lebererkrankungen weltweit rund zwei Millionen Todesfälle pro Jahr verursachen und eine Leberzirrhose global betrachtet insgesamt die elfthäufigste Todesursache darstellt (1). Zu den Aufgaben der Leber gehört die Verarbeitung von verschiedensten Nährstoffen wie beispielsweise Kohlenhydraten, Ketonkörpern, Lipiden sowie der Abbau und die Neusynthese von Aminosäuren. Weiterhin spielen multiple Metabolisierungsprozesse von körpereigenen Produkten eine zentrale Rolle. Des Weiteren gehören auch Produktionsabläufe, wie beispielsweise die Synthese von Gerinnungsfaktoren, zum Aufgabenfeld der Leber. Außerdem hat die Leber eine Speicherfunktion (Glykogen, Eisen etc.) inne (2). Folglich beeinflusst die Leber die verschiedensten Abläufe und Zustände im menschlichen Körper und spielt eine essenzielle Rolle für das menschliche Leben. Durch verschiedene Einflüsse, Noxen oder Erkrankungen kann die Leber Schaden nehmen und sich letztlich im Laufe der Zeit zu einer Leberzirrhose entwickeln (1,3,4). Hierbei ist das Parenchym durch einen fibrosierten und nodulären Umbau gekennzeichnet (4,5). Obwohl die Leber ein hohes Regenerationspotenzial aufweist, ist eine Leberzirrhose, im Gegensatz zu einer Fibrose, irreversibel (2,3).

Eine Leberzirrhose kann über verschiedene Scores klassifiziert und somit in ihrem Schweregrad sowie ihrer Prognose weiter eingeschätzt werden. Die Child-Pugh-Klassifikation beinhaltet ein Punktesystem von 5 bis 15 Punkten und teilt die Leberzirrhose in Stadien von A bis C ein. In den Child-Pugh-Score eingehende Werte sind das Vorhandensein von Aszitesflüssigkeit sowie einer Enzephalopathie, die International Normalized Ratio (INR), der Bilirubin-Wert und der Albumin-Wert (vgl. Abb. 1[2]) (6). Ein weiterer prognostischer Score ist der Model for End-stage Liver Disease(MELD)-Score, der vor allem in der Lebertransplantationsmedizin eine Rolle von enormer Wichtigkeit spielt. Der MELD-Score berechnet sich aus dem Bilirubin-Wert, dem INR-Wert und dem Kreatinin-Wert (vgl. Abb. 1[1]) (7).

1 EINLEITUNG

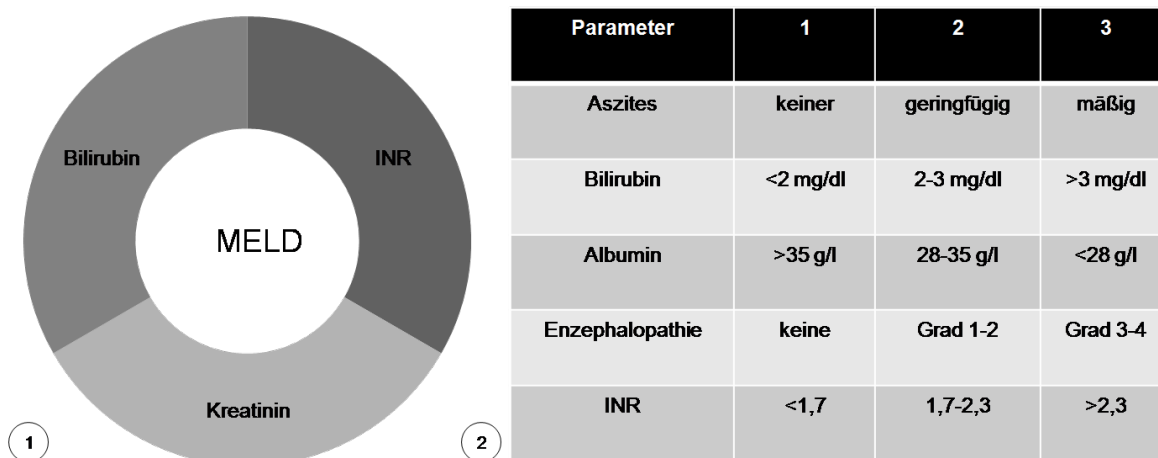


Abbildung 1: Klassifikation und prognostisches Scoring-System der Leberzirrhose. Der MELD-Score [1] berechnet sich aus einer Formel, in die Werte für INR, Bilirubin und Kreatinin eingehen. Es handelt sich um einen prognostischen Score für Lebererkrankungen, mit dessen Hilfe die Mortalität abgeschätzt werden kann. Dieses Scoring-System ist das zugrundeliegende System für die Listung und Zuteilung bei der Lebertransplantation. Die Punktwerte erstrecken sich innerhalb eines Ranges von 6 bis 40 Punkten, wobei höhere Punktzahlen mit einer erhöhten Mortalität verglichen mit niedrigeren Punktzahlen einhergehen. Der Child-Pugh-Score [2] klassifiziert den Schweregrad sowie den Kompensationsgrad der Leberzirrhose. Hierfür werden für die verschiedenen Parameter – Aszites, Bilirubin-Wert, Albumin-Wert, Grad der Enzephalopathie sowie INR-Wert – jeweils 1 bis 3 Punkte vergeben. Aus der Gesamtpunktzahl lassen sich die Child-Pugh-Stadien A (5–6 Punkte), B (7–9 Punkte) und C (10–15 Punkte) ableiten (8).

Die gesunde Leber zeichnet sich vor allem durch ihre hohe Regenerationsfähigkeit aus. Wirken allerdings fortwährend Noxen auf sie, so kommt es zu Umbauvorgängen, die bei bestehender Exposition gegenüber den Noxen letztlich in das Stadium einer Leberzirrhose münden. Die Genese einer Leberzirrhose kann sehr mannigfaltige Grundlagen haben, so führen beispielsweise Erreger einer viralen Hepatitis über eine Entzündung zu einer Zirrhose (vgl. Abb. 2) (3–5). Im Falle einer non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) kommt es zunächst zu einer Leberverfettung und somit zu einer Steatosis hepatis. Liegt die Steatosis hepatis über einen längeren Zeitraum vor, so kommt es aufgrund der chronischen Schädigung der hepatischen Zellen zu einer immunologischen Antwort und folglich zu Entzündungsprozessen (4). Die Konsequenz ist eine Steatohepatitis. Durch eine

1 EINLEITUNG

chronische Leberzellschädigung sowie eine chronische Inflammation kommt es zu einer vermehrten Aktivierung von Ito-Zellen und somit auch zu einer gesteigerten Bildung von extrazellulärer Matrix (vgl. Abb. 2) (4).

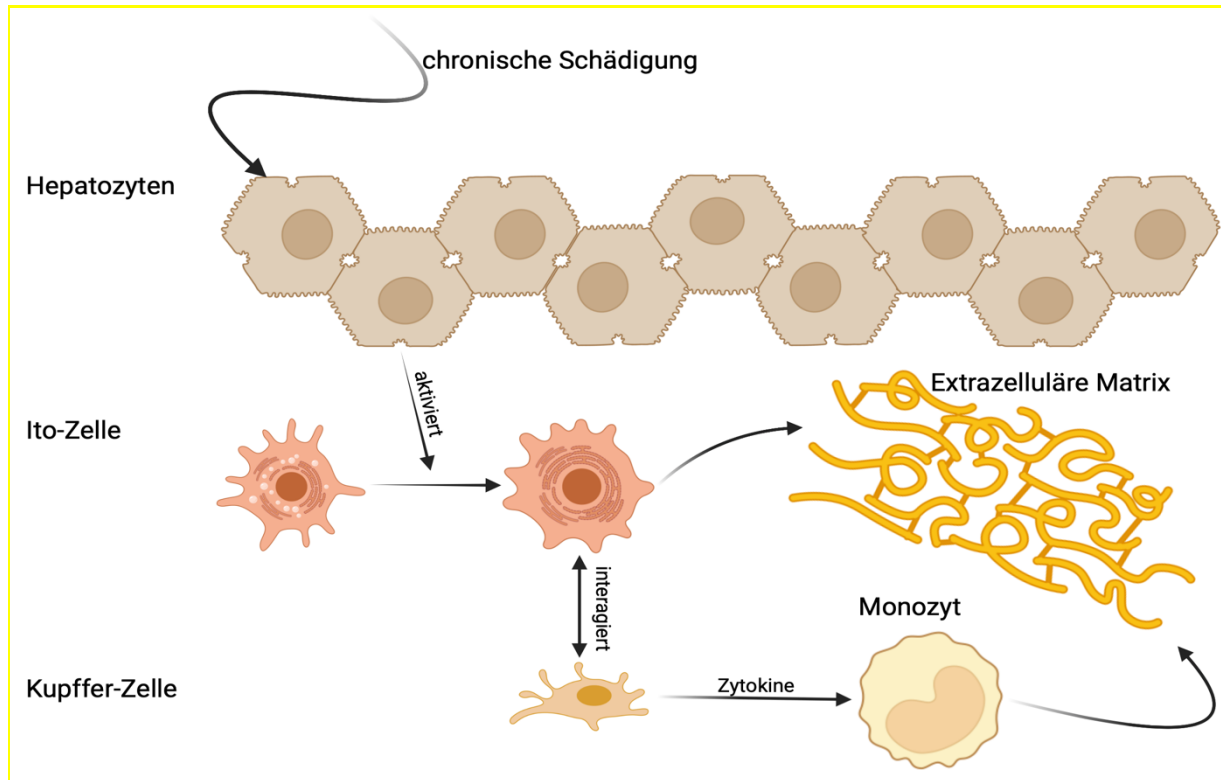


Abbildung 2: Entwicklung einer Leberfibrose. Schematisch dargestellt ist die Entwicklung einer Leberfibrose auf zellulärer Ebene. Durch chronische Schädigung der Hepatozyten sowie eine chronische Inflammation der Leber erfolgt eine gesteigerte Aktivierung von Ito-Zellen. Diese aktivierten Ito-Zellen produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix, was zum fibrotischen Umbau von Lebergewebe beiträgt. Außerdem interagieren aktivierte Ito-Zellen mit Kupffer-Zellen, welche die inflammatorischen Prozesse über die Aktivierung von Monozyten aufrechterhalten und somit indirekt ebenso zu einer gesteigerten Produktion von extrazellulärer Matrix beitragen (4).

Auf dieser Grundlage kann sich sowohl aus der Steatohepatitis als auch aus der Hepatitis im zeitlichen Verlauf eine Leberfibrose entwickeln (vgl. Abb. 3) (4,5,9). Eine Leberfibrose weist nunmehr eine weniger starke, aber immer noch vorhandene Regenerationskraft auf. Besteht die ausschlaggebende Noxe weiterhin, so entwickelt sich aus der Leberfibrose eine Leberzirrhose, die irreversibel ist und Grundlage für ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) sein kann (2).

1 EINLEITUNG

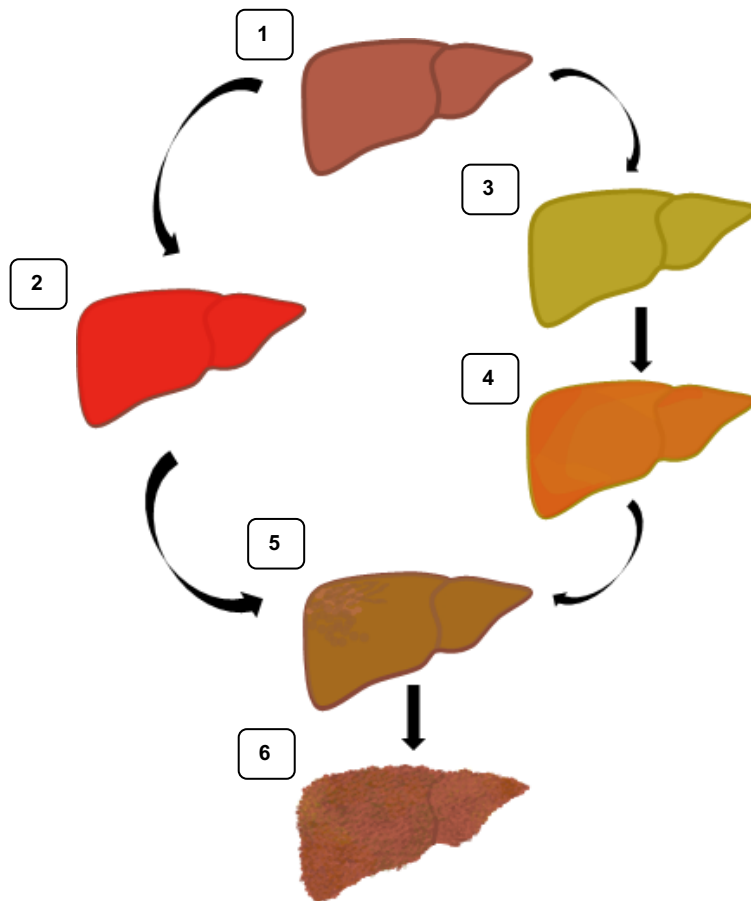


Abbildung 3: Entwicklung einer Leberzirrhose. Schematisch dargestellt ist die Entwicklung einer Leberzirrhose aus einer gesunden Leber. Die unterschiedlichen Genesen sind hier nicht ausführlich aufgeführt (vgl. Abb. 3): [1] Die physiologische, gesunde Leber wird beispielsweise durch virale Erreger in den Status der Entzündung übergehen, wodurch sich eine [2] Hepatitis ausbildet. Durch eine zunehmende Leberverfettung kann es zu einer [3] Steatosis hepatis kommen, auf deren Boden dann entzündliche Prozesse zu einer [4] Steatohepatitis führen. Die [5] Leberfibrose stellt einen gemeinsamen Pfad der beiden Wege dar. Sie wird durch – zu diesem Zeitpunkt teilweise noch reversible – Umbauprozesse der Leber gebildet. Bei fortlaufender Aussetzung gegenüber verschiedenen Noxen oder nicht

abwendbaren Krankheitsverläufen kann sich letztlich eine manifeste [6] Leberzirrhose ausbilden, die keine reversiblen Potenziale aufweist.

Ursächlich für eine Schädigung mit Entwicklung einer Zirrhose sind in den meisten Fällen Hepatitis-C-Viren, Alkoholabusus, eine nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) sowie die Kombination aus viralen Erregern und Alkoholabusus (10). Außerdem können chronische Hepatitis-B-Infektionen, biliäre Obstruktionen, primär biliärer Cholangitis (PBC) oder sekundär biliäre Zirrhose (SBC) sowie Hämochromatose zu einer Leberzirrhose führen (vgl. Abb. 4). Weniger häufig findet sich die zugrundeliegende Ursache in Autoimmunhepatitiden, lebertoxischen Medikamenten, genetisch-metabolischen Erkrankungen, Gallensäureerkrankungen, Kohlenhydratstoffwechselstörungen, Fettstoffwechselstörungen, Porphyrinen, Harnstoffzyklusdefekten, Morbus Wilson, anderen Infektionen, vaskulären Anomalitäten, venösen Verschlusskrankheiten oder idiopathischen Geschehen (2). Auffällig ist, dass eine äthyltoxisch bedingte Leberzirrhose, verglichen mit Schädigungen anderer Genesen, mit einer erhöhten Mortalität und einem höheren MELD-Score bei Listung zur Lebertransplantation einhergeht (10).

1 EINLEITUNG

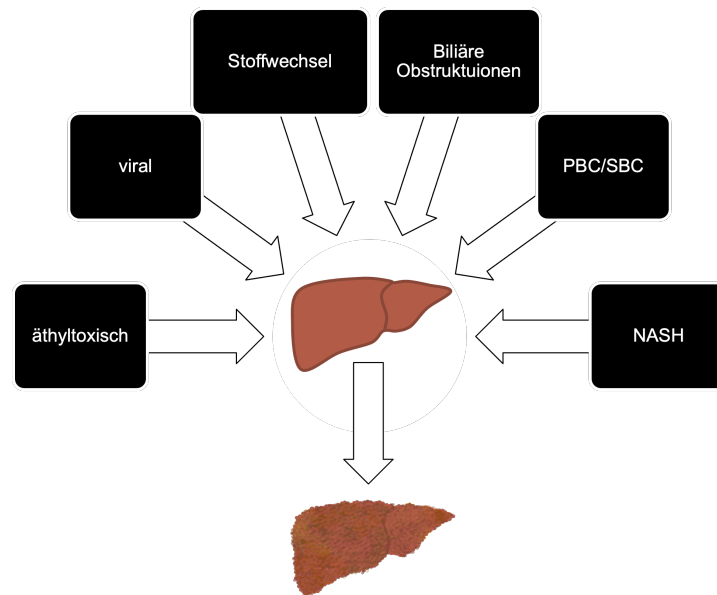


Abbildung 4: Potenzielle Noxen oder leberschädigende Erkrankungen. Noxen oder Erkrankungen, die häufig zur Ausbildung einer Leberzirrhose führen, sind Alkoholabusus, chronische Infektionen mit Hepatitis-B- oder -C-Viren oder die Ausbildung einer NASH durch eine nichtäthylisch bedingte Leberzellverfettung. Biliäre Obstruktionen, primär biliäre Cholangitis oder sekundär biliäre Zirrhose sowie Stoffwechselerkrankungen wie beispielsweise eine Hämochromatose stellen weitere potenzielle Ursachen für die Ausbildung einer Leberzirrhose dar. Weniger häufige Einflüsse, die einen schädigenden Effekt auf die Leber haben, sind Autoimmunhepatitiden, Medikamente, genetisch-metabolische Erkrankungen, Gallensäureerkrankungen, Kohlenhydratstoffwechselstörungen, Fettstoffwechselstörungen, Porphyrinen, Harnstoffzyklusdefekte, Morbus Wilson, Infektionen, vaskuläre Anomalitäten, venöse Verschlusskrankungen oder idiopathische Geschehen. (2)

Im klinischen Bild unterscheidet man zwischen einer kompensierten und einer dekompenzierten Leberzirrhose (vgl. Abb. 5) (11). Beide Ausprägungen können mit Ikterus, Pruritus, gastrointestinalen Blutungen, Koagulopathien, der Zunahme des abdominalen Umfangs und Veränderungen des mentalen Status einhergehen. Die kompensierte Form kann sich außerdem durch Anorexie, Gewichtsverlust, Ermüdung und Osteoporose äußern oder asymptomatisch sein (2). Eine Leberzirrhose-Erkrankung birgt einige Komplikationen, die unter anderem auch Charakteristika einer Dekompensation sind (11).

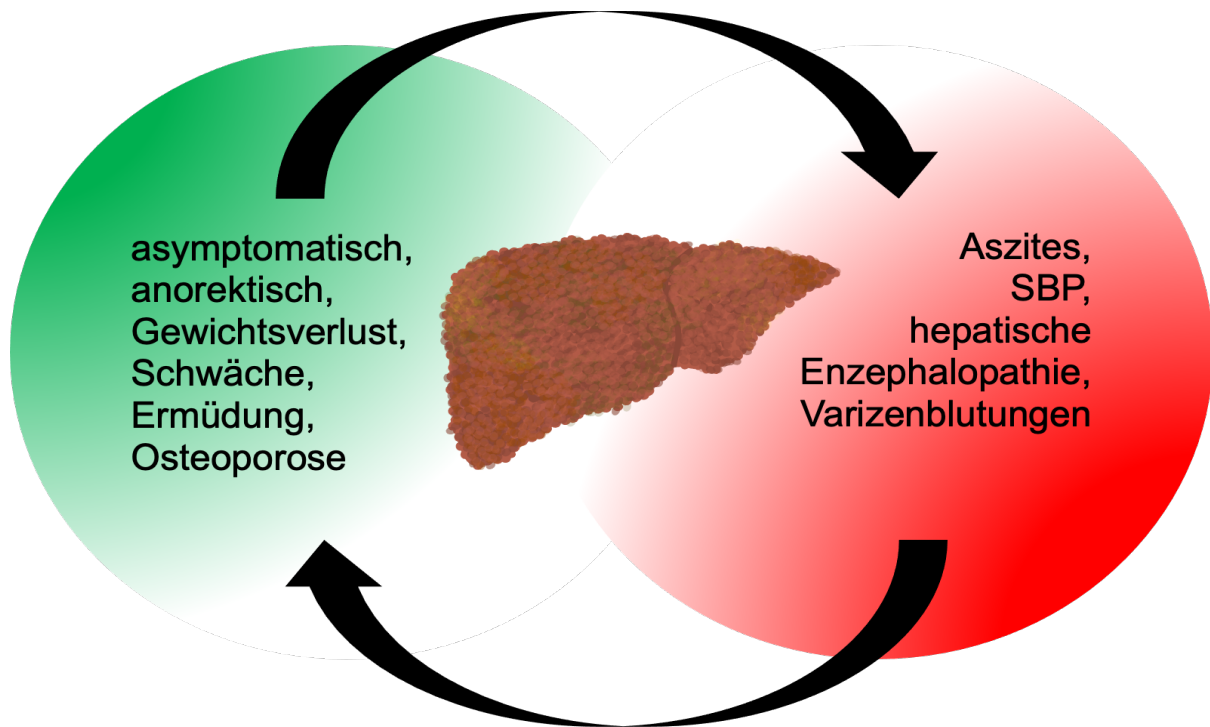


Abbildung 5: Symptome der kompensierten und dekompenzierten Form einer Leberzirrhose. In beiden Konstitutionen kann es zu Ikterus, Pruritus, gastrointestinalen Blutungen, Koagulopathien, der Zunahme des abdominellen Umfangs sowie zu Veränderungen des mentalen Status kommen. Der dekompenzierte Status, der in der Abbildung rechts (rot) dargestellt ist, wird vor allem durch sogenannte Komplikationen einer Leberzirrhose charakterisiert und stellt immer eine ernst zu nehmende Situation und eine Indikation zur Abklärung der Listung für eine Lebertransplantation dar (2).

Die schwerwiegendsten Komplikationen einer Leberzirrhose sind die Ausbildung von Aszitesflüssigkeit und die damit einhergehende hydropische Dekompensation, die spontan bakterielle Peritonitis (SBP), das hepatorenale Syndrom sowie das hepatopulmonale Syndrom, eine hepatische Enzephalopathie, Varizenblutungen, die Ausbildung eines HCC, die Ausbildung einer Pfortaderthrombose und die Entwicklung einer Kardiomyopathie (12–15). Das Risiko für eine Dekompensation kann durch Adipositas erhöht werden (16). Viele Komplikationen einer Leberzirrhose, wie beispielsweise die Bildung von Aszitesflüssigkeit und die daraus potenziell resultierende SBP, das hepatorenale und hepatopulmonale Syndrom, die Ausbildung einer hepatischen Enzephalopathie, die zirrhotische Kardiomyopathie oder Varizenblutungen, sind auf das Vorliegen einer portalen Hypertension zurückzuführen (17,18). Bei Patienten mit einer Leberzirrhose gilt es vor allem den Progress der Lebererkrankung zu stoppen oder das weitere Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen (19,20), indem eine progrediente Schädigung

1 EINLEITUNG

vermieden, potenzielle Komplikationen therapiert sowie die medikamentöse Therapie individuell angepasst wird (21,22). Weiterhin stehen die Therapie von Symptomen und die engmaschige Kontrolle der Laborchemie sowie die Therapie etwaiger Auffälligkeiten (22–28) im Fokus der medizinischen Betreuung.

1.2 Aszitesflüssigkeit

Die Bildung von Aszitesflüssigkeit stellt, wie bereits oben erwähnt, eine häufige Komplikation im Krankheitsbild einer Leberzirrhose dar. Insgesamt sind rund 75 % des Auftretens von Aszitesflüssigkeit ursächlich auf eine Lebererkrankung zurückzuführen (22,29). Eine Punktion und ggf. eine Parazentese der Aszitesflüssigkeit sind bei jeder neu aufgetretenen Aszitesflüssigkeit sowie beim Vorliegen einer Leberzirrhose mit weiteren Komplikationen und bei ungeplanter stationärer Aufnahme indiziert (22). Die Parazentese stellt insgesamt einen Routineeingriff dar, der nichtsdestoweniger einige potenzielle Komplikationen mit sich bringt. Diese reichen von der Ausbildung von Fisteln (ca. 5 %) (22,30) und Infektionen aufgrund von Perforationen (0,4 %) (22,31) bis hin zu Blutungen (0,19–1 %) (22,31,32). Hierbei zeigt sich das Blutungsrisiko bei steigendem Kreatinin erhöht (22). Neu aufgetretene oder progrediente Aszitesflüssigkeit sind mit dem Fortschreiten der zugrundeliegenden Leberzirrhose sowie weiteren Komplikationen und insgesamt mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet, sodass eine Therapie erfolgen sollte. Diese kann nichtmedikamentös, medikamentös und ggf. auch invasiv durch eine Parazentese, eine Anlage eines transjugulären intrahepatischen portosystemischen Shunts und als Ultima Ratio auch mithilfe einer Lebertransplantation erfolgen (22).

1.3 Spontan bakterielle Peritonitis

Die SBP ist definiert als Infektion der Aszitesflüssigkeit ohne sonstigen intraabdominellen Fokus. Sie stellt die häufigste spontane bakterielle Infektion bei Patienten mit einer Leberzirrhose dar (22). Patienten aus dem ambulanten Sektor weisen eine Prävalenz der SBP von 3,5 % auf (22,33), wohingegen hospitalisierte Patienten eine Prävalenz von 8–36 % vorweisen (22,34,35). Auch das Erregerspektrum unterscheidet sich bei ambulanten oder hospitalisierten Patienten. Ambulante Infektionen sind meist mit gramnegativen Erregern verbunden, während nosokomiale Ereignisse häufig grampositive Pathogene zeigen (22,36). Im Allgemeinen lässt sich jedoch festhalten, dass gramnegative Bakterien am häufigsten

1 EINLEITUNG

eine Translokation in die mesenterialen Lymphknoten (MLNs) verzeichnen (37) und *E. coli* als häufigster Erreger für eine SBP verantwortlich gemacht wird (38). Die 1-Jahres-Mortalität nach durchlaufener SBP wird mit 31–93 % beschrieben (22,33,39–42).

1.3.1 Pathogenese

Obwohl die Pathogenese der SBP nicht abschließend geklärt ist, sind einige Risikofaktoren für die Entwicklung einer SBP bekannt. Hierzu gehören eine SBP in der Vorgeschichte (22,39,43), ein niedriger Proteingehalt im Aszites ($< 1,5$ bzw. $1,0$ g/dl) (22,44–46,46,47), gastrointestinale Blutungen (22,48,49), eine Erhöhung des Bilirubin-Werts sowie das Vorliegen einer Thrombopenie (22,45), der Einsatz von Protonenpumpen-Inhibitoren (22,50), ein steigender MELD-Score (22,51) sowie das Vorliegen einer Mutation im NOD2-Gen (22,52) oder Polymorphismen in der Promotor- und Intronregion des Toll-like-Rezeptors 2 (53). Die Mutation im NOD2-Gen induziert eine vermehrte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, wodurch eine bakterielle Translokation, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird, begünstigt wird, und ist auch bei Krankheitsbildern wie beispielsweise Morbus Crohn bekannt (38). Der Toll-like-Rezeptor 2 wird auf der Zelloberfläche von Makrophagen oder anderen immunkompetenten Zellen exprimiert (38). Er konnte als wichtiger Mediator für die pathologische bakterielle Translokation im Mausmodell ausgemacht werden (54). Besonders der Genotyp Toll-like-Rezeptor 2-16934TT ist mit dem gehäuftten Auftreten einer SBP vergesellschaftet (53). Ebenso ist ein Polymorphismus im Gen des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1, der über vermehrte Chemotaxis zu einer gesteigerten Tumornekrosefaktor-Sekretion führt, häufig mit einer SBP verbunden (55).

Bei der Pathogenese einer SBP spielen mehrere Faktoren zusammen. Um deren Abläufe und Mechanismen verstehen zu können, muss man sich zunächst die Unterschiede in den verschiedenen Systemen – insbesondere hinsichtlich des Immunsystems und des Mikrobioms – beim Gesunden einerseits und bei einem Patienten mit einer Leberzirrhose andererseits bewusst machen. So finden sich unter anderem Abweichungen im Bereich des Immunsystems, auf die im Folgenden im Detail eingegangen wird, aber interessanterweise auch im intestinalen Mikrobiom (38). Das Mikrobiom von Patienten mit Leberzirrhose zeichnet sich durch einen Abbau von *Lachnospiraceae*, vor allem *Clostridien*, sowie *Bacteroidaceae* aus. Dem

1 EINLEITUNG

gegenüber steht eine Zunahme an *Proteobakterien*, insbesondere *Enterobacteriaceae* (56). Ein weiterer Begriff, der das Mikrobiom von Patienten mit Leberzirrhose prägt, ist small intestinal bacterial overgrowth (SIBO). Diese ist definiert als mehr als 10^5 koloniebildende Einheiten/ml und/oder die Präsenz von Kolonbakterien im oberen jejunalen Aspirat (57). Die Koexistenz von Zirrhose und SIBO wird zwischen 48 % und 73 % angegeben. Ein SIBO ist häufig mit schwereren Lebererkrankungen und bereits stattgehabten SBPs sowie hepatischen Enzephalopathien vergesellschaftet (58–61). Obwohl sie als alleinige Ursache für eine SBP nicht ausreichend ist, kann eine SBP durch das Vorliegen einer SIBO begünstigt werden (38).

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese einer SBP spielt die bakterielle Translokation aus dem Darmlumen. Der Darm stellt die größte Oberfläche des menschlichen Körpers dar und beherbergt mehr mikrobielle Zellen als eukaryotische Zellen. Aus diesem Grund ist der Darm geprägt von der Koexistenz zwischen Mikroorganismen auf der einen und dem Menschen auf der anderen Seite (38). Die bakterielle Translokation ist definiert als Translokation von Bakterien und/oder ihrer Bestandteile aus dem Darm in die MLNs (62) (vgl. Abb. 6). Physiologischerweise ist sie auch im gesunden Organismus vertreten und von Wichtigkeit für die Ausbildung und den Erhalt der Immunität des Individuums. Bei Leberzirrhotikern wird der physiologische Rahmen der Translokation allerdings überschritten und es kommt vermehrt zu einer pathologischen bakteriellen Translokation (38). Der Zusammenhang zwischen bakterieller Translokation und der Entstehung einer SBP wird durch ein Modell mit leberzirrhotischen Ratten verdeutlicht. Bei diesen wurde oral GFP-*E. coli* appliziert und im Verlauf konnte GFP-*E. coli* nicht nur im intestinalen Lumen, sondern auch in den MLNs und in der Aszitesflüssigkeit nachgewiesen werden (63).

1 EINLEITUNG

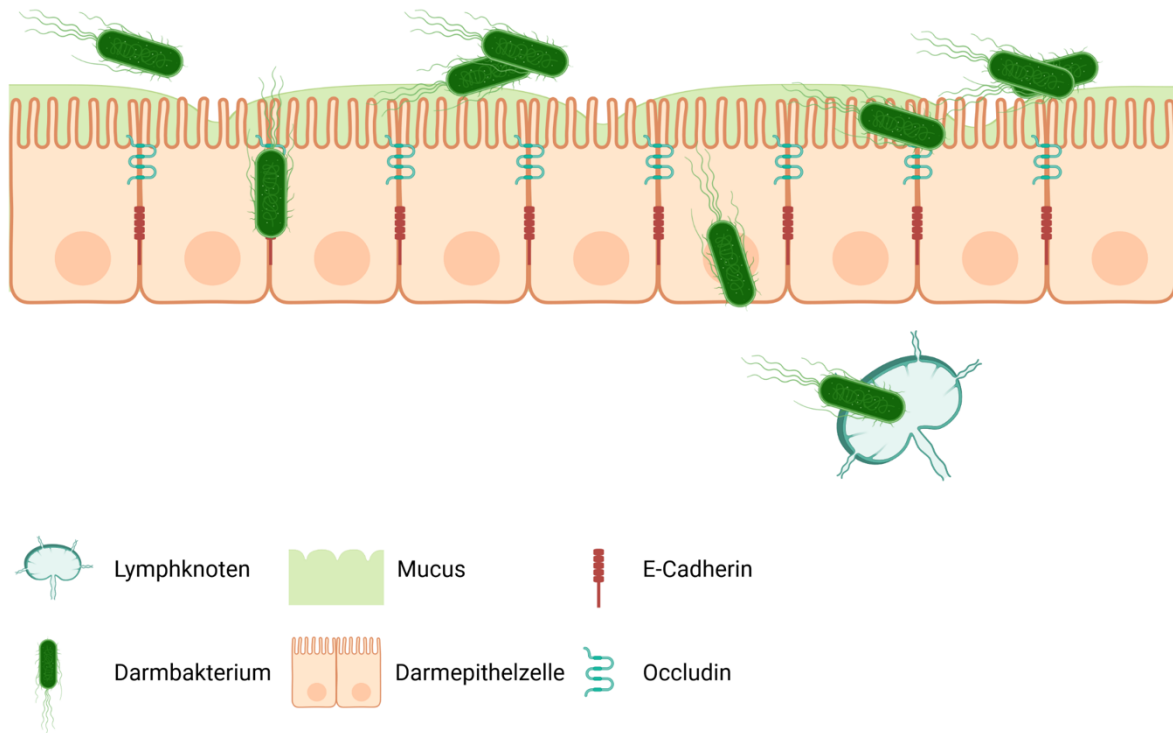


Abbildung 6: Bakterielle Translokation. Dargestellt ist die bakterielle Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen durch die epitheliale Barriere in die mesenterischen Lymphknoten. Zu sehen sind Darmepithelzellen, die durch Tight Junctions verbunden sind und mit diesen einen Barrierekomplex bilden. Dem Epithel ist apikal eine Mucinschicht aufgelagert, die als immunologische wie auch mechanische Abgrenzung zum Darmlumen hin fungiert. Im Darmlumen befinden sich verschiedene Darmbakterien, die sich physiologischerweise im humanen intestinalen Mikrobiom aufhalten, im Rahmen einer Leberzirrhose allerdings zum einen vermehrt und zum anderen auch in veränderter Zusammensetzung vorliegen können. Im Rahmen der bakteriellen Translokation durchbrechen diese Darmbakterien die intestinale Barriere. Dies kann entweder interzellulär, durch permeable Tight Junctions, oder aber auch auf transzellulärem Wege geschehen. Wie bereits in verschiedenen Studien belegt, ist die Darmbarriere im Falle einer Leberzirrhose permeabler als in gesunden Modellen. So zeigen auch die Tight Junctions eine erhöhte Permeabilität. Diese Voraussetzungen begünstigen eine übermäßige, pathologische Translokation. Nachdem die Bakterien die intestinale Barriere überwunden haben, wandern sie in die MLNs, die eine zentrale immunologische Station im mesenterischen Bereich darstellen. Von dort können die Darmbakterien in die Aszitesflüssigkeit gelangen und somit zu Pathogenen werden, die eine spontan bakterielle Peritonitis auslösen. (38) (Erstellt mit BioRender.com)

Die Pathomechanismen der bakteriellen Translokation im Rahmen von verschiedensten Krankheitsbildern wurden in den vergangenen Jahren weltweit untersucht. Insbesondere im Zusammenhang mit Leberzirrhosepatienten konnte gezeigt werden, dass die Darmbarriere bei Leberzirrhosepatienten, verglichen mit

1 EINLEITUNG

Menschen ohne Leberzirrhose, geschwächt ist. So konnte von unserer Arbeitsgruppe anhand von Kolonbiopsien von Patienten mit Leberzirrhose nachgewiesen werden, dass die dem Darmepithel aufliegende Mucinschicht, welche sowohl mechanisch als auch immunologisch einen Teil der Darmbarriere darstellt, signifikant verringert ist (15). Weiterhin konnten wir auch eine Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte im Darmepithel bei SBP-Patienten nachweisen. Auch die molekularen Mechanismen dieser Entdeckungen wurden im Rahmen eines In-vitro-Modells mit Kolonzellen und Bakterien weiter untersucht. Hierbei konnten wir eine zeit- und dosisabhängige Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte über eine Herabregulation von Occludin und E-Cadherin zeigen. Für die Reduktion der Occludin-Level konnte ein bakterieninduzierter gesteigerter proteasomaler Abbau und für die Reduktion der E-Cadherin-Menge eine neu entdeckte bakterielle Protease Aktivität verantwortlich gemacht werden (vgl. Abb. 7) (15).

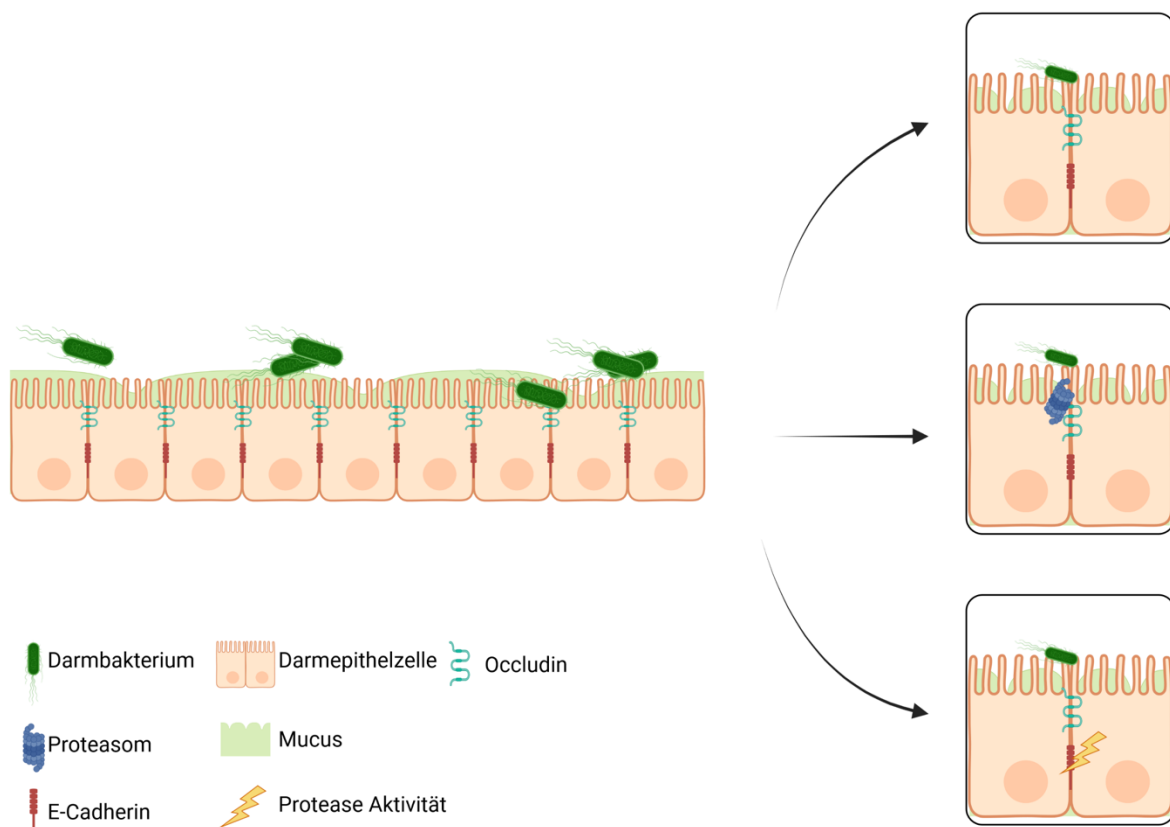


Abbildung 7: Pathogenese der bakteriellen Translokation. Dargestellt ist die Pathogenese der bakteriellen Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen durch die epitheliale Barriere. Zu sehen sind Darmepithelzellen, die durch Tight Junctions verbunden sind. Dem Epithel ist apikal eine Mucinschicht aufgelagert. Durch Einwirkung der Bakterien verringert sich die Dicke der aufgelagerten Mucinschicht. Außerdem wird die intestinale Barriere durch einen gesteigerten proteasomalen Abbau

1 EINLEITUNG

von Occludin sowie einen Abbau von E-Cadherin durch eine bakterielle Protease destabilisiert. (Modifiziert nach Haderer et al.) (15) (Erstellt mit BioRender.com)

Im gesunden Organismus wird eine übermäßige bakterielle Translokation durch die Immunantwort verhindert. Bei Kontakt mit Bakterien schütten die intestinalen Zellen Chemokine sowie Zytokine aus, wodurch dendritische Zellen in die Mukosa rekrutiert werden. Diese induzieren wiederum B- und T-Zellen (38). Die angeborene und die adaptive Immunantwort greifen ineinander und wirken der übermäßigen bakteriellen Translokation entgegen. Das angeborene Immunsystem stellt hierbei die erste Abwehrreihe dar. Microbe-associated molecular patterns auf den Bakterien werden durch Pattern-Recognition-Rezeptoren auf intestinalen Zellen erkannt (64). Die Pattern-Recognition-Rezeptoren, die sich auf dem intestinalen Epithel finden, können in Toll-like-Rezeptoren und zytoplasmatische Nod-like-Rezeptoren unterteilt werden (38). Eine weitere immunologische Instanz wird durch die dendritischen Zellen dargestellt. Diese sind unterhalb des Darmepithels beherbergt und öffnen Tight Junctions zwischen den Epithelzellen, um direkt mit den Mikroorganismen in Kontakt treten zu können (65). Die dendritischen Zellen können in zwei Subtypen unterschieden werden: die CD103+CX3CR1- und die CD103-CX3CR1+ dendritischen Zellen. Erstere induzieren regulatorische T-Zellen, während Letztere die Tumornekrosefaktor-Produktion anstoßen und T-Helfer-Zellen induzieren. Außerdem sind auch M-Zellen und Peyer-Plaques wichtige Bestandteile der intestinalen Immunität (38). Auffällig ist, dass bei Patienten mit einer Leberzirrhose immer mehr Abweichungen von der Norm im Hinblick auf die Immunantwort bekannt werden. So weisen Patienten mit einer Leberzirrhose eine höhere Toleranz auf, dass Bakterien das Darmepithel erreichen, als gesunde Menschen (38). In einem Rattenmodell wurde durch Tetrachlormethan eine Leberzirrhose bei den behandelten Ratten induziert. Bei dann vorliegendem Aszites und bakterieller Translokation konnte eine verringerte Aktivität der dendritischen Zellen hinsichtlich Phagozytose, Migration und inflammatorischer Aktivität verglichen mit Ratten ohne bakterielle Translokation beobachtet werden. (66). Eine weitere Rolle spielen die bereits erwähnten B-Zellen. In Mäusen mit Defiziten im Toll-like-Rezeptor-Adaptermolekül MYD88 in B-Zellen kommt es zu einer insuffizienten Abtötung der Bakterien und somit zu günstigen Voraussetzungen für ein Fortschreiten der bakteriellen Translokation (67). Des Weiteren spielen CX3CR1-Makrophagen eine wichtige Rolle für die intestinale Barriere (68). Mit Toll-like-Rezeptoren können sie Mikroorganismen

1 EINLEITUNG

detektieren und induzieren lymphoide Zellen zur Interleukinsekretion, was wiederum die intestinale Integrität sowie Reparaturmechanismen fördert (69). Im Falle einer Extinktion der CX3CR1-Makrophagen kommt es zu einer vermehrten bakteriellen Translokation sowie interessanterweise zu einer Steatohepatitis im Modell mit Fettlebererkrankungen. Dies resultiert in einer gestörten Darmintegrität und führt somit zu einer hepatischen Inflammation, welche als „Treiber“ einer Leberschädigung fungieren kann (68,70). Folglich können sowohl ein Immundefizit wie auch eine überschießende Immunantwort die bakterielle Translokation begünstigen. Außerdem können in Patienten mit einer Leberzirrhose weniger B-Gedächtnis-Zellen sowie eine Verringerung der Antwort in Konsequenz auf eine Toll-like-Rezeptor-9-Stimulation nachgewiesen werden (71). Auch die Rolle der T-Zellen in der Immunabwehr ist von enormer Wichtigkeit. Beim Fehlen dieser Zellen kann eine ausgeprägte bakterielle Translokation, insbesondere von *E. coli*, im Mausmodell mit athymischen Mäusen beobachtet werden (72). Die bereits erwähnten MLNs bilden ebenfalls eine wichtige Station der Immunantwort. Dendritische Zellen transportieren Bakterienbestandteile zu den MLNs. Die Lymphknoten stellen hiermit die erste zentrale Station der folgenden Immunantwort dar. Demgegenüber können in den MLNs von Patienten mit einer Leberzirrhose lebende Bakterien nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür findet sich in verschiedenen Defiziten in der angeborenen und der adaptiven Immunantwort, wie beispielsweise einer Verminderung von Chemotaxis, Opsonisierung, Phagozytose und der Abtötungskapazität von mononukleären Zellen (73–76).

Ein weiterer Bestandteil der immunologischen Abwehr wird durch die sekretorische Komponente dargestellt. Im Intestinaltrakt konnten aus der Gruppe der Defensine nur α - und β -Defensine nachgewiesen werden. Die α -Defensine stammen aus neutrophilen Granulozyten sowie aus Paneth-Zellen, die am Kryptengrund beherbergt sind. β -Defensine werden aus den Epithelzellen sezerniert (38). Im Modell mit CCl₄-induzierten zirrhotischen Ratten ist eine Verminderung des Defensins aus Paneth-Zellen, bei gleichbleibendem oder erhöhtem β -Defensin, auffällig (63). Auch in der Gruppe der Lektine konnte – sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen – im Falle einer äthyltoxischen Zirrhose eine Herunterregulation von RegII β sowie RegIII γ festgestellt werden (77). Zwischen Lumen und Darmepithel befindet sich eine Mucus-Schicht, die einen direkten Kontakt zwischen Epithel und Bakterien verhindert. Die oben beschriebene SIBO hat

1 EINLEITUNG

allerdings einen trophischen Effekt auf den Mucus (15,78). Die Bakterien können folglich die Mikrovilli erreichen. Aber auch das infolge der Inflammation ausgeschüttete Zytokin Tumornekrosefaktor hat einen Einfluss auf die Beschaffenheit der Darmbarriere. Der Tumornekrosefaktor verringert die Expression von Tight-Junction-Proteinen und nimmt Einfluss auf die Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase und steigert somit die Permeabilität der Tight Junctions im Darmepithel (79), was wiederum eine bakterielle Translokation begünstigt. Ebenso haben Interleukin-6 und Interferon- γ einen Einfluss auf die Darmbarriere (38). Sie steigern die epitheliale Permeabilität und induzieren die transzelluläre Translokation von *E. coli*, wobei Interleukin-6 hierbei die Claudin-2-Expression reguliert und Interferon-gamma eine transzelluläre Translokation der Bakterien über lipid rafts begünstigt (80,81). Auch reaktive Sauerstoff-Spezies und Stickstoffmonoxid könnten als Einflussgrößen auf eine bakterielle Translokation ausgemacht werden. Reaktive Sauerstoff-Spezies modulieren die Immunantwort auf bakterielle Stimuli (82) und Stickstoffmonoxid moduliert die Makrophagenfunktion, die Zytokinausschüttung und auch die Tötungskapazität der Immunzellen gegenüber Bakterien (83,84). Außerdem wirkt übermäßiges Stickstoffmonoxid schädlich auf die intestinale Integrität, indem Tight Junctions reversibel geöffnet werden und die Funktionsfähigkeit von Kolonepithelzellen über die Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase in Ratten abnimmt und somit die Permeabilität der intestinalen Barriere gesteigert wird.

Neben der zellulären und sekretorischen Immunität spielen auch mechanische Komponenten eine Rolle in der Immunantwort (38). Ist die intestinale Barriere dysfunktional, so kann es vermehrt zu einer bakteriellen Translokation kommen. Besonders in Patienten mit einer Leberzirrhose ist eine Vielzahl von Barrieredefiziten auffällig. So können breitere interzelluläre Räume, vaskuläre Stauungen, Ödeme, fibromuskuläre Proliferation, eine Verminderung der Zotten-Krypten-Ratio sowie eine gesteigerte Permeabilität und eine Verdickung der Muscularis mucosae nachgewiesen werden (38,85–87). Die Tight Junctions des Darmepithels sind ein wichtiger Bestandteil der Barrierefunktion des intestinalen Systems. Sie werden durch die Myosin-Leichtketten-Kinase gesteuert (38). In Duodenalbiopsien von Patienten mit einer Leberzirrhose konnten Abweichungen der Tight Junctions von der Norm festgestellt werden, beispielsweise durch eine verminderte Repräsentation von Claudin-1, E-Cadherin und Occludin (15,88). Ebenso wurde bereits gezeigt, dass die Darmbakterien direkten Einfluss auf die Tight Junctions nehmen können (15). Dies

1 EINLEITUNG

führt zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität. Doch auch die transzelluläre bakterielle Translokation spielt eine Rolle. So kann eine transzelluläre Translokation von *E. coli* durch Caco-2-Zellen bereits ohne veränderte Permeabilitätsgegebenheiten beobachtet werden (89). Insbesondere Epithelzellen unter Stress weisen eine verminderte transepitheliale Resistenz auf und sind aus diesem Grund eine Ausgangssituation für eine bakterielle Translokation (90).

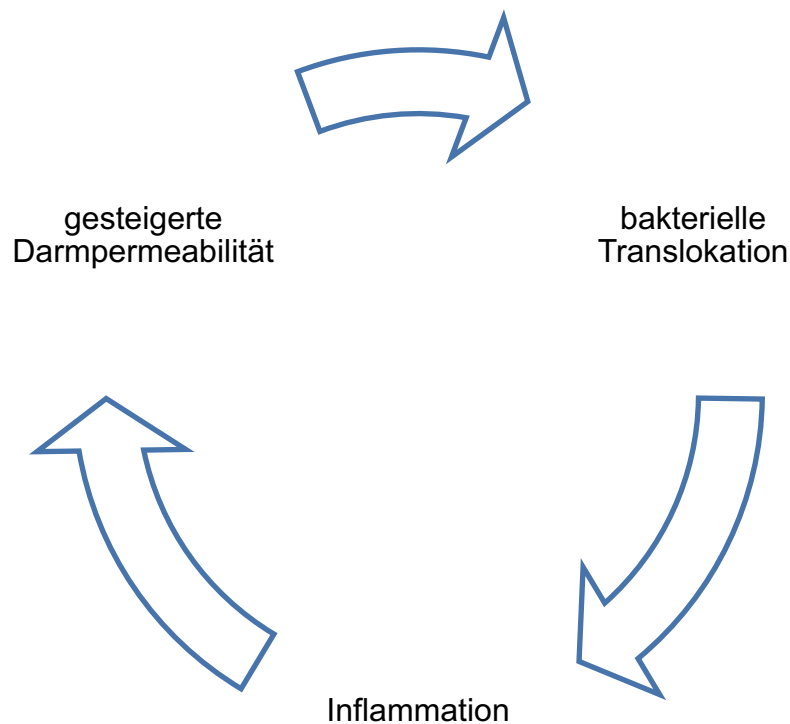


Abbildung 8: Circulus vitiosus der bakteriellen Translokation. Schematisch dargestellt ist eine stark vereinfachte Übersicht über die sich gegenseitig begünstigenden Gegebenheiten im Rahmen der bakteriellen Translokation. Die gesteigerte Darmpermeabilität ist durch die bereits beschriebenen Veränderungen innerhalb der Zell-Zell-Kontakte, aber auch durch das veränderte Mikrobiom, die mechanischen Veränderungen der Darmbarriere und die verringerte Mucus-Schicht bei Patienten mit Leberzirrhose bedingt. Hierdurch erfolgt eine vermehrte bakterielle Translokation, die eine Aktivierung des Immunsystems, welches bei Patienten mit Leberzirrhose ebenfalls verändert ist, nach sich zieht. Daraus resultieren inflammatorische Prozesse, die ihrerseits eine gesteigerte Darmpermeabilität begünstigen (38).

Die Pathogenese der bakteriellen Translokation stellt in gewisser Weise einen Circulus vitiosus dar (vgl. Abb. 8): Durch die bakterielle Translokation werden dendritische Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten rekrutiert. Es kommt zu

1 EINLEITUNG

einer inflammatorischen Reaktion, die sowohl submucosale als auch mesenteriale entzündliche Prozesse hervorruft (86,91,92). Die Inflammation begünstigt ihrerseits wieder die gesteigerte Permeabilität der Darmbarriere, die bei Patienten mit Leberzirrhose, aufgrund von Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte sowie der Zusammensetzung des Mikrobioms, einer verringerten Mucus-Schicht sowie intestinaler Ödemneigungen und einer damit einhergehender mechanischer Begünstigung der Permeabilität der Barriere, ohnehin nachweislich gesteigert ist. Durch die erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen Barriere ist der Grundstock für eine gesteigerte bakterielle Translokation gelegt. Interessanterweise konnten infolge der Entzündung im Rahmen einer bakteriellen Translokation auch erhöhte fäkale polymorphnukleäre Elastase sowie Calprotectin gemessen werden (93,94).

Bei der Pathogenese der SBP sei auch explizit auf die Zusammenhänge und Gemeinsamkeiten zwischen Leber bzw. biliärem Epithel und Darm bzw. intestinalem Epithel hingewiesen. Beide Epithelien sind zur Expression von Tight-Junction-Proteinen, wie beispielsweise E-Cadherin, fähig, tragen Pattern-Recognition-Rezeptoren und können Immunglobulin A sezernieren (68). Wie oben bereits erwähnt, begünstigt eine intestinale Inflammation – wie auch Permeabilitätssteigerungen anderer Genese – eine bakterielle Translokation, jedoch kann man in solch einem Fall auch im gesunden Organismus lebende enterale Bakterien in der Leber finden. Hier bilden die Kupffer-Zellen die zweite Abwehrkette (95). Wenn nun aber auch die Leber einen Schaden aufweist, wie es bei der Leberzirrhose der Fall ist, dann ist folglich auch die zweite Abwehrkette dysfunktional. Bakterien gelangen in die Blutzirkulation und verweilen dort (68).

Zusammenfassend lässt sich also Folgendes festhalten: Die durch eine Leberzirrhose mögliche portale Hypertension induziert Ödeme, unter anderem auch im intestinalen Bereich, und steigert somit wiederum die Permeabilität der Darmbarriere. Zusammen mit der teilweise gestörten Immunantwort führt dies zur vermehrten bakteriellen Translokation aus dem Darmlumen über MLNs in die Blutzirkulation und die Aszitesflüssigkeit. Hieraus folgen Bakteriämie und möglicherweise auch eine SBP (38,68).

1.3.2 Diagnostik

Die zeitnahe antibiotische Therapie und damit auch die frühestmögliche Diagnosestellung sind bei einer SBP von enormer Wichtigkeit. Da mehr als 40 % der

1 EINLEITUNG

mikrobiologischen Aszitesuntersuchungen beim formalen Vorliegen einer SBP kulturnegativ bleiben (22,96,97), wird die Diagnostik der SBP nicht via kulturellen Nachweis, sondern über die Anzahl der polymorphnukleären Zellen (PMNs) definiert. Per Definition spricht man von einer SBP bei einem Nachweis von mehr als 250 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit. Ein Bakteraszites besteht per Definition bei einem mikrobiologischen Erregernachweis und einer PMN-Zahl von weniger als 250 pro mm^3 . Beide Krankheitsbilder sind eine Indikation zur Einleitung einer antibiotischen Therapie. Den Goldstandard bei der Diagnostik von Aszitesflüssigkeit stellt folglich die Zelldifferenzierung dar. Hierbei ist die maschinelle Auswertung der manuellen nicht unterlegen (22). Des Weiteren sollte direkt am Patientenbett eine Beimpfung von Blutkulturen mit mindestens 10 ml Aszitesflüssigkeit pro Flasche erfolgen (22,97,98). Eine Gramfärbung sollte nicht standardmäßig erfolgen, da die Erregerkonzentration in der Aszitesflüssigkeit zu gering ist (22). Bei der diagnostischen Untersuchung der Aszitesflüssigkeit ist vor allem auf die differenzialdiagnostische Beurteilung von infiziertem Aszites oder malignem Aszites zu achten (22). Eine schematische Darstellung der diagnostischen Arbeitsabläufe bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszitesflüssigkeit in Anlehnung an die Leitlinie „Komplikationen der Leberzirrhose“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten ist in Abbildung 9 dargestellt.

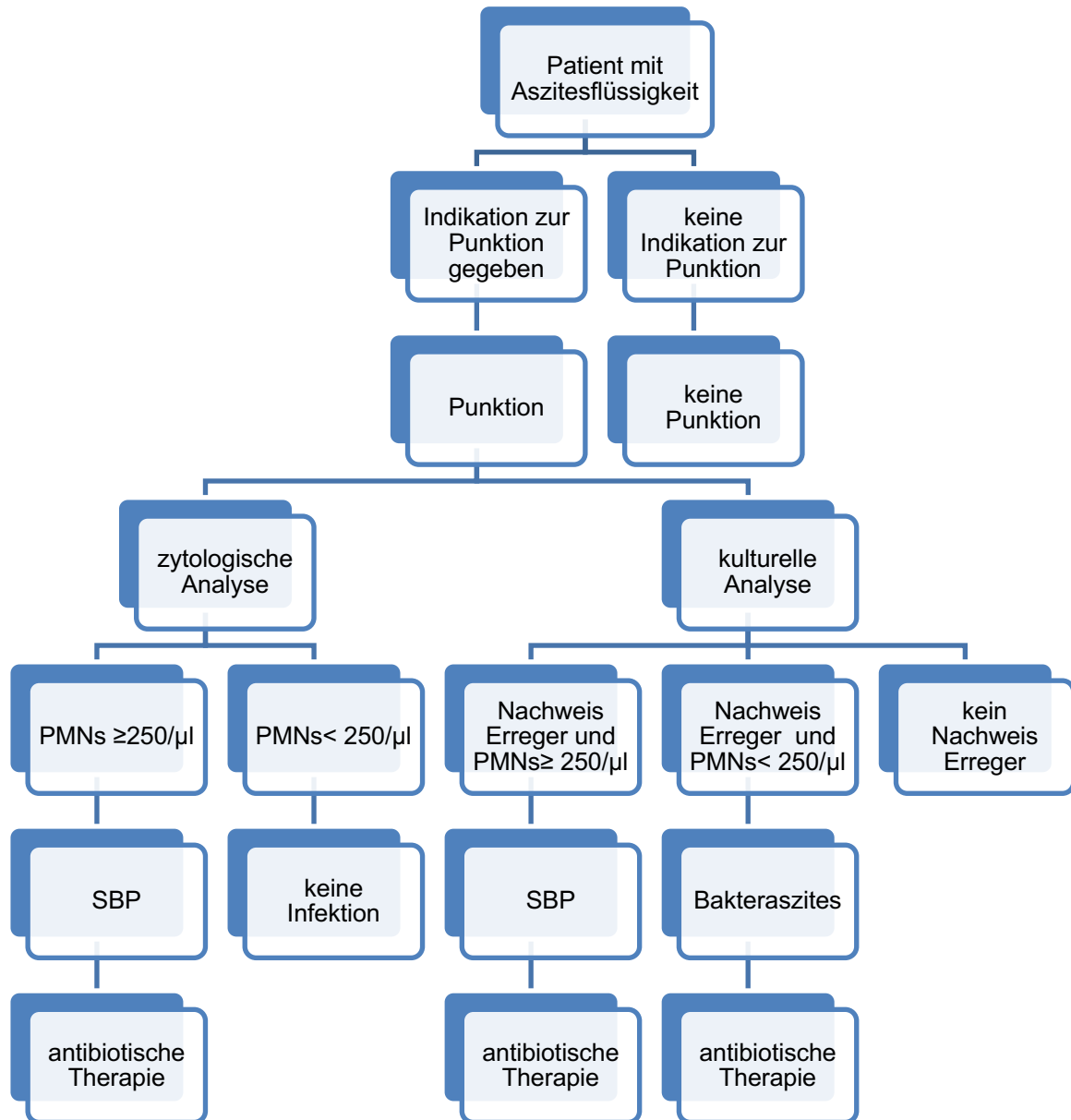


Abbildung 9: Diagnostische Abläufe bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszitesflüssigkeit nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen. Dargestellt sind hier die Arbeitsschritte von der Feststellung von Aszitesflüssigkeit über die Indikationsstellung zur Punktion und die resultierenden zytologischen und kulturellen Analyseverfahren bis hin zur Indikationsstellung einer antibiotischen Therapie. Nach der Punktion der Aszitesflüssigkeit sollten sowohl zytologische Untersuchungen als auch eine kulturelle Bebrütung erfolgen und die Ergebnisse der beiden Untersuchungen in Abhängigkeit voneinander interpretiert werden. Eine Therapieindikation mittels antibiotischer Therapie besteht bei Nachweis einer PMN-Zahl von mindestens 250 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit, unabhängig von dem Ergebnis der kulturellen Bebrütung. Bei einem Erregernachweis und einer Zellzahl von weniger als 250 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit ist die Indikation zur antibiotischen Therapie ebenfalls gegeben (22).

1.3.3 Therapie

Eine Antibiotikatherapie sollte unmittelbar nach Diagnosestellung eingeleitet werden. Bei Erstmanifestation einer unkomplizierten, ambulant erworbenen SBP kann gemäß älteren Empfehlungen eine Therapie mittels Chinolon per os erfolgen (99–101), die aktuellste Leitlinie empfiehlt jedoch für den Fall einer ambulant erworbenen SBP die Anwendung von Cephalosporinen der Gruppe 3a (22,102–104). Allerdings muss die jeweilige lokale Resistenzlage beachtet werden. So kommen alternativ zu Cephalosporinen auch Carbapeneme zum Einsatz (101,105,106). Bei nosokomial erworbenen Infektionen bzw. bei hospitalisierten Patienten wird die Therapie mit Carbapenemen empfohlen (22). Des Weiteren wird eine intravenöse Albumin-Substitution von 1,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht am ersten Tag der Infektion und von 1 mg pro Kilogramm Körpergewicht am dritten Tag der Infektion empfohlen (22). Der Erfolg der Therapie sollte nach 48 Stunden sowohl klinisch als auch mittels Kontrollpunktion des Aszites erfolgen (22,101).

1.3.4 Prophylaxe

Grundsätzlich wird zwischen einer Primär- und einer Sekundärprophylaxe unterschieden. Bei einigen besonderen Patientengruppen mit dem Krankheitsbild einer Leberzirrhose kann eine antibiotische Primärprophylaxe der SBP erwogen werden. So sind insbesondere Patienten mit einem Gesamteiweißgehalt von weniger als 1,5 g pro Deziliter Aszitesflüssigkeit als Risikopatienten einzustufen, da aufgrund des verringerten Eiweißgehaltes, eine verringerte Opsonisierungsfähigkeit vorliegt (22,45,107,108), sodass hier eine antibiotische Primärprophylaxe mit Norfloxacin oder Rifaximin erfolgen sollte (22). Eine Sekundärprophylaxe ist bei allen Patienten mit durchlaufener SBP indiziert, da das Rezidivrisiko bei 69 % innerhalb eines Jahres liegt (39). Eine antibiotische Sekundärprophylaxe sollte mit Norfloxacin, Rifaximin, Ciprofloxacin oder Trimethoprim-Sulfamethoxazol erfolgen (22). Ein Stufendiagramm zur Entscheidungshilfe bei der Indikationsstellung zur antibiotischen Prophylaxetherapie ist in Abbildung 10 dargestellt.

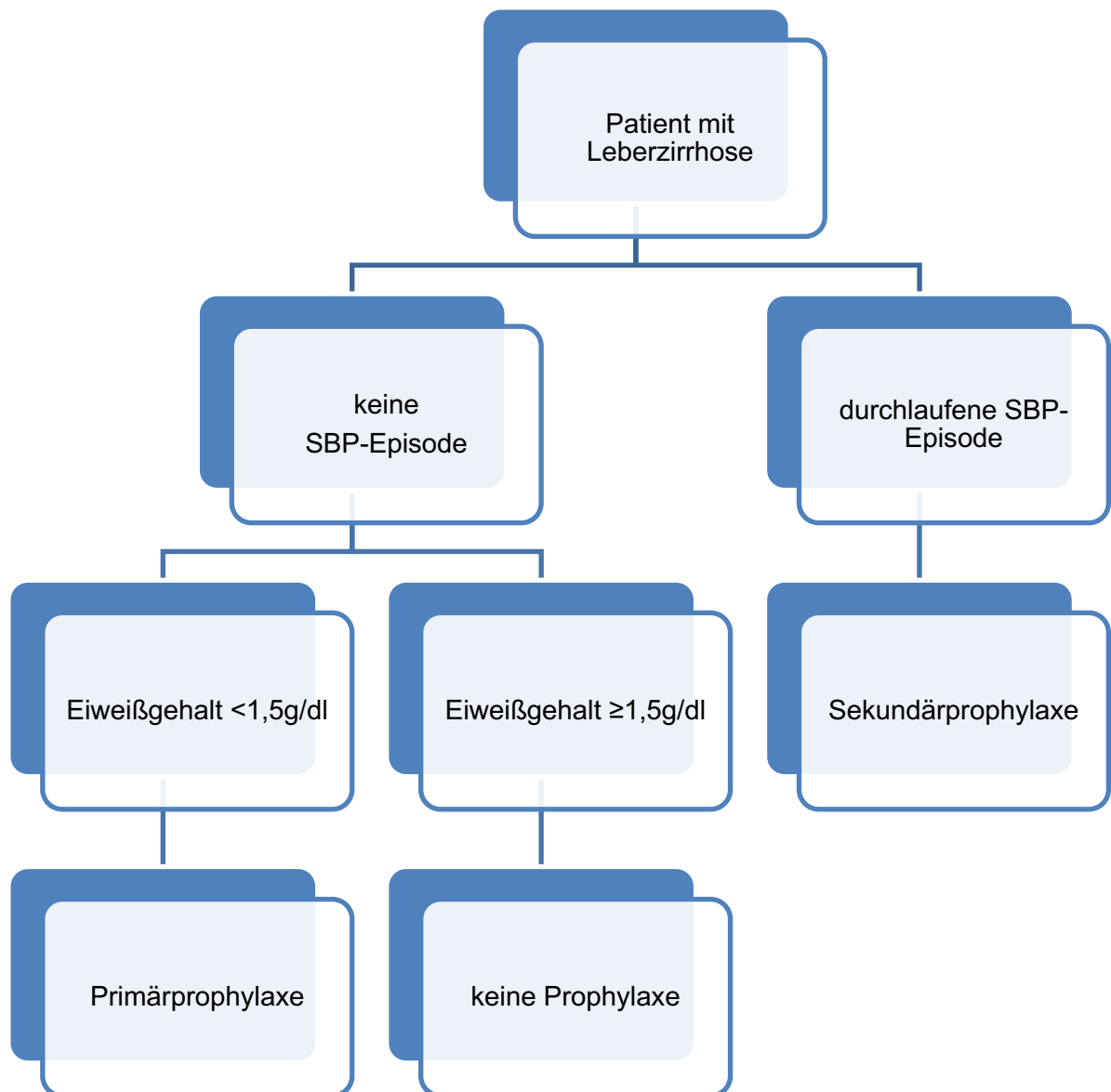


Abbildung 10: Stufendiagramm zur Indikationsstellung einer antibiotischen Prophylaxe bei SBP nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen. Dargestellt ist ein Arbeitsdiagramm zur schrittweisen Indikationsstellung einer antibiotischen Primär- oder Sekundärprophylaxe bei SBP. Das grundlegende Entscheidungskriterium zwischen Primär- und Sekundärprophylaxe stellt das Vorhandensein einer SBP-Episode in der Vorgeschichte dar. Bei bereits durchlaufener SBP in der Vergangenheit sollte eine antibiotische Sekundärprophylaxe erfolgen. Bei blander Anamnese hinsichtlich durchlaufener SBP sollte der Gesamteiweißgehalt in der jeweiligen Aszitesflüssigkeit betrachtet werden. Liegt dieser unter einem Wert von 1,5 g/dl, ist aufgrund von ungünstigeren immunologischen Verhältnissen eine antibiotische Primärprophylaxe indiziert (22).

1.4 Potenzielle Biomarker und diagnostische Alternativen

1.4.1 Esteraseaktivität von Leukozyten im Urin

Wie bereits erwähnt, ist eine frühzeitige Diagnosestellung im Falle einer SBP von enormer klinischer Wichtigkeit. Um eine möglichst frühe Diagnosestellung zu gewährleisten, ist die Entwicklung von Bedside-Tests von großer Bedeutung. So wurde in einer Vielzahl von Studien die Anwendung von Urinteststreifen von verschiedenen Herstellern als diagnostisches Mittel untersucht. Mithilfe der Teststreifen kann die Esteraseaktivität von Leukozyten mit einer Farbreaktion quantitativ nachgewiesen werden (109). Im Rahmen verschiedenster Studien wurden die Teststreifen MultiStix 8 SG (109–112), Combur 2 LN (110,111) und Nephur (112) im Vergleich mit zytologischen Analysen untersucht. Ebenso wurde bereits ein Review mit insgesamt 19 inkludierten Studien veröffentlicht (113). Insgesamt stellte sich die Sensitivität in den unterschiedlichen Studienpopulationen undulierend dar. Die Sensitivität lag insgesamt zwischen 45,3 % und 89 % (109–112), die Spezifität präsentierte sich zwischen 98 % und 100 % (109–112). Auffällig war, dass Studien mit großen Stichproben ($n = 2123$) hier niedrigere Werte für die Sensitivität der Teststreifen im Hinblick auf die Diagnostik einer SBP als Studien mit geringerer Stichprobengröße ($n = 100$) zeigten (109,111,113). Insbesondere bei niedriger PMN-Zahl ($< 1000/\text{mm}^3$) oder gar bei Bakteraszites (Sensitivität zwischen 22,4 % und 44,4 %) imponiert die Aussagekraft bei erniedrigter Sensitivität eingeschränkt (110,113). Insgesamt stellen Urinteststreifen mit ihrer eingeschränkten Sensitivität allenfalls ein ergänzendes Diagnostikum dar, das den Goldstandard der zytologischen Analyse nicht ablösen kann (22,109,113).

1.4.2 Calprotectin

Calprotectin ist ein Calcium- und Zink bindendes Protein aus der S100-Familie. Mitglieder dieser Familie werden bei inflammatorischen Geschehen aus Phagozyten ausgeschüttet. Calprotectin ist hierbei vor allem in neutrophilen Granulozyten nachweisbar und kann auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten gefunden werden (114). Calprotectin ist besonders aus dem Themengebiet der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bekannt. Hier gilt Calprotectin als prognostischer Verlaufsparemeter und als Abgrenzung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen von einem Reizdarmsyndrom (115). Außerdem konnte die Bestimmung der Calprotectin-Konzentration aus dem Stuhl von Patienten in Studien

1 EINLEITUNG

mit dem Effekt, vermeidbare Koloskopien bei fehlendem Hinweis auf eine akute Entzündung auszusetzen, in Verbindung gebracht werden (116). In diesem Zusammenhang konnten bereits Bedside-Tests zu einer schnelleren Analyse (115,117,118) und einer gesteigerten Lebensqualität sowie Unabhängigkeit der betroffenen Patienten entwickelt werden. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen einer permeablen Darmbarriere und der Entstehung einer SBP ist Calprotectin auch bei analytischen Untersuchungen von Aszitesflüssigkeit in das Zentrum der Forschung gerückt. So konnte Calprotectin in verschiedenen Studien als potenzieller Biomarker für die SBP identifiziert werden. In der Studie von Burri et al. aus dem Jahr 2013 wurden die Calprotectin-Konzentrationen in 130 Proben von 71 Patienten mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sowie einer Point-of-Care-Testung untersucht. In der Kohorte wiesen 19 Proben eine PMN-Zahl von mehr als 250 pro μl Aszitesflüssigkeit auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die PMN-Zahl mit der Calprotectin-Konzentration korreliert. Als idealer Cut-off für die Diagnose einer SBP mittels ELISA wurde eine Calprotectin-Konzentration von 0,63 $\mu\text{g/ml}$ Aszitesflüssigkeit mit einer Sensitivität von 94,8 % und einer Spezifität von 89,2 % gewählt (119). Lutz et al. ermittelten die Calprotectin-Konzentration sowie die Calprotectin-Protein-Ratio in 120 Proben von 108 Patienten mittels ELISA. Hier zeigte sich, dass die Calprotectin-Konzentration in den SBP-Proben (Median 928 ng/ml) höher als in den nicht infizierten Proben gemessen werden konnte. Die Ratio erwies sich hier als aussagekräftiger im Vergleich zu der alleinigen Calprotectin-Konzentration (120). In der Studie von Abdel-Razik et al. wurden das Serum-Procalcitonin, Calprotectin aus der Aszitesflüssigkeit sowie Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor je aus dem Serum und der Aszitesflüssigkeit von 79 Patienten mittels ELISA untersucht. Das Serum-Procalcitonin und die Calprotectin-Konzentration aus der Aszitesflüssigkeit waren bei den SBP-Proben signifikant erhöht und das Interleukin-6 sowie der Tumornekrosefaktor wiesen eine signifikante Erhöhung zu gesunden Vergleichsproben auf. Der Cut-off für die Diagnose einer SBP wurde bei einer Calprotectin-Konzentration von 445 ng/ml Aszitesflüssigkeit mit einer Sensitivität von 95,4 % und einer Spezifität von 85,2 % festgelegt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Calprotectin-Konzentration in der Aszitesflüssigkeit mit der PMN-Zahl korreliert (121). Fernandes et al. untersuchten die Calprotectin-Werte von 88 Patienten mittels einer Point-of-Care-Testung. Die Calprotectin-Konzentration war in den SBP-Proben signifikant höher als in den Nicht-SBP-Proben.

1 EINLEITUNG

Außerdem korrelierte die Calprotectin-Konzentration auch hier sowohl mit der PMN-Zahl als auch mit anderen inflammatorischen Markern. Der Cut-off für die Diagnose einer SBP wurde bei einer Calprotectin-Konzentration von 1,57 µg/ml Aszitesflüssigkeit mit einer Sensitivität von 87,8 % und einer Spezifität von 97,9 % gesetzt (122). Zusammenfassend konnte Calprotectin somit bereits in einer Vielzahl von Studien als inflammatorischer Bestandteil der Aszitesflüssigkeit nachgewiesen werden. Zudem gelang bereits eine Korrelation mit der Diagnosestellung einer SBP. Jedoch wurde noch kein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf sowie dem Therapieansprechen hergestellt.

1.4.3 Lactoferrin

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Protein aus der Familie der Transferrine. Man findet es in humaner Brustmilch, mukösem Sekret, gastrointestinalem Sekret, Speichel, Tränen, Sperma, vaginalem Sekret, nasaler Flüssigkeit und im bronchialen Mucus. Es ist als Biomarker bei inflammatorischen Darmerkrankungen sowie beim kolorektalen Karzinom bekannt (123,124). In der Studie von Lee et al. wurde die Lactoferrin-Konzentration aus Aszitesflüssigkeit von 102 Patienten mittels ELISA untersucht. Die Lactoferrin-Konzentration lag bei den SBP-Proben signifikant höher als bei den Nicht-SBP-Proben. Der Cut-off für die Diagnosestellung einer SBP wurde bei einer Lactoferrin-Konzentration von 51,4 ng/ml Aszitesflüssigkeit mit einer Sensitivität von 95,8 % und einer Spezifität von 74,4 % gewählt. Da Lactoferrin auch als potenzieller Biomarker für die Entwicklung eines HCC gehandelt wird, wurden hohe Lactoferrin-Konzentrationen ohne das Vorliegen einer SBP durch die Entwicklung eines HCC erklärt (123). Parsi et al. bestimmten die Lactoferrin-Konzentration in 218 Proben von 148 Patienten mittels ELISA. Der Median der Lactoferrin-Konzentration in den SBP-Proben (3744 ng/ml) lag höher als die Konzentration in den Nicht-SBP-Proben. Der Cut-off für die Diagnose einer SBP wurde hier bei einer Lactoferrin-Konzentration von 242 ng/ml Aszitesflüssigkeit mit einer Sensitivität von 95,5 % und einer Spezifität von 97 % gewählt (125). Zusammenfassend wurden folglich auch Lactoferrin als inflammatorischer Bestandteil der Aszitesflüssigkeit sowie eine Korrelation von Lactoferrin mit der Diagnosestellung einer SBP nachgewiesen.

1.4.4 Komplementfaktor C3

Das Komplementsystem spielt eine zentrale Rolle in der unspezifischen, lokalen Immunabwehr des Körpers. Im Komplementsystem sind verschiedene Komplementfaktoren enthalten, die eine direkte Abwehr von Pathogenen, eine Opsonisierung sowie eine Chemotaxis hervorrufen können. Die Produktion der Komplementfaktoren erfolgt in den Hepatozyten der Leber, weshalb eine Reduktion von Komplementfaktoren im Rahmen einer Leberzirrhose nachgewiesen werden kann (126). In verschiedenen Untersuchungen wurde insbesondere eine Reduktion des Komplementfaktor-C3-Spiegels als Faktor mit prognostischem Wert bei der Entwicklung einer SBP beschrieben. So zeigten Such et al. eine signifikante Reduktion des Komplementfaktor-C3-Spiegels in der Aszitesflüssigkeit bei Patienten, die eine SBP entwickeln. Insgesamt wurden hier 33 Patienten, von denen sieben mindestens eine SBP-Episode vorwiesen, untersucht (127). Ähnliche Ergebnisse zeigten Mustafa et al., die ebenfalls eine Reduktion von Komplementfaktor C3 in der Aszitesflüssigkeit von Patienten, die eine SBP entwickeln, nachweisen konnten. In dieser Untersuchung wurden insgesamt 30 Patienten untersucht, von denen 15 eine SBP entwickelten und 15 ohne SBP-Episode verblieben. Auch der Komplementfaktor C3 konnte mehrmals in Aszitesflüssigkeiten nachgewiesen werden (126,127).

1.4.5 Nachweis bakterieller DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In Untersuchungen zur Pathogenese der SBP rückt die bakterielle Translokation von Darmbakterien aus dem Darmlumen über die epitheliale Barriere in die MLNs und schließlich in die Aszitesflüssigkeit immer weiter in den Fokus. Aufgrund dieser Überlegung wurden Untersuchungen zum Nachweis bakterieller DNA in der Aszitesflüssigkeit und ggf. auch im Blut mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. In verschiedensten Studien wurden PCR-Untersuchungen bei Patienten mit Leberzirrhose mit der Aszitesflüssigkeit (128–130) und teilweise ergänzend mit Blut (128) durchgeführt. Hierbei konnte bakterielle DNA in der Aszitesflüssigkeit und auch im Blut nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang vor allem bei Proben, die auch in mikrobiologischen Untersuchungen von Kulturen einen Keimnachweis erbrachten, sodass die PCR-Untersuchung als potenzielle Alternative zur Anlage von Asziteskulturen aufgeführt wurde (129). Eine erhöhte Mortalität beim Nachweis von bakterieller DNA zeigte sich nicht (131). Weiterhin konnte insgesamt in größeren Studienpopulationen keine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer SBP und dem Nachweis von bakterieller DNA verzeichnet werden (130). Die Ursache liegt

1 EINLEITUNG

wohl am ehesten darin, dass bei einer PCR-Untersuchung nicht zwischen vitalen Pathogenen und avitalen Bruchstücken von Erregern unterschieden werden kann, sodass alles in allem die PCR-Untersuchung nicht zur Diagnosestellung, sondern allenfalls als diagnostische Ergänzung in Betracht gezogen werden sollte (22).

1.5 Zielsetzung

Die SBP stellt auch im Zeitalter der modernen Medizin sowohl pathophysiologisch als auch diagnostisch und therapeutisch eine Herausforderung dar. In unserer Arbeitsgruppe gibt es bereits mehrere Untersuchungen zu den zugrundeliegenden Pathomechanismen der SBP. Mit dieser Arbeit wollen wir weitere Untersuchungen hinsichtlich der diagnostischen Möglichkeiten in Betracht ziehen. Es besteht die Hoffnung, dass durch eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten und eine daraus resultierende frühere Therapieeinleitung eine Verbesserung der prognostischen Gegebenheiten für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose entsteht. Durch die Analyse der inflammatorischen Aktivität anhand von acht verschiedenen Entzündungsmarkern (S100a12, Calprotectin, Lactoferrin, Komplementfaktor C3a, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10) und Interferon-gamma-induziertes Protein-10 (IP-10)) soll eine neue Plastizität der inflammatorischen Vorgänge innerhalb der Aszitesflüssigkeit bei der Entwicklung und dem Verlauf einer SBP in Erfahrung gebracht werden. Durch die Analyse von direkt an der immunologischen Antwort beteiligten Botenstoffen, unabhängig von der zytologischen Auswertung der Aszitesflüssigkeit, öffnen sich neue Türen für diagnostische Ansätze. Ein optimaler Biomarker für das Krankheitsbild der SBP sollte mehrere Eigenschaften aufweisen. Erstens sollte er inflammatorische Prozesse innerhalb der Aszitesflüssigkeit abbilden, ohne andere entzündliche Vorgänge anzuzeigen. Weiterhin muss eine Verbesserung bzw. eine Verschlechterung des Krankheitszustandes reflektiert werden. Drittens sollte eine schwerwiegende Infektion, wenn möglich, angezeigt werden, bevor sie tatsächlich eintritt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, neue Biomarker zur Diagnostik und Beurteilung des Krankheitsverlaufes bei einer SBP zu identifizieren und somit den Grundstock für weitere Untersuchungen hinsichtlich einer verbesserten Prognose für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose und SBP zu schaffen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Geräte oder Laborbedarf	Hersteller
Analysewaage Excellence XA105	Mettler Toledo, Deutschland
Biofuge Fresco	Heraeus Group, Hanau, Deutschland
Clear Microplate 96 Well	R&D Systems, Minneapolis
Cell Culture Plate 96 Well	Corning Incorporated, USA
Costar® Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, USA
EMax® Plus Microplate Reader	Molecular Devices, USA
Eppendorf Easypet	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Deutschland
Falcon 50 ml Tubes	Corning Incorporated, USA
Falcon 15 ml Tubes	Corning Incorporated, USA
HERAsafe Sterilbank	Heraeus Group, Hanau, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli-Q Q-POD	Merck Millipore, USA
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Cell Culture Plate 96 Well	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.3 Software

Software	Hersteller
SoftMax Pro 7	Molecular Devices, USA
SigmaPlot	Systat Software GmbH, Deutschland
Excel	Microsoft, USA

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1.4 Puffer und Reagenzien

Puffer und Reagenzien	Hersteller oder Herstellungsanleitung
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, USA
Kupfer(II)-sulfat	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&Sell, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PanReac AppliChem, Deutschland
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
TMB	Sigma-Aldrich, USA
PBS (pH 7,3–7,4)	140 mM NaCl 10 mM Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat 2,7 mM KCl 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Stopp-Lösung	1 M H ₂ SO ₄
ELISA-Waschpuffer (für IL-6, IL-8, IL-10, EN-RAGE, CXCL10)	1-mal PBS 0,005 % Tween
Reagentdiluent (für IL-6, IL-8, IL-10)	1 : 10 FCS in 1-mal PBS
Reagentdiluent (EN-RAGE, CXCL10)	1 % BSA in 1-mal PBS
Working-Reagent (für BCA-Assay)	Bicinchoninsäure 20 ml Kupfer(II)-sulfat 400 µl
10x PBS	NaCl 80 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 28,85 g Auffüllen auf 1 l mit Millipore-H ₂ O

2.1.5 ELISA-Kits

ELISA-Kit	Hersteller
Human Calprotectin	Hycult Biotech, USA
Human C3a	Hycult Biotech, USA
Human Lactoferrin	Hycult Biotech, USA
Human EN-RAGE	R&D Systems, USA
Human CXCL10	R&D Systems, USA
Human IL-6	BD Biosciences, USA

Human IL-8	BD Biosciences, USA
Human IL-10	BD Biosciences, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Probenaufbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Aszitesflüssigkeit von diagnostischen Aszitespunktionen von Patienten auf Station und Intensivstation der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg aufbereitet. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen zunächst ein 50-ml-Probengefäß mit 50 ml Aszitesflüssigkeit befüllt und dieses bei -80°C gelagert. Weiter wurde viermal jeweils 1 ml Aszitesflüssigkeit in 1,5-ml-Probengefäßen für die Analyse auf potenzielle Biomarker bei -20°C gelagert. Außerdem wurden je Patientenprobe 100 μl Aszitesflüssigkeit auf einer LB0-Platte ausgestrichen, um eventuelle Erreger einer SBP nachzuweisen. Die jeweiligen Patientenproben wurden fortlaufend nummeriert. Parallel wurde die Krankengeschichte der Patienten mittels Datenrecherche in Erfahrung gebracht und nach dem ELISA und Bicinchoninsäure-Protein-Assay mit dem jeweiligen Probenmaterial verknüpft (vgl. Abb. 11). Es erfolgte somit die Verknüpfung der jeweiligen Entzündungsmarkerkonzentration mit dem Gesamtproteingehalt und den entsprechenden Patientendaten. Weiterhin wurde für das Sammeln und Asservieren der jeweiligen Aszitesproben sowie für die zugrundeliegenden Analysen dieser Arbeit ein Ethikvotum eingeholt.

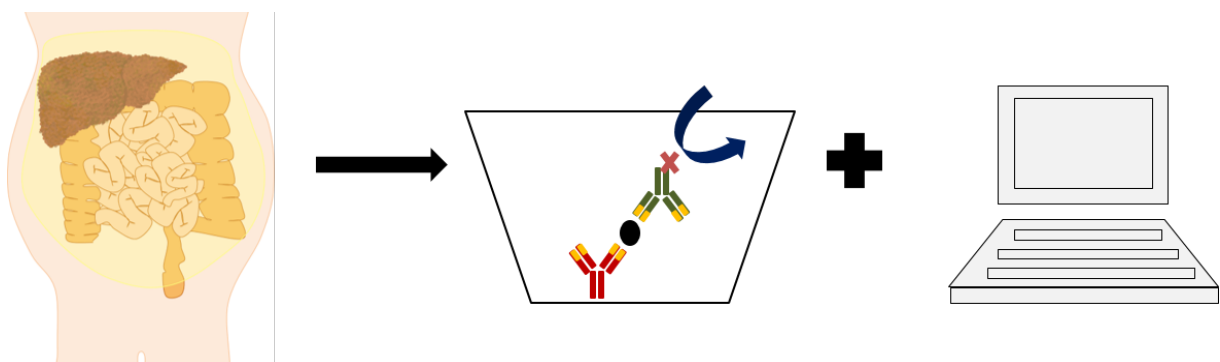


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von Aszitesflüssigkeiten von Patienten mit Leberzirrhose asserviert und mittels ELISA auf insgesamt acht verschiedene Entzündungsmarker untersucht. Außerdem wurde mit jeder Probe ein Bicinchoninsäure-Protein-Assay durchgeführt. Abschließend wurden die jeweiligen Patientendaten

2 MATERIAL UND METHODEN

und zytologischen Analysen der entsprechenden Aszitesflüssigkeiten mittels Datenrecherche erhoben und mit den im Forschungslabor erhobenen Datensätzen verknüpft.

2.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.2.2.1 Calprotectin

Die ELISA-Analyse des humanen Calprotectins in der Aszitesflüssigkeit erfolgte mit dem Human Calprotectin Kit von Hycult® Biotech und wurde gemäß der Anleitung zu diesem Kit durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung in den Verdünnungen 1:75 und 1:100 aufgetragen. In die Wells der bereits mit Calprotectin-Antikörpern gecoateten ELISA-Platte wurden jeweils 100 µl Standard und Probe pipettiert und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte mit dem im ELISA-Kit enthaltenen Waschpuffer viermal gewaschen und 100 µl eines biotinylierten Tracer-Antikörpers pro Well zugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur wurde der Waschvorgang wiederholt und 100 µl des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats pro Well pipettiert. Die Ansätze wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach viermal gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl Tetramethylbenzidin(TMB)-Lösung pro Well hinzugegeben und die Reaktion mit 100 µl Stopp-Lösung beendet. Die Absorption der Proben wurde mit dem ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

2.2.2.2 S100a12

Die Analyse der S100a12-Konzentration in der Aszitesflüssigkeit erfolgte mit dem Human Enrage- ELISA Kit von R&D Systems und wurde entsprechend der Anleitung durchgeführt. Die Proben wurden in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 jeweils in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Platte wurde zunächst mit 100 µl Mouse Anti-Human EN-RAGE Capture Antibody pro Well gecoatet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit dem Waschpuffer, nach oben angegebener Rezeptur (1-mal PBS; 0,005 % Tween), gewaschen und mit 300 µl Reagentdiluent (siehe oben: 1 % BSA in 1-mal PBS) für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der Waschvorgang wiederholt und pro Well je 100 µl Standard und Probe pipettiert und für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und je 100 µl biotinylierter Mouse Anti-Human Detection Antibody pro Well zugegeben und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und danach 100 µl Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat pro Well zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur

2 MATERIAL UND METHODEN

inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal gewaschen und je 100 µl Substrat-Lösung pro Well zugegeben und die Reaktion mit je 50 µl Stopp-Lösung beendet. Die Absorption der Proben wurde mit dem ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

2.2.2.3 Lactoferrin

Die ELISA-Analyse des humanen Lactoferrins in der Aszitesflüssigkeit erfolgte mit dem Lactoferrin Kit von Hycult® Biotech und wurde gemäß der Anleitung zu diesem Kit durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung in den Verdünnungen 1:75 und 1:100 aufgetragen. Die verdünnten Proben und alle benötigten Reagenzien wurden zunächst für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. In die Wells der bereits mit Lactoferrin-Antikörpern gecoateten ELISA-Platte wurden jeweils 100 µl Standard und Probe pipettiert und die Ansätze 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte mit dem Waschpuffer viermal gewaschen und 100 µl eines biotinylierten Tracer-Antikörpers pro Well zugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur wurde der Waschvorgang wiederholt und 100 µl des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats pro Well pipettiert. Dies wurde für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach viermal gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl TMB-Lösung pro Well hinzugegeben und die Reaktion mit 100 µl Stopp-Lösung beendet. Die Absorption der Proben wurde mit dem ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

2.2.2.4 C3a

Die ELISA-Analyse des humanen C3a in der Aszitesflüssigkeit erfolgte mit dem C3a Kit von Hycult® Biotech und wurde gemäß der Anleitung zu diesem Kit durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung in den Verdünnungen 1:75 und 1:100 aufgetragen. In die Wells der bereits mit C3a-Antikörpern gecoateten ELISA-Platte wurden jeweils 100 µl Standard und Probe pipettiert und dies 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte mit dem Waschpuffer viermal gewaschen und 100 µl eines biotinylierten Tracer-Antikörpers pro Well zugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur wurde der Waschvorgang wiederholt und 100 µl des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats pro Well pipettiert. Die Ansätze wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach viermal gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl TMB-Lösung pro Well hinzugegeben und die Reaktion mit 100 µl Stopp-Lösung beendet. Die Absorption der Proben wurde mit dem ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.2.2.5 IP-10

Die Analyse der IP-10-Konzentration in der Aszitesflüssigkeit erfolgte mit dem Human CXCL10 ELISA Kit von R&D Systems und wurde nach der zugehörigen Anleitung durchgeführt. Die Proben wurden in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 jeweils in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Platte wurde zunächst mit 100 µl Mouse Anti-Human IP-10 Capture Antibody pro Well gecoatet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit dem Waschpuffer, nach oben angegebener Rezeptur (1-mal PBS; 0,005 % Tween), gewaschen und mit 300 µl 1 % BSA in PBS pro Well für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der Waschvorgang wiederholt und pro Well je 100 µl Standard und Probe pipettiert und für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und je 100 µl biotinylierter Goat Anti-Human IP-10 Detection Antibody in angegebener Konzentration pro Well zugegeben und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und danach 100 µl Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat in angegebener Verdünnung pro Well zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal gewaschen und je 100 µl TMB-Substrat-Lösung pro Well zugegeben und die Reaktion mit je 50 µl Stopp-Lösung beendet. Die Absorption der Proben wurde mit dem ELISA-Reader bei 450 nm vermessen.

2.2.2.6 IL-6

Die Konzentrationsanalyse des humanen IL-6 erfolgte mit dem Human IL-6 ELISA Kit der Firma BD Biosciences. Zunächst wurden 96-Well-Platten mit je 100 µl IL-6 Capture Antibody pro Well gecoatet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit dem Waschpuffer, nach oben angegebener Rezeptur (1-mal PBS; 0,005 % Tween), gewaschen und mit jeweils 200 µl Reagentdiluent (siehe oben: 1:10 FCS in 1-mal PBS) pro Well für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der Waschvorgang dreimal wiederholt und die Standardreihe sowie die Proben in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 in Doppelbestimmung mit je 100 µl pro Well pipettiert und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde fünfmal gewaschen und je 100 µl biotinylierter Detection Antibody mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat pro Well zugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde siebenmal wiederholt und je 100 µl TMB pro Well zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl Stopp-Lösung beendet und die Absorption der Proben bei 450 nm vermessen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.2.2.7 IL-8

Die Konzentrationsanalyse des humanen IL-8 erfolgte mit dem Human IL-8 ELISA Kit der Firma BD Biosciences. Zunächst wurden 96-Well-Platten mit je 100 µl IL-8 Capture Antibody pro Well gecoatet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit dem Waschpuffer, nach oben angegebener Rezeptur (1-mal PBS; 0,005 % Tween), gewaschen und mit jeweils 200 µl Reagentdiluent (siehe oben: 1:10 FCS in 1-mal PBS) pro Well für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der Waschvorgang dreimal wiederholt und die Standardreihe sowie die Proben in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 in Doppelbestimmung mit je 100 µl pro Well pipettiert und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde fünfmal gewaschen und je 100 µl biotinylierter Detection Antibody mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat pro Well zugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde siebenmal wiederholt und je 100 µl TMB pro Well zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl Stopp-Lösung beendet und die Absorption der Proben bei 450 nm vermessen.

2.2.2.8 IL-10

Die Konzentrationsanalyse des humanen IL-10 erfolgte mit dem Human IL-10 ELISA Kit der Firma BD Biosciences. Zunächst wurden 96-Well-Platten mit je 100 µl Capture Antibody pro Well gecoatet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit dem Waschpuffer, nach oben angegebener Rezeptur (1-mal PBS; 0,005 % Tween), gewaschen und mit jeweils 200 µl Reagentdiluent (siehe oben: 1:10 FCS in 1-mal PBS) pro Well für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der Waschvorgang dreimal wiederholt und die Standardreihe sowie die Proben in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 in Doppelbestimmung mit je 100 µl pro Well pipettiert und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde fünfmal gewaschen und je 100 µl biotinylierter Detection Antibody mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat pro Well zugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde siebenmal wiederholt und je 100 µl TMB pro Well zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl Stopp-Lösung beendet und die Absorption der Proben bei 450 nm vermessen.

2.2.3 Bicinchoninsäure-Protein-Assay (BCA)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den jeweiligen Aszitesproben wurde ein Bicinchoninsäure-Protein-Assay durchgeführt. Im Rahmen des Bicinchoninsäure-

2 MATERIAL UND METHODEN

Protein-Assays werden an Peptidbindungen Kupferionen gebunden und reduziert. Die gebundenen Kupferionen bilden mit der Bicinchoninsäure einen Farbkomplex. Mittels Photometrie kann dann eine Bestimmung des Proteingehaltes der jeweiligen Probe vorgenommen werden. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden 96-Well-Platten mit je 10 µl Standard und Probe, jeweils in den Verdünnungen 1:10 und 1:20, vorbereitet und danach je 200 µl Working-Reagenz, bestehend aus 50 Teilen Bicinchoninsäure und 1 Teil Kupfer(II)-sulfat, zugegeben. Die Platte wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert und danach mit dem ELISA-Reader bei 562 nm vermessen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Kohortenbeschreibung

Nach dem Abgleich der Patientengeschichte, die durch eine Datenrecherche in Erfahrung gebracht wurde, mit den jeweiligen Patientenproben konnte die Kohorte in eine Gruppe von Patienten mit SBP und eine Gruppe von Patienten ohne SBP eingeteilt werden. Diese beiden Gruppen wurden auf verschiedene potenzielle Biomarker untersucht. Hierbei fungierte die Gruppe ohne SBP als Kontrolle zu der Gruppe mit SBP.

Insgesamt wurden 190 Aszitesproben von 128 verschiedenen Patienten untersucht. 90 der Patienten waren männlich und 38 weiblich. Die Parazentese wurde vom Februar 2016 bis zum August 2019 durchgeführt. Der Median des Alters bei Punktion lag bei 60 Jahren (Range: 28–81 Jahre). Von den 190 Proben konnte gemäß dem Goldstandard mittels Bestimmung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Aszitesflüssigkeit (≥ 250 PMNs pro mm^3 Aszitesflüssigkeit) in insgesamt 29 (15,3 %) Proben die Diagnose einer SBP gestellt werden. Hiervon waren 21 Proben von männlichen Patienten und 8 Proben von weiblichen (vgl. Abb. 12). Eine Erhöhung der PMNs auf ≥ 100 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit konnte in insgesamt 47 (24,7 %) Proben nachgewiesen werden (vgl. Abb. 13). Hier zeigte sich die Geschlechterverteilung mit 33 männlichen und 14 weiblichen Patienten. Ein Keimnachweis im Falle einer SBP gelang in 2 Fällen und bewegte sich mit *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli* im bei einer SBP bekannten Keimspektrum. Die Genese der Leberzirrhose ist in dieser Kohorte mit 47 % (60 Patienten) am häufigsten auf eine äthyltoxische Erkrankung zurückzuführen. Eine detaillierte Beschreibung der Kohorte ist in Abbildung 14 dargestellt.

3 ERGEBNISSE

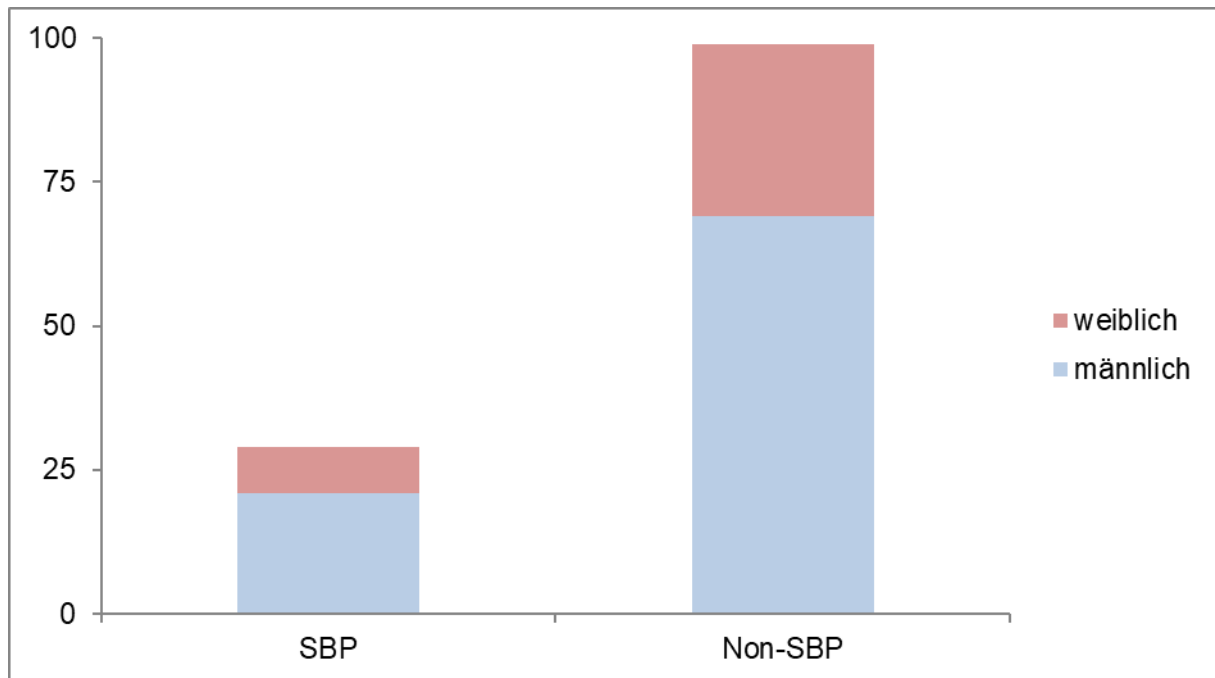


Abbildung 12: SBP-Kohorte und Non-SBP-Kohorte mit entsprechender Geschlechterverteilung.

Dargestellt ist zum einen die SBP-Kohorte unserer Studie und zum anderen die Non-SBP-Kohorte, die die Kontrollgruppe unserer Studienkohorte beschreibt. Die Geschlechterverteilung in der SBP-Gruppe setzt sich in unserer Population aus 21 männlichen (72 %) und 8 weiblichen (28 %) Patienten bei insgesamt 29 SBP-Patienten zusammen. Die Kontrollgruppe zählt insgesamt 99 Patienten, von denen 69 männlich (70 %) und 30 weiblich (30 %) sind.

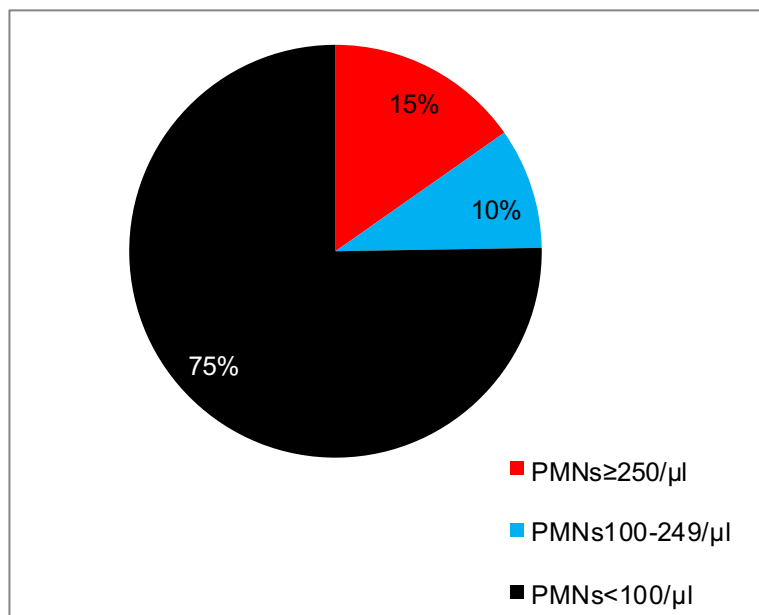


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der jeweiligen Aszitesflüssigkeit in der Studienkohorte. Dargestellt ist die Anzahl der PMNs in der untersuchten Population durch Aufteilung in 3 Gruppen. Die rote Gruppe stellt die klassische SBP-Kohorte (PMNs ≥ 250 pro μl Aszitesflüssigkeit) dar. Die blaue (PMNs 100–249 pro μl Aszitesflüssigkeit) und die

schwarze Gruppe (PMNs < 100 pro μl Aszitesflüssigkeit) bilden die Non-SBP- und damit die Kontrollgruppe. Die SBP-Kohorte bildet mit insgesamt 29 Proben 15 % der Gesamtprobenanzahl ab.

3 ERGEBNISSE

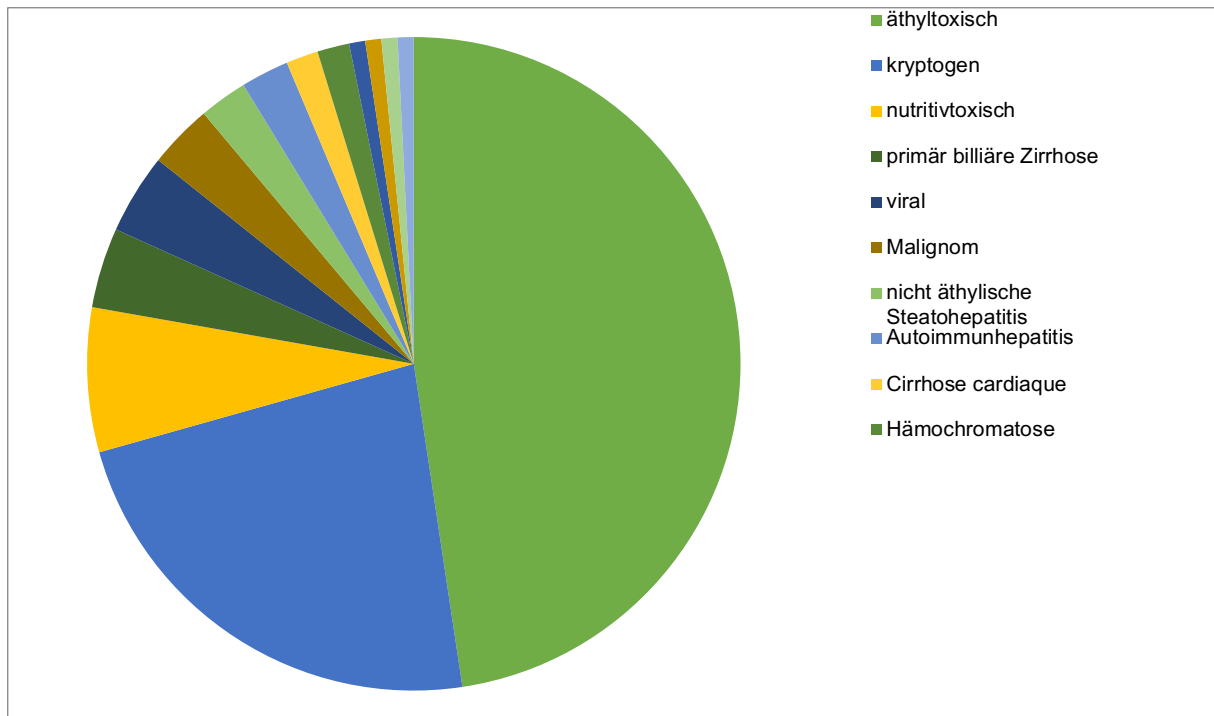


Abbildung 14: Genese der Leberzirrhose der Patienten, deren Aszitesflüssigkeit untersucht wurde, in absteigender Häufigkeit. Die Kohorte bietet ein repräsentatives Spektrum an unterschiedlichen Noxen und Grunderkrankungen. Im Kreisdiagramm sind die entsprechenden Entitäten in absteigender Häufigkeit, beginnend mit der äthylischen Genese (60 Patienten, entsprechen 47 %), dargestellt. Eine kryptogene Ursache der Leberzirrhose wurde in 29 Fällen (23 %) beschrieben. Die nutritivtoxische Genese wurde in 9 Fällen (entsprechen 7 %) diagnostiziert. In jeweils 5 Patienten und damit rund 4 % lag der Leberzirrhose eine Virushepatitis oder einer PBC zugrunde. Ein Malignom konnte in 4 Fällen (3 %) gefunden werden. Eine nichtäthylische Steatohepatitis und eine Autoimmunhepatitis waren ursächlich für jeweils 3 Fälle (2 %). Eine Cirrhose cardiaque sowie eine Hämochromatose wurden jeweils in 2 Fällen (1,5 %) diagnostiziert. Am seltensten in unserer Kohorte zeigten sich mit jeweils einem Fall (1 %) die sekundär sklerosierende Cholangitis, die primär sklerosierende Cholangitis, das HELLP-Syndrom sowie das Budd-Chiari-Syndrom.

3.2 Inflammatorische Aktivität bereits vor definitionsgemäßer Grenze einer spontan bakteriellen Peritonitis nachweisbar – neue Frühmarker einer SBP

Im Rahmen der Analysen zu dieser Arbeit wurden Aszitesproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von neutrophilen Granulozyten analysiert. Der Bereich der Konzentration von Neutrophilen erstreckte sich von 0 Zellen pro μl Aszitesflüssigkeit bis zu einem Maximum von 22100 Zellen pro μl Aszitesflüssigkeit. Per Definition besteht eine SBP, wenn die Neutrophilenzahl einen absoluten Wert von 250 pro μl Aszitesflüssigkeit erreicht bzw. überschreitet. In unseren Analysen der Aszitesproben hinsichtlich verschiedener Entzündungsmarker konnten wir eine inflammatorische Aktivität bereits unterhalb dieser Marke nachweisen. Bereits in der

3 ERGEBNISSE

Vergangenheit wurde der diagnostische Standard zum Nachweis einer SBP vom Herabsetzen der Neutrophilenzahl bis hin zum Verlassen des rein kulturbedingten Nachweises und dem Hinwenden zur zytologischen Analyse verändert. Die Erkenntnisse dieser Arbeit etablieren neue Strategien zur besseren und insbesondere früheren Diagnose einer SBP. Die Darstellung der inflammatorischen Aktivität ist in den jeweiligen Analysen der entsprechenden Entzündungsmarker dargestellt (vgl. Abb. 15–24). Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem ähnlichen inflammatorischen Verhalten der intermediären Gruppe (Neutrophilenzahl 100–249 pro μ l Aszitesflüssigkeit; N = 18; blau eingefärbt) und der klassischen SBP-Gruppe (in Rot dargestellt). In unseren Recherchen im Rahmen der Erhebung der zytologischen Analysen betrachteten wir insbesondere auch die Folgepunktionen der intermediären Kohorte. Von den 18 Proben der blauen Gruppe gab es von 9 Patienten zytologische Untersuchungen von Folgepunktionen. Hierbei konnte ein Anstieg der PMN-Zahl in 8 Punktionen (89 %) und in insgesamt 6 Punktionen (67 %) die Entwicklung einer SBP nachgewiesen werden.

3.3 Interleukine und IP-10 eignen sich nicht als Biomarker im Krankheitsbild einer SBP

Im Rahmen der Analysen verschiedener inflammatorischer Proteine als Biomarker für eine SBP wurde die Menge an IL-6, IL-8, IL-10 sowie IP-10 in der Aszitesflüssigkeit bestimmt. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches bereits in externen Untersuchungen in der Aszitesflüssigkeit untersucht wurde. Hierbei wurde es mit einer schlechteren Prognose bei akutem Leberversagen sowie mit einer Erhöhung bei SBP in Zusammenhang gebracht (132,133). IL-8 ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, welches unter anderem eine Entzündungsreaktion durch Attraktion von neutrophilen Granulozyten initiiert (134). Das Zusammenspiel zwischen IL-8 und neutrophilen Granulozyten, die aktuell den diagnostischen Goldstandard im Krankheitsbild der SBP bilden, stellt einen interessanten Sachverhalt dar. IL-10 ist anders als IL-6 und IL-8 kein proinflammatorisches, sondern ein antiinflammatorisches Zytokin, welches die Immunantwort des Körpers über die Hemmung von Makrophagen, eine Suppression der Antigenpräsentation sowie über die Hemmung der Sekretion von proinflammatorischen Faktoren inhibiert (135). IP-10 ist ein Chemokin, welches in der Vergangenheit bereits in externen Untersuchungen in der Aszitesflüssigkeit von Patienten mit Leberzirrhose vermessen und hierbei insbesondere mit einer Steigerung der Rezidiwwahrscheinlichkeit einer

3 ERGEBNISSE

SBP bei Erhöhung der Konzentration in der Aszitesflüssigkeit in Verbindung gebracht wurde (132). Die Gesamtanzahl der Proben in der IP-10-Analyse betrug 189, wobei hierbei in 29 Proben eine SBP nachgewiesen werden konnte. In der IL-6-Analyse wurden insgesamt 182 Proben, davon 28 SBP-Proben, ausgewertet. Die Analyse von IL-8 und IL-10 umfasste insgesamt 188 Proben, davon 28 SBP-Proben, bzw. 189 Proben, davon 29 SBP-Proben. In den durchgeführten Untersuchungen konnten in allen Aszitesproben relevante Mengen der jeweiligen Entzündungsmarker nachgewiesen werden. Im Falle der IL-6-Konzentration (Korrelationskoeffizient $r = 0,1$) und der IP-10-Konzentration (Korrelationskoeffizient $r = 0,1$) zeigte sich weder eine Korrelation mit diagnostischen Kriterien (keine Korrelation mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten) (vgl. Abb. 15) noch eine relevante Korrelation mit dem Krankheitsverlauf. Auch durch eine Normierung auf den Gesamtproteingehalt in den jeweiligen Proben durch Berechnung des entsprechenden Marker-Gesamtprotein-Quotienten (Division des jeweiligen inflammatorischen Markers durch den der jeweiligen Probe entsprechenden Gesamtproteingehalt) konnte keine Korrelation zwischen der Zellzahl und den jeweiligen Entzündungsmarkern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 16). Im Falle der IL-8-Konzentration (Korrelationskoeffizient $r = 0,5$) und der IL-10-Konzentration (Korrelationskoeffizient $r = 0,6$) sowie des IL-10-Gesamtprotein-Quotienten (Korrelationskoeffizient $r = 0,6$) konnte zwar eine statistische Korrelation mit der Anzahl von Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit festgestellt, jedoch kein sinnvoller Cut-off hinsichtlich Sensitivität und Spezifität für die Diagnosekriterien im Falle einer SBP gewählt werden.

3 ERGEBNISSE

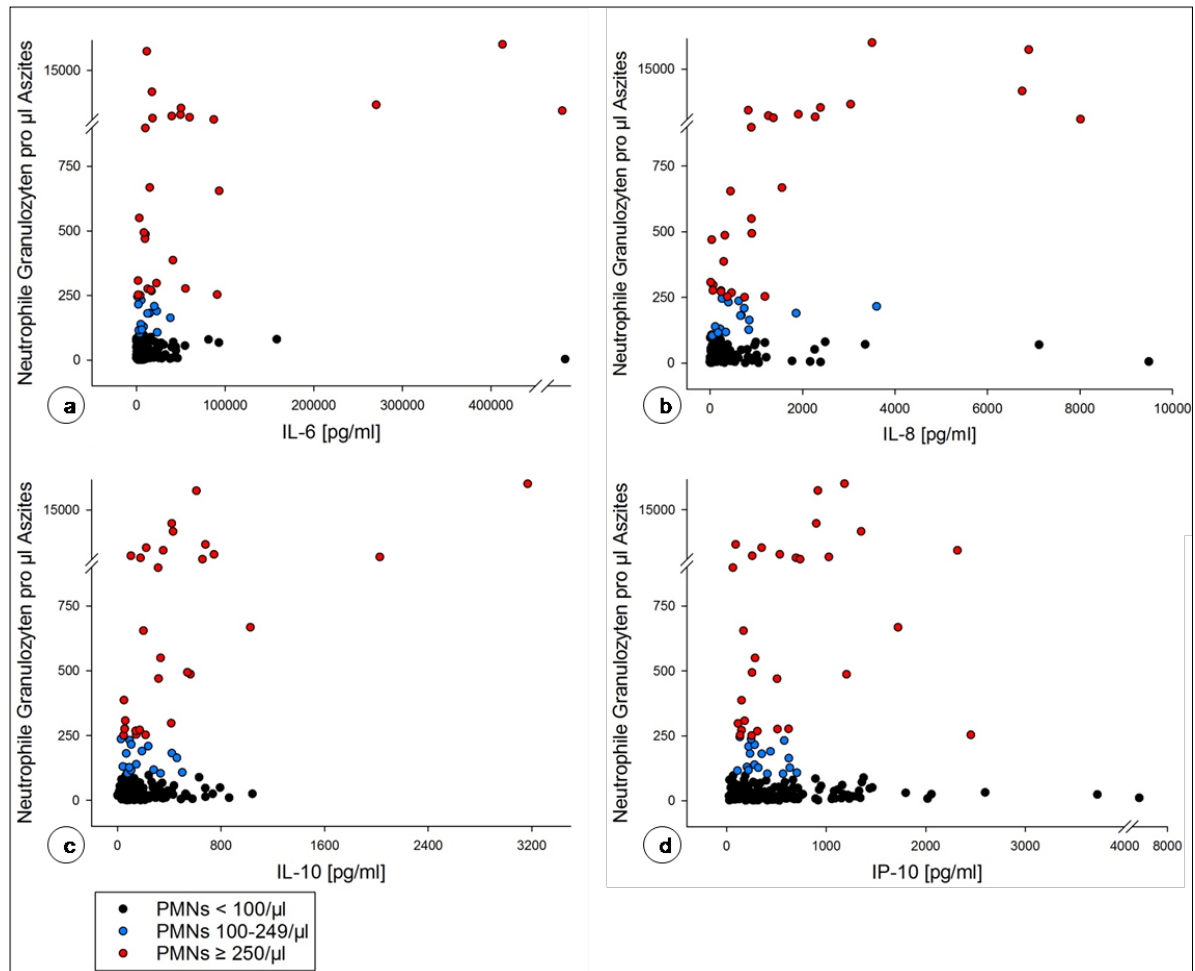


Abbildung 15: Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-10 und IP-10 in Aszitesflüssigkeit eignet sich nicht als Biomarker für SBP. Dargestellt sind auf der x-Achse die Konzentrationen in pg/ml der jeweiligen Entzündungsmarker (IL-6 [a], IL-8 [b], IL-10 [c] und IP-10 [d]) gegenüber der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit (y-Achse). Die farbliche Markierung erfolgte entsprechend der Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit. Die rote Gruppe (PMNs $\geq 250/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) stellt die SBP-Kohorte dar. Die blaue (PMNs 100–249/ μl Aszitesflüssigkeit) und die schwarze Gruppe (PMNs $< 100/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) präsentieren die Non-SBP-Proben. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von IL-6 und IP-10 in Aszitesproben nachweisbar sind und keine Korrelation mit den diagnostischen Kriterien einer SBP (≥ 250 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit; rote Gruppe) bilden. IL-8 und IL-10 wiesen zwar eine statistische Korrelation auf, jedoch konnte kein sinnvoller Cut-off zur Diagnostik einer SBP gewählt werden. Weiterhin zeigte die blaue Gruppe in einigen Analysen anderer Entzündungsmarker ein ähnliches inflammatorisches Verhalten wie die rote Gruppe, dies konnte in der Analyse von IL-6, IL-8, IL-10 und IP-10 nicht nachgewiesen werden.

3 ERGEBNISSE

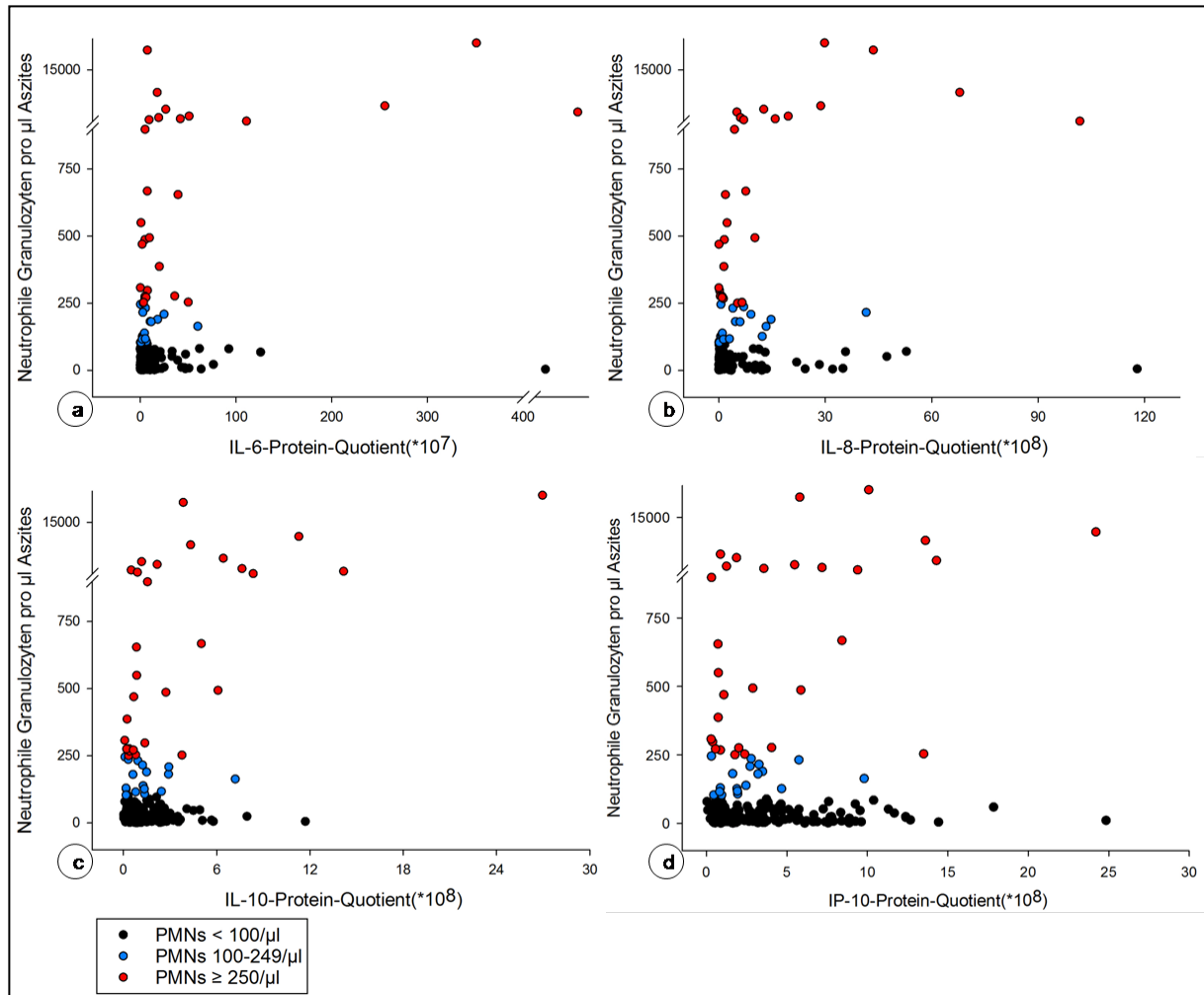


Abbildung 16: Jeweiliger Entzündungsmarker-Gesamtprotein-Quotient aus Aszitesflüssigkeit eignet sich nicht als Biomarker. Dargestellt sind auf der x-Achse die Quotienten berechnet aus dem jeweiligen Entzündungsmarker und dem entsprechenden Gesamtproteingehalt der Aszitesprobe (IL-6-Gesamtprotein-Quotient [a], IL-8-Gesamtprotein-Quotient [b], IL-10-Gesamtprotein-Quotient [c] und IP-10-Gesamtprotein-Quotient [d]) gegenüber der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit (y-Achse). Die farbliche Markierung erfolgte entsprechend der Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit. Die rote Gruppe (PMNs $\geq 250/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) stellt die SBP-Kohorte dar. Die blaue (PMNs 100–249/ μl Aszitesflüssigkeit) und die schwarze Gruppe (PMNs $< 100/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) präsentieren die Non-SBP-Proben. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass auch eine Normierung der entsprechenden Entzündungsmarkerkonzentrationen auf den jeweiligen Gesamtproteingehalt mittels Berechnung des Entzündungsmarker-Gesamtprotein-Quotienten im Falle von IL-6, IL-8 und IP-10 keine Korrelation mit den diagnostischen Kriterien einer SBP (≥ 250 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit; rote Gruppe) bildet. Der IL-10-Gesamtprotein-Quotient wies zwar eine statistische Korrelation auf, jedoch konnte kein sinnvoller Cut-off zur Diagnostik einer SBP gewählt werden. Weiterhin zeigte die blaue Gruppe in einigen Analysen anderer Entzündungsmarker ein ähnliches inflammatorisches Verhalten wie die rote Gruppe. Dies konnte in der Analyse der Interleukin-Gesamtprotein-Quotienten bzw. des IP-10-Gesamtprotein-Quotienten nicht nachgewiesen werden.

3.4 Komplementfaktor C3a zeigt eine tendenzielle Reduktion bei spontan bakterieller Peritonitis

Zur Analyse der Entzündungsaktivität in der Aszitesflüssigkeit führten wir Untersuchungen hinsichtlich des C3a-Gehaltes in den jeweiligen Proben durch. C3a ist Bestandteil des Komplementsystems, welches eine zentrale Rolle in der unspezifischen Immunabwehr des menschlichen Körpers spielt. Die Produktion der Komplementfaktoren erfolgt zumeist hepatisch. Bei einer Leberzirrhose sind die einzelnen Komplementfaktoren aus diesem Grund nur vermindert nachweisbar (126). In den bereits beschriebenen externen Untersuchungen konnte eine Reduktion des Komplementfaktor-C3-Spiegels in der Aszitesflüssigkeit bei Patienten, die eine SBP entwickeln, gezeigt werden (126,127). Die Analyse in dieser Arbeit umfasste insgesamt 184 Proben, wobei in 26 der Nachweis einer SBP erfolgte. In unseren Untersuchungen von C3a in Aszitesflüssigkeiten zeigte sich eine Verringerung der C3a-Konzentration beim Vorliegen einer SBP. Eine klare Abgrenzung von SBP- und Non-SBP-Proben konnte jedoch nicht durchgeführt werden (vgl. Abb. 17). Eine statistische Korrelation konnte weder zwischen der C3a-Konzentration und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $-0,05$) noch zwischen dem C3a-Gesamtprotein-Quotienten und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $-0,05$) festgestellt werden. Weiterhin zeigten in dieser Untersuchung Proben mit erhöhter Zellzahl, die jedoch definitionsgemäß nicht den Kriterien einer SBP entsprechen (vgl. blaue Gruppe Abb. 17), ein mit der klassischen SBP-Kohorte vergleichbares Verhalten mit tendenzieller Reduktion der C3a-Konzentration sowie des C3a-Gesamtprotein-Quotienten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem von einigen Patienten mehrere Aszitesproben, die bei Folge- oder Verlaufspunktionen gewonnen werden konnten, analysiert. Hierbei ließen sich ebenso Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf bzw. die Entwicklung und das therapeutische Ansprechen einer SBP ziehen (vgl. Abb. 18).

3 ERGEBNISSE

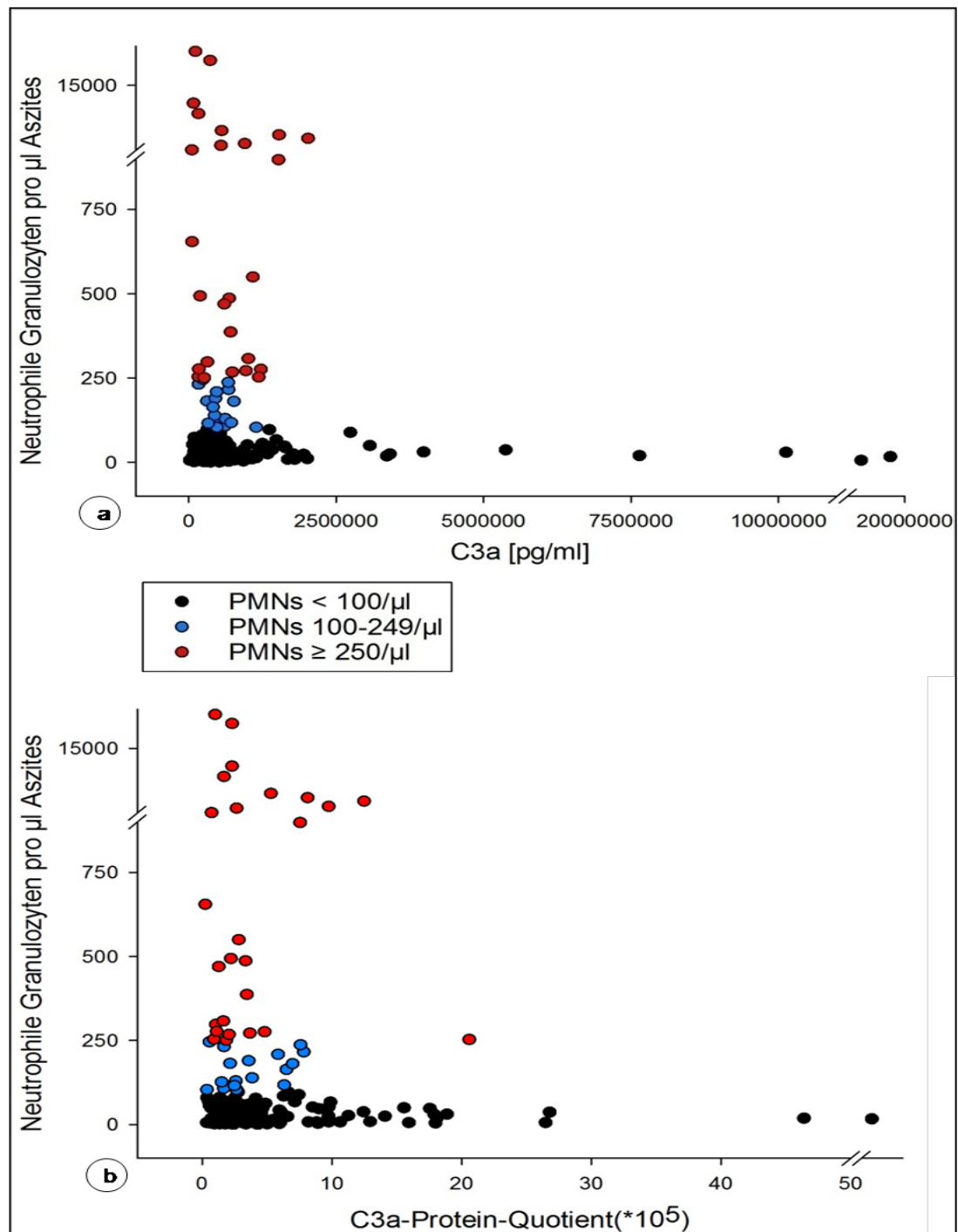


Abbildung 17: Reduktion der C3a-Konzentration sowie des C3a-Gesamtprotein-Quotienten bei einer SBP. Dargestellt sind auf der x-Achse die C3a-Konzentrationen in pg/ml [a] und die Quotienten berechnet aus der jeweiligen C3a-Konzentration und dem entsprechenden Gesamtproteingehalt der Aszitesprobe [b] gegenüber der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit (y-Achse). Die farbliche Markierung erfolgte entsprechend der Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit. Die rote Gruppe (PMNs ≥ 250 / μl Aszitesflüssigkeit) stellt die SBP-Kohorte dar. Die blaue (PMNs 100–249/ μl Aszitesflüssigkeit) und die schwarze Gruppe (PMNs < 100/ μl Aszitesflüssigkeit) präsentieren die Non-SBP-Proben. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der C3a-Konzentration im Krankheitsbild der SBP vorliegt. Die Berechnung des

3 ERGEBNISSE

C3a-Gesamtprotein-Quotienten lieferte in diesem Fall keinen relevanten Zugewinn hinsichtlich der Aussagekraft im Krankheitsbild der SBP. Weiterhin ist auffällig, dass die blaue Gruppe ein ähnliches inflammatorisches Verhalten wie die klassische SBP-Gruppe (rot) vorwies. Auch in der blauen Gruppe zeigte sich eine Verringerung der C3a-Konzentration sowie des C3a-Gesamtprotein-Quotienten. Ein eindeutiger Cut-off zwischen der SBP- und der Non-SBP-Kohorte konnte in dieser Analyse nicht festgelegt werden.

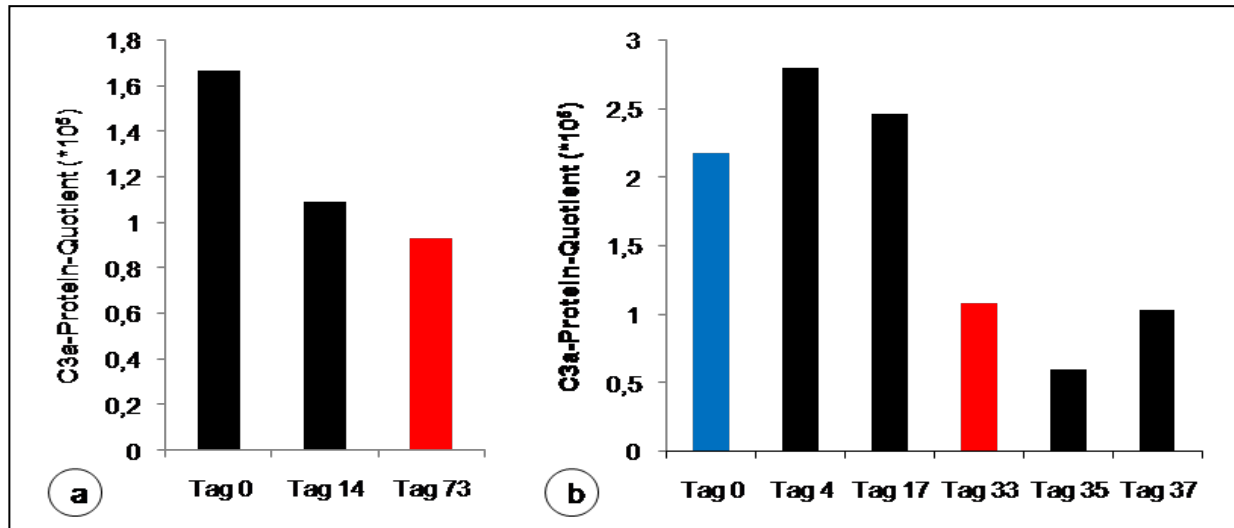


Abbildung 18: Der C3a-Gesamtprotein-Quotient erlaubt Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf einer SBP. Dargestellt sind zwei verschiedene Patienten (Patient 1 [a], Patient 2 [b]), bei denen mehrere Proben im Abstand von einigen Tagen analysiert wurden. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Punktionstage im zeitlichen Verlauf dargestellt, wobei Tag 0 den jeweiligen Tag der Erstpunktion kennzeichnet. Auf der y-Achse findet sich der C3a-Gesamtprotein-Quotient ($\times 10^5$) wieder. In [a] zeigen sich die Entwicklung einer SBP am Tag 73 (rot dargestellt) und die konsekutive Reduktion des individuellen C3a-Gesamtprotein-Quotienten. In [b] sind die Entwicklung (Tag 33, rot dargestellt) und die Genesung einer SBP sowie eine Erhöhung der Zellzahl ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (PMNs 100–249/ μ l Aszitesflüssigkeit; blau dargestellt) an Tag 0 dargestellt. Auch im Falle einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP zeigte sich der C3a-Gesamtprotein-Quotient verglichen mit der schwarzen Kohorte (PMNs $< 100/\mu$ l) reduziert. Weiterhin zeigte sich auch in [b] eine Reduktion im Falle einer SBP und ein Wiederanstieg des C3a-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer Ausheilung.

3.5 Lactoferrin-Konzentration ist bei einer spontan bakteriellen Peritonitis erhöht

Als weiterer potenzieller Biomarker im Krankheitsbild der SBP wurde Lactoferrin im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Lactoferrin ist ein eisenbindendes Protein aus der Familie der Transferrine. Man findet es in Milch, mukösem Sekret, gastrointestinalem Sekret, Speichel, Tränen, Sperma, vaginalem Sekret, nasaler Flüssigkeit und im bronchialen Mucus. Es ist als Biomarker bei inflammatorischen Darmerkrankungen

3 ERGEBNISSE

sowie beim kolorektalen Karzinom bekannt (123,124). Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit aufgeführt, wurde Lactoferrin schon in der Vergangenheit als potenzieller Biomarker für die Diagnostik einer SBP untersucht (123,125). Die analysierte Kohorte in unseren Untersuchungen hinsichtlich Lactoferrin umfasste insgesamt 178 Proben, wobei hiervon in 20 Proben die Kriterien für das Vorliegen einer SBP erfüllt waren. In dieser Arbeit zeigte sich analog zu den bereits aufgeführten externen Vorarbeiten eine Erhöhung der Lactoferrin-Konzentration im Falle einer SBP (Median (SBP): 831 ng/ml; Median (Non-SBP): 48 ng/ml) (vgl. Abb. 19). Der in dieser Arbeit gewählte Cut-off der Lactoferrin-Konzentration lag bei 308 ng/ml und zeigte hierfür eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 91 %. Des Weiteren führten wir eine Normierung auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Aszitesprobe mithilfe der Berechnung des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten durch. Auch hierbei zeigte sich eine Erhöhung des Quotienten im Falle einer SBP (vgl. Abb. 19). Der gewählte Cut-off für den Quotienten lag bei 20×10^{-6} und zeigte hierfür eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 92 %. Eine Korrelation konnte weder zwischen der Lactoferrin-Konzentration und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $r = 0,01$) noch zwischen dem Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $r = 0,01$) festgestellt werden. Weiterhin zeigten auch in dieser Untersuchung Proben mit erhöhter Zellzahl, die jedoch definitionsgemäß nicht den Kriterien einer SBP entsprechen (vgl. blaue Gruppe Abb. 19), ein mit der klassischen SBP-Kohorte vergleichbares inflammatorisches Verhalten. Schließt man die blaue Kohorte in die SBP-Kohorte mit ein, konnte eine Sensitivität von 75 % und eine Spezifität von 96 % für den Cut-off von 308 ng/ml berechnet werden. Im Rahmen der Analyse der Folge- oder Verlaufspunktionen zeigte sich eine Erhöhung des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer SBP verglichen mit den Aszitesproben des jeweils gleichen Patienten ohne vorliegende SBP. Von klinischer Relevanz ist unser Ergebnis, dass auch bei erhöhter Anzahl der Neutrophilen ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (vgl. intermediäre Gruppe (blau eingefärbt)) eine Erhöhung des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten verglichen mit Aszitesflüssigkeit des gleichen Patienten mit einer Neutrophilenanzahl von < 100 pro μl Aszitesflüssigkeit vorlag. Diese Ergebnisse lassen somit Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf bzw. die Entwicklung und das therapeutische Ansprechen einer SBP zu (vgl. Abb. 20).

3 ERGEBNISSE

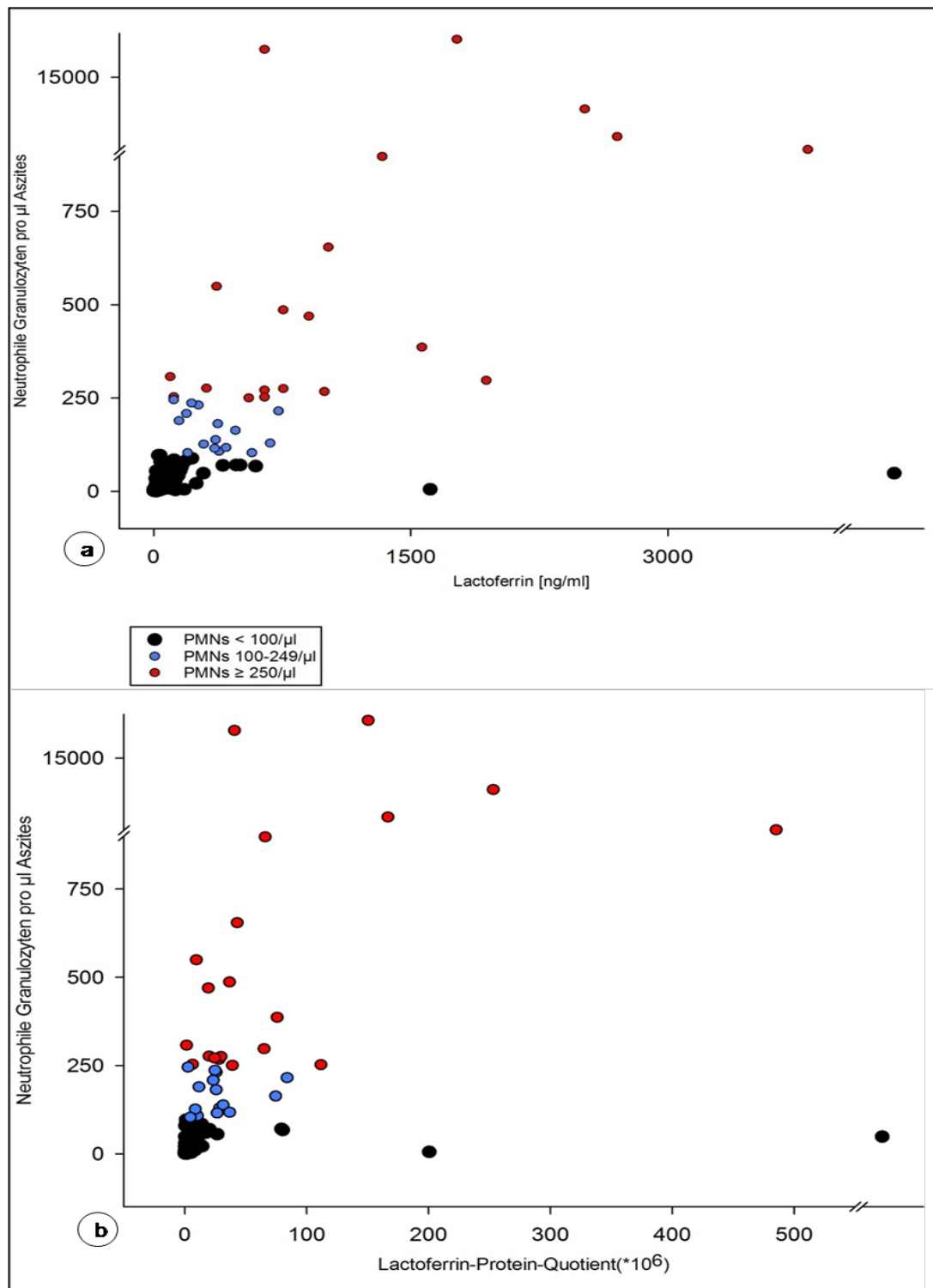


Abbildung 19: Erhöhung der Lactoferrin-Konzentration und des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten bei einer SBP. Dargestellt sind auf der x-Achse die Lactoferrin-Konzentrationen in ng/ml [a] und die Quotienten berechnet aus der jeweiligen Lactoferrin-Konzentration und dem entsprechenden Gesamtproteingehalt der Aszitesprobe [b] gegenüber der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro µl Aszitesflüssigkeit (y-Achse). Die farbliche Markierung erfolgte entsprechend der Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro µl Aszitesflüssigkeit. Die rote Gruppe (PMNs ≥ 250/µl Aszitesflüssigkeit) stellt die SBP-Kohorte dar. Die blaue (PMNs 100–249/µl Aszitesflüssigkeit) und die

3 ERGEBNISSE

schwarze Gruppe (PMNs < 100/μl Aszitesflüssigkeit) präsentieren die Non-SBP-Proben. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Erhöhung der Lactoferrin-Konzentration wie auch eine Erhöhung des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten im Krankheitsbild der SBP vorliegen. Die Berechnung des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten lieferte in diesem Fall keinen relevanten Zugewinn hinsichtlich der Aussagekraft im Krankheitsbild der SBP. Weiterhin zeigte die blaue Gruppe ein zu der klassischen SBP-Kohorte (rote Gruppe) ähnliches inflammatorisches Verhalten. Auch in der blauen Gruppe zeigte sich eine Erhöhung insbesondere der Lactoferrin-Konzentration (weniger ausgeprägt im Falle des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten). Der Cut-off wurde in [a] bei einer Konzentration von 308 ng/ml und in [b] bei 20×10^{-6} gewählt.

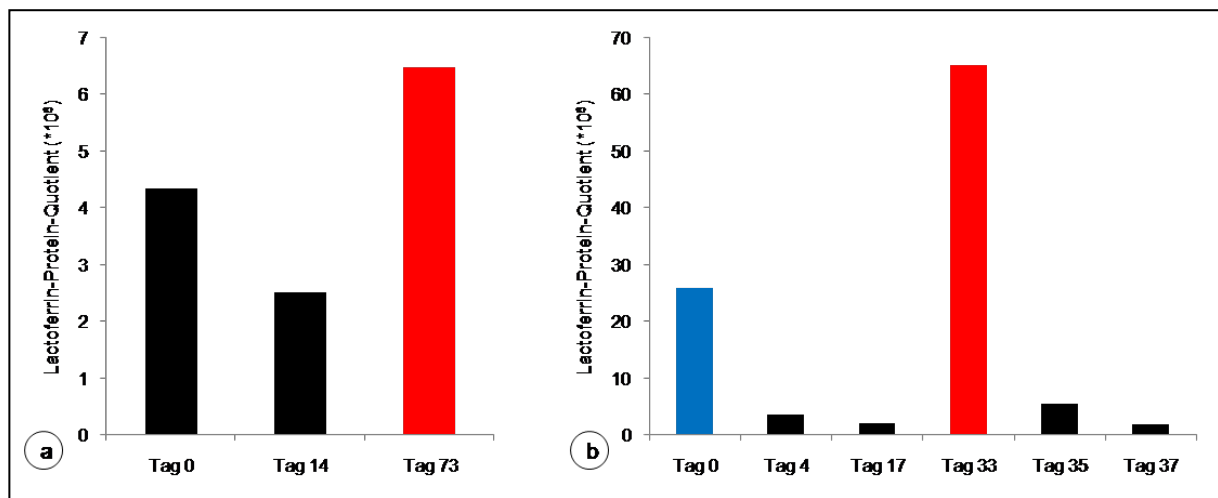


Abbildung 20: Der Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotient lässt Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf einer SBP zu. Dargestellt sind zwei verschiedene Patienten (Patient 1 [a], Patient 2 [b]), bei denen mehrere Proben im Abstand von einigen Tagen analysiert wurden. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Punktionstage im zeitlichen Verlauf dargestellt, wobei Tag 0 den jeweiligen Tag der Erstpunktion kennzeichnet. Auf der y-Achse findet sich der Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotient ($\times 10^5$) wieder. In [a] zeigen sich die Entwicklung einer SBP am Tag 73 (rot dargestellt) und die konsekutive Erhöhung des individuellen Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten. In [b] sind die Entwicklung (Tag 33, rot dargestellt) und die Genesung einer SBP sowie eine Erhöhung der Zellzahl ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (PMNs 100–249/μl Aszitesflüssigkeit; blau dargestellt) am Tag 0 dargestellt. Auch im Falle einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP zeigte sich der Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotient verglichen mit der schwarzen Kohorte (PMNs < 100/μl) erhöht. Weiterhin zeigte sich auch in [b] eine Erhöhung im Falle einer SBP und eine Reduktion des Lactoferrin-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer Ausheilung.

3.6 Erhöhung der Calprotectin-Konzentration bei spontan bakterieller Peritonitis und Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf

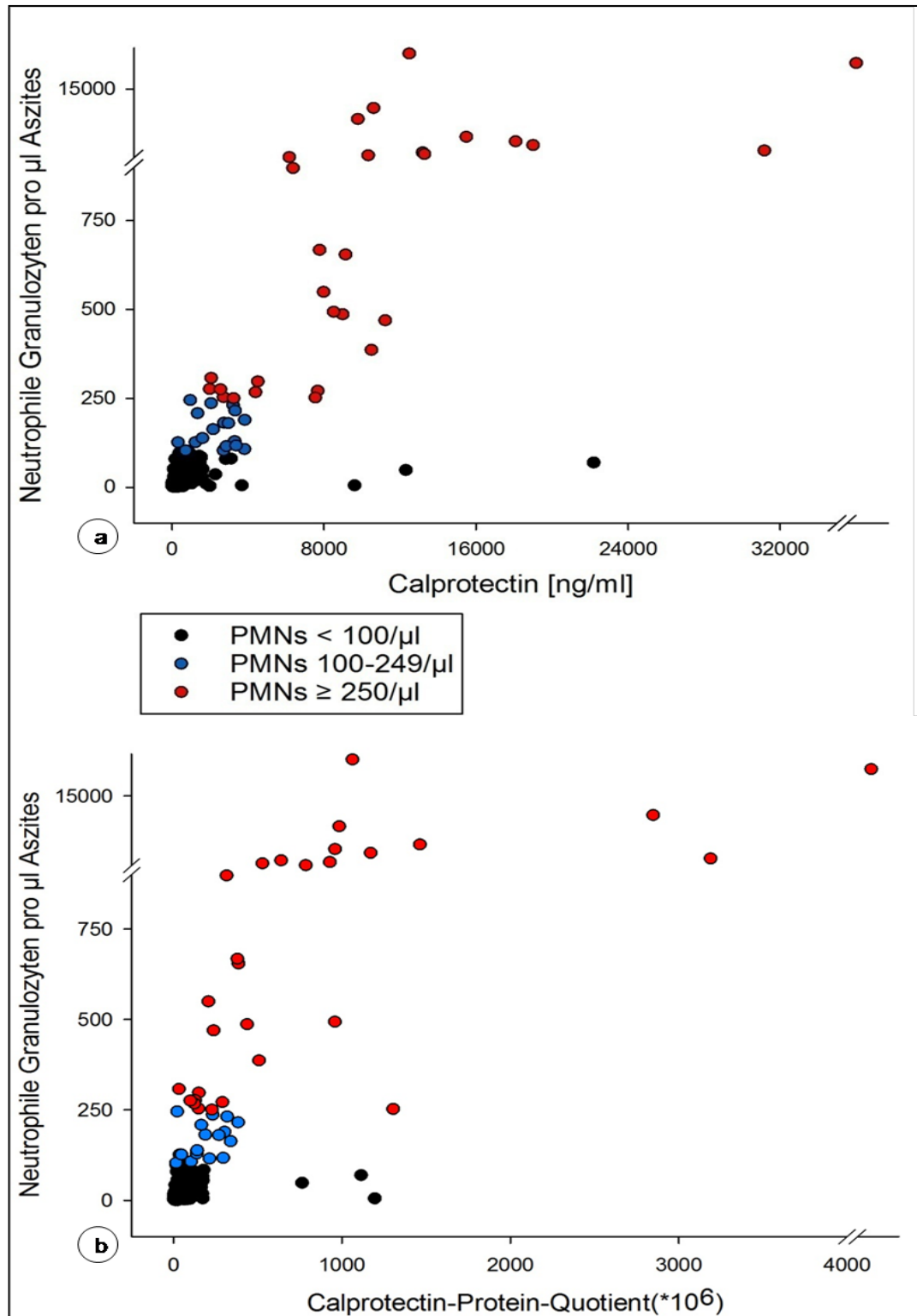
Calprotectin ist ein calcium- und zinkbindendes Protein aus der S100-Familie. Mitglieder dieser Familie werden bei inflammatorischen Geschehen aus Phagozyten

3 ERGEBNISSE

ausgeschüttet. Calprotectin ist hierbei vor allem in neutrophilen Granulozyten nachweisbar und kann auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (114). Wie in der Einleitung dieser Arbeit thematisiert, wurde auch Calprotectin bereits als potenzieller Biomarker im Krankheitsbild der SBP untersucht (119–122). Insgesamt wurden in dieser Arbeit 190 Proben hinsichtlich des Calprotectin-Gehaltes analysiert, hiervon konnte in 29 Fällen die Diagnose einer SBP gestellt werden. Auch in unseren Analysen präsentierte sich im Vergleich zu den Ergebnissen aus den bereits genannten externen Vorarbeiten analog eine Erhöhung des Calprotectin-Spiegels im Krankheitsbild der SBP (Median (SBP): 8999 ng/ml; Median (Non-SBP): 539 ng/ml) (vgl. Abb. 21). Der in dieser Arbeit gewählte Cut-off der Calprotectin-Konzentration lag bei 4410 ng/ml und zeigte hierfür eine Sensitivität von 83 % und eine Spezifität von 98 %. Des Weiteren führten wir eine Normierung auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Aszitesprobe durch Berechnung des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten durch. Auch hierbei zeigte sich eine Erhöhung des Quotienten im Falle einer SBP (vgl. Abb. 21). Der gewählte Cut-off für den Quotienten lag bei 208×10^{-6} und zeigte hierfür eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 93 %. Eine deutliche Korrelation konnte sowohl zwischen der Calprotectin-Konzentration und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $r = 0,7$) als auch zwischen dem Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $r = 0,7$) festgestellt werden. Weiterhin zeigten auch in dieser Untersuchung Proben mit erhöhter Zellzahl, die jedoch definitionsgemäß nicht den Kriterien einer SBP entsprechen (vgl. blaue Gruppe Abb. 21), ein mit der klassischen SBP-Kohorte vergleichbares inflammatorisches Verhalten. Schließt man die blaue Kohorte in die SBP-Kohorte mit ein, wurde eine Sensitivität von 51 % und eine Spezifität von 98 % für den Cut-off von 4410 ng/ml berechnet. Wird die blaue Kohorte in die Analyse des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten mit einberechnet, ergab sich für den Cut-off von 208×10^{-6} eine Sensitivität von 66 % und eine Spezifität von 98 %. Im Rahmen der Analyse der Folge- oder Verlaufspunktionen zeigte sich eine Erhöhung des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer SBP verglichen mit den Aszitesproben des jeweils gleichen Patienten ohne vorliegende SBP. Auffällig ist zudem, dass auch bei erhöhter Anzahl der Neutrophilen ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (vgl. intermediäre Gruppe (blau eingefärbt)) eine Erhöhung des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten verglichen mit

3 ERGEBNISSE

Aszitesflüssigkeit des gleichen Patienten mit einer Neutrophilenanzahl von < 100 pro μl Aszitesflüssigkeit vorlag. Diese Ergebnisse lassen erste tendenzielle Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf bzw. die Entwicklung und das therapeutische Ansprechen einer SBP zu (vgl. Abb. 22).



3 ERGEBNISSE

Abbildung 21: Erhöhung der Calprotectin-Konzentration und des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer SBP. Dargestellt sind auf der x-Achse die Calprotectin-Konzentrationen in ng/ml [a] und die Quotienten berechnet aus der jeweiligen Calprotectin-Konzentration und dem entsprechenden Gesamtproteingehalt der Aszitesprobe [b] gegenüber der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit (y-Achse). Die farbliche Markierung erfolgte entsprechend der Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit. Die rote Gruppe (PMNs $\geq 250/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) stellt die SBP-Kohorte dar. Die blaue (PMNs 100–249/ μl Aszitesflüssigkeit) und die schwarze Gruppe (PMNs $< 100/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) präsentieren die Non-SBP-Proben. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Calprotectin-Konzentration sowie des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten im Krankheitsbild der SBP vorliegt. Weiterhin zeigte die blaue Gruppe ein zu der klassischen SBP-Kohorte (rote Gruppe) ähnliches inflammatorisches Verhalten. Auch in der blauen Gruppe präsentierten sich eine Erhöhung und optische Separation zu der schwarzen Kohorte. Der Cut-off wurde in [a] bei einer Konzentration von 4410 ng/ml und in [b] bei 208×10^{-6} gewählt.

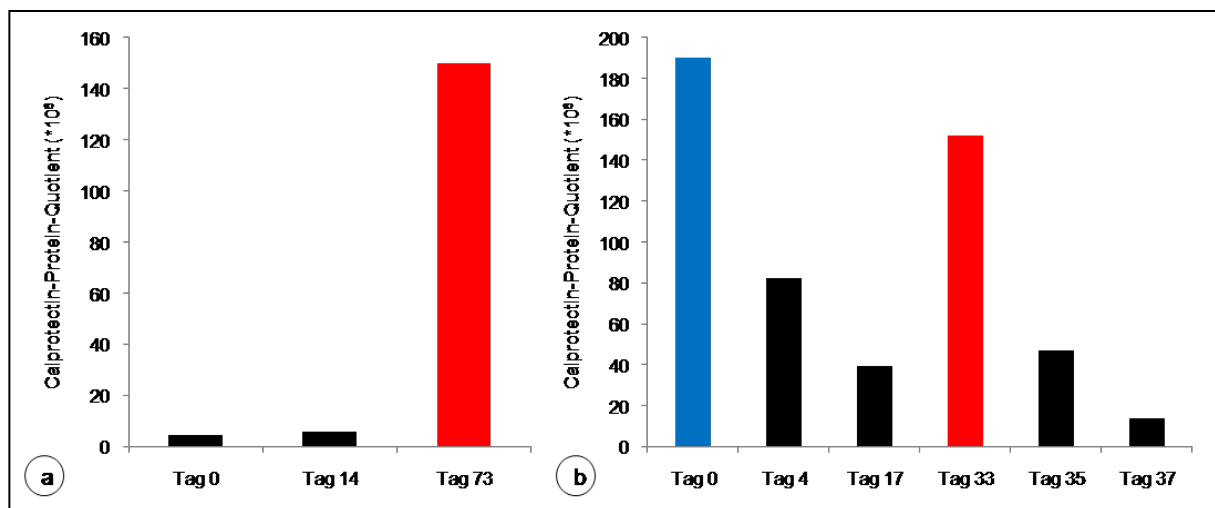


Abbildung 22: Der Calprotectin-Gesamtprotein-Quotient lässt Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf einer SBP zu. Dargestellt sind zwei verschiedene Patienten (Patient 1 [a], Patient 2 [b]), bei denen mehrere Proben im Abstand von einigen Tagen analysiert wurden. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Punktionstage im zeitlichen Verlauf dargestellt, wobei Tag 0 den jeweiligen Tag der Erstpunktion kennzeichnet. Auf der y-Achse findet sich der Calprotectin-Gesamtprotein-Quotient ($\times 10^6$) wieder. In [a] zeigen sich die Entwicklung einer SBP am Tag 73 (rot dargestellt) und die konsequente Erhöhung des individuellen Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten. In [b] sind die Entwicklung (Tag 33, rot dargestellt) und die Genesung einer SBP sowie eine Erhöhung der Zellzahl ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (PMNs 100–249/ μl Aszitesflüssigkeit; blau dargestellt) am Tag 0 dargestellt. Auch im Falle einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP zeigte sich der Calprotectin-Gesamtprotein-Quotient verglichen mit der schwarzen Kohorte (PMNs $< 100/\mu\text{l}$) erhöht. Weiterhin zeigte sich auch in [b] eine

3 ERGEBNISSE

Erhöhung im Falle einer SBP und eine Reduktion des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer Ausheilung.

3.7 S100a12 als potenzieller Biomarker zur Diagnostik und Beurteilung des Krankheitsverlaufes bei spontan bakterieller Peritonitis

Als neuer potenzieller Biomarker im Krankheitsbild einer SBP wurde außerdem S100a12 untersucht. Das Protein S100a12 gehört zu der S100-Familie, zu der auch Calprotectin gehört. In der Gruppe ist es ein Mitglied der Unterfamilie der Calgranuline und spielt eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen – intra- und auch extrazellulär. So sind eine antimikrobielle und eine antimykotische Wirkung sowie eine proinflammatorische Wirkung an Endothelzellen und Immunzellen und die Induktion von Apoptose beschrieben. Es ist ebenso ein kaliumbindendes Protein, welches unter anderem eine hohe Affinität zu Zink aufweist. Vorhanden ist es in neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie T-Zellen. Außerdem wird auch eine Sekretion durch nekrotische Zellen diskutiert. (124) Eine Erhöhung von S100a12 konnte in einigen Untersuchungen bereits bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, der rheumatoiden Arthritis sowie der zystischen Fibrose in diversen Körperflüssigkeiten gezeigt werden (124). Diese hier vorgestellte Arbeit stellt die Erstbeschreibung der Analyse von S100a12 in Aszitesflüssigkeit dar. Insgesamt wurden 190 Proben hinsichtlich der S100a12-Konzentration analysiert, hiervon konnte in 29 Fällen die Diagnose einer SBP gestellt werden. In unseren Untersuchungen zeigte sich eine Erhöhung des S100a12-Spiegels im Krankheitsbild der SBP (Median (SBP): 244,356 ng/ml; Median (Non-SBP): 7,385 ng/ml) (vgl. Abb. 23). Der in dieser Arbeit gewählte Cut-off der S100a12-Konzentration lag bei 66,8 ng/ml und zeigte hierfür eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 95 %. Des Weiteren führten wir eine Normierung auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Aszitesprobe durch Berechnung des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten durch. Auch hierbei zeigte sich eine Erhöhung des Quotienten im Falle einer SBP (vgl. Abb. 23). Der gewählte Cut-off für den Quotienten lag bei 300×10^{-8} und zeigte hierfür eine Sensitivität von 76 % und eine Spezifität von 89 %. Eine Korrelation konnte sowohl zwischen der S100a12-Konzentration und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $r = 0,6$) als auch zwischen dem S100a12-Gesamtprotein-Quotienten und der Anzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit (Korrelationskoeffizient $r = 0,5$) festgestellt werden. Weiterhin zeigten auch in dieser Untersuchung Proben mit erhöhter Zellzahl, die jedoch

3 ERGEBNISSE

definitionsgemäß nicht den Kriterien einer SBP entsprechen (vgl. blaue Gruppe Abb. 23), ein mit der klassischen SBP-Kohorte vergleichbares inflammatorisches Verhalten. Schließt man die blaue Kohorte in die SBP-Kohorte mit ein, wurde eine Sensitivität von 68 % und eine Spezifität von 99 % für den Cut-off von 66,8 ng/ml berechnet. Wird die blaue Kohorte in die Analyse des Calprotectin-Gesamtprotein-Quotienten mit einberechnet, ergab sich für den Cut-off von 300×10^{-8} eine Sensitivität von 64 % und eine Spezifität von 93 %. In Rahmen der Analyse der Folge- oder Verlaufspunktionen zeigte sich eine Erhöhung des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer SBP verglichen mit den Aszitesproben des jeweils gleichen Patienten ohne vorliegende SBP. Auffällig ist zudem, dass auch bei erhöhter Anzahl der Neutrophilen ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (vgl. intermediäre Gruppe (blau eingefärbt)) eine Erhöhung des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten verglichen mit Aszitesflüssigkeit des gleichen Patienten mit einer Neutrophilenanzahl von < 100 pro μl Aszitesflüssigkeit vorlag. Diese Ergebnisse lassen erste tendenzielle Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf bzw. die Entwicklung und das therapeutische Ansprechen einer SBP zu (vgl. Abb. 24).

3 ERGEBNISSE

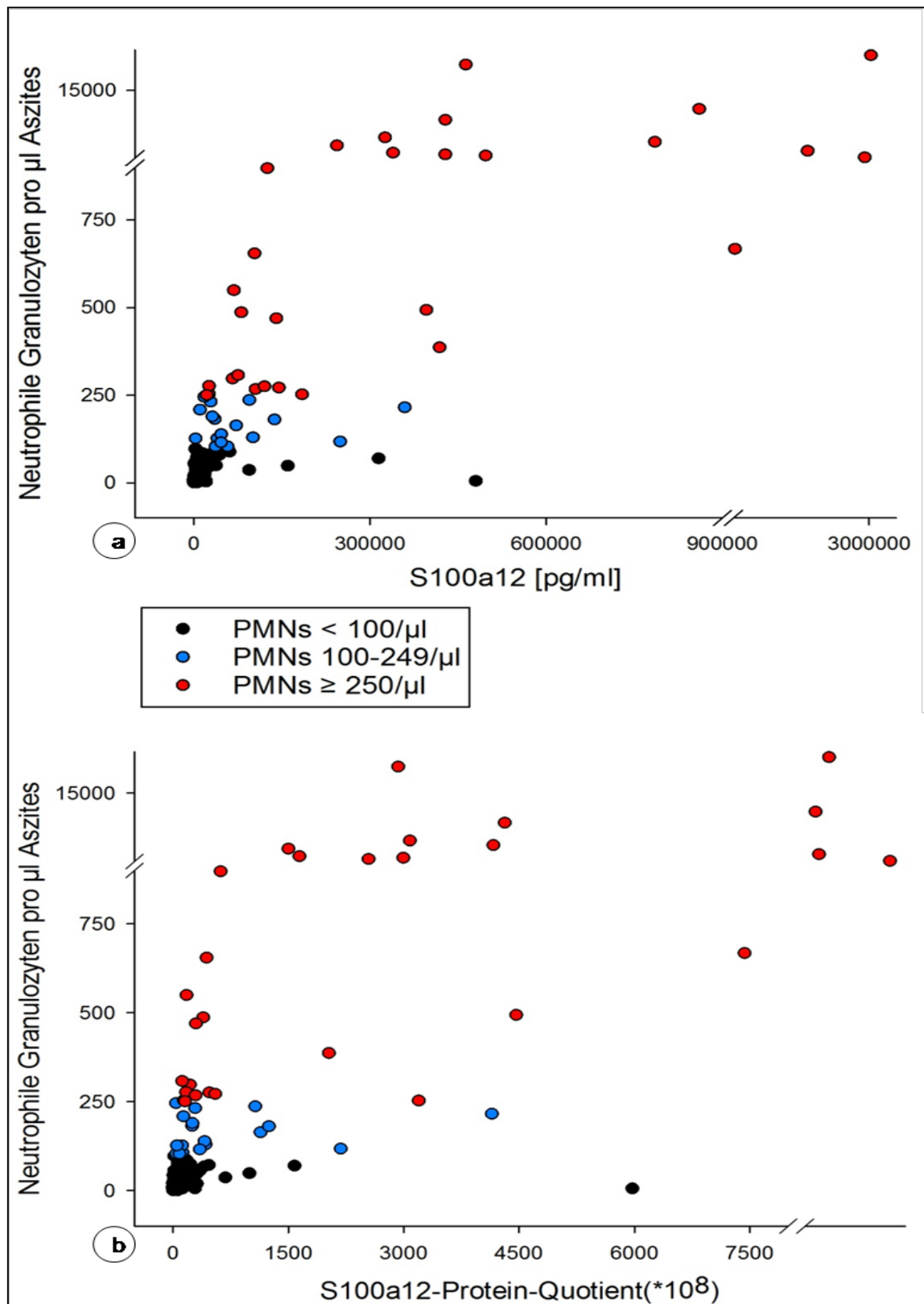


Abbildung 23: Erhöhung der S100a12-Konzentration und des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer SBP. Dargestellt sind auf der x-Achse die S100a12-Konzentrationen in pg/ml [a] und die Quotienten berechnet aus der jeweiligen S100a12-Konzentration und dem entsprechenden Gesamtproteingehalt der Aszitesprobe [b] gegenüber der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro µl Aszitesflüssigkeit (y-Achse). Die farbliche Markierung erfolgte entsprechend der

3 ERGEBNISSE

Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit. Die rote Gruppe (PMNs $\geq 250/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) stellt die SBP-Kohorte dar. Die blaue (PMNs $100\text{--}249/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) und die schwarze Gruppe (PMNs $< 100/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) präsentieren die Non-SBP-Proben. In den Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der S100a12-Konzentration sowie des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten im Krankheitsbild der SBP vorliegt. Die Berechnung des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten lieferte in diesem Fall keinen relevanten Zugewinn hinsichtlich der Aussagekraft im Krankheitsbild der SBP. Weiterhin zeigte die blaue Gruppe ein zu der klassischen SBP-Kohorte (rote Gruppe) ähnliches inflammatorisches Verhalten. Auch in der blauen Gruppe zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung insbesondere der S100a12-Konzentration (weniger ausgeprägt im Falle des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten). Der Cut-off wurde in [a] bei einer Konzentration von $66,8 \text{ ng/ml}$ und in [b] bei 300×10^{-8} gewählt.

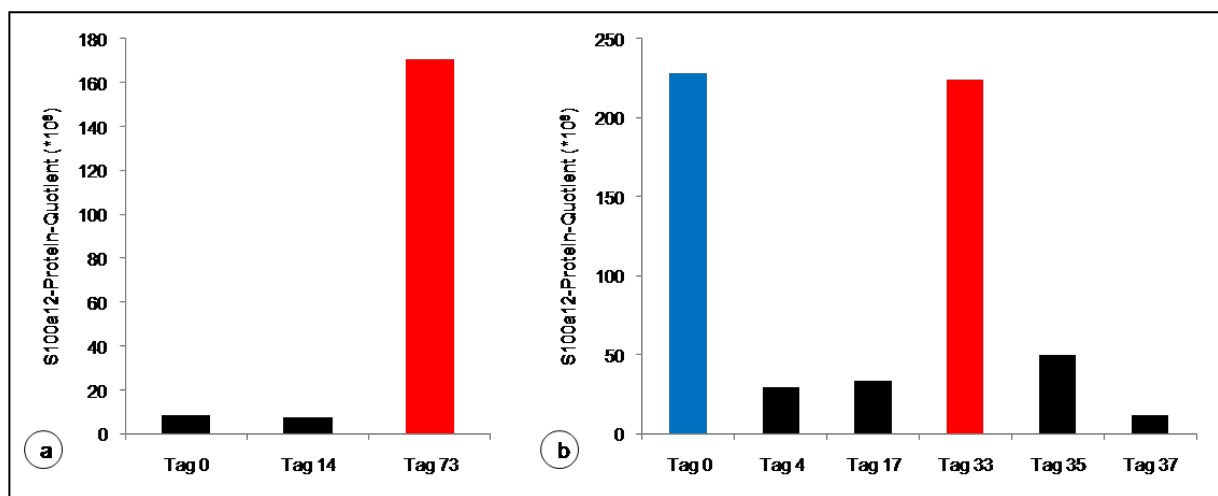


Abbildung 24: Der S100a12-Gesamtprotein-Quotient lässt Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf einer SBP zu. Dargestellt sind zwei verschiedene Patienten (Patient 1 [a], Patient 2 [b]), bei denen mehrere Proben im Abstand von einigen Tagen analysiert wurden. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Punktionstage im zeitlichen Verlauf dargestellt, wobei Tag 0 den jeweiligen Tag der Erstpunktion kennzeichnet. Auf der y-Achse findet sich der S100a12-Gesamtprotein-Quotient ($\times 10^8$) wieder. In [a] zeigen sich die Entwicklung einer SBP am Tag 73 (rot dargestellt) und die konsekutive Erhöhung des individuellen S100a12-Gesamtprotein-Quotienten. In [b] sind die Entwicklung (Tag 33, rot dargestellt) und die Ausheilung einer SBP sowie eine Erhöhung der Zellzahl ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP (PMNs $100\text{--}249/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit; blau dargestellt) am Tag 0 dargestellt. Auch im Falle einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten ohne definitionsgemäßes Vorliegen einer SBP zeigte sich der S100a12-Gesamtprotein-Quotient verglichen mit der schwarzen Kohorte (PMNs $< 100/\mu\text{l}$) erhöht. Weiterhin zeigte sich auch in [b] eine Erhöhung im Falle einer SBP und eine Reduktion des S100a12-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer Ausheilung.

4 DISKUSSION

Auch in der modernen Medizin stellt die Leberzirrhose mit ihren Komplikationen eine Herausforderung für medizinisches Personal dar. Insbesondere die SBP ist mit der in der Literatur beschriebenen 1-Jahres-Mortalität von bis zu 93 % ein sehr ernst zunehmendes Krankheitsbild (22). Auch in der High-End-Medizin und viele Jahrzehnte nach Entdeckung von Antibiotika ist die Therapie der SBP oftmals ein Wettlauf gegen die Zeit. Nicht zuletzt aus diesem Grund ist die SBP in den Fokus der hepatologischen und infektiologischen Forschung gerückt. Sowohl die Analyse der zugrundeliegenden Pathomechanismen als auch die Suche nach neuen Biomarkern zur früheren und besseren Diagnostik einer SBP sind von großer Bedeutung.

So wurde bereits seit einigen Jahren nach möglichen Alternativen im Bereich der diagnostischen Biomarker gesucht, die einfach in der Handhabung, schnell verfügbar und vor allem aussagekräftig sind. Möglichkeiten, die besonders einfach und schnell sind, wurden beispielsweise durch den Gebrauch von Urinteststreifen untersucht (109–113). Aufgrund der geringen Aussagekraft und der daraus resultierenden Ungenauigkeit wird jedoch empfohlen, von der Diagnosestellung einer SBP mittels Urinteststreifen abzusehen (22). Eine besonders komplexe Nachweismethode wurde durch die PCR-Analyse als Ersatz für die Anzucht und zur besseren Abstimmung der antibiotischen Therapie untersucht (128–131). Auch dieses Analyseverfahren wird aufgrund der Unzuverlässigkeit und des großen Aufwandes nicht empfohlen (22). Eine weitere Alternative neben dem Nachweis von Leukozyten (vgl. Urinteststreifen) oder dem Nachweis von Bakterien oder deren Bestandteilen (vgl. PCR-Analyse) stellt die Untersuchung der inflammatorischen Aktivität in Aszitesflüssigkeiten mittels des Nachweises spezifischer Entzündungsparameter dar. Hierzu wurden in den vergangenen Jahren bereits Calprotectin (119–122) und Lactoferrin (123,125) als neue potenzielle Biomarker analysiert und diese zeigten in externen Studien vielversprechende Ergebnisse.

In dieser Arbeit erfolgte die Analyse potenzieller Biomarker über die Untersuchung der entzündlichen Aktivität des Aszites. Hierzu wurden mittels ELISA-Analysen 8 verschiedene Entzündungsmarker auf ihre Sensitivität und Spezifität als Biomarker im Krankheitsbild der SBP untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Aszitesflüssigkeit,

4 DISKUSSION

obwohl ein Nachweis von Bakterien oftmals nicht gelingt, eine enorme entzündliche Aktivität aufweist. Wir konnten nachweisen, dass IL-6, IL-8 und IP-10 zwar jeweils in relevanten Mengen in der Aszitesflüssigkeit zu finden sind, jedoch nicht mit den Diagnosekriterien oder dem Krankheitsverlauf der SBP korrelieren. Die IL-10-Konzentration (Korrelationskoeffizient $r = 0,6$) sowie der IL-10-Gesamtprotein-Quotient (Korrelationskoeffizient $r = 0,6$) zeigten zwar eine statistische Korrelation mit der Zellzahl der Neutrophilen in der Aszitesflüssigkeit, jedoch konnte kein geeigneter Cut-off hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität gewählt werden. Folglich sind die genannten Interleukine nicht als Biomarker zur Diagnose einer SBP geeignet.

Bei der Analyse der C3a-Konzentration in der Aszitesflüssigkeit zeigte sich eine Reduktion der Konzentration sowie des C3a-Gesamtprotein-Quotienten im Falle einer SBP. Ebenso lassen sich Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf und die Ausheilung beobachten, welche von hoher klinischer Relevanz sind. Eine deutliche Separation der SBP-Kohorte und der Non-SBP-Kohorte, die zur Festlegung eines Cut-offs unumgänglich ist, konnte in dieser Arbeit nicht dargestellt werden.

In Übereinstimmung mit den publizierten Studien zeigten sich auch in unseren Analysen von Lactoferrin und Calprotectin vergleichbar gute Ergebnisse. Im Falle von Calprotectin konnte eine statistische Korrelation mit den Diagnosekriterien im Falle einer SBP gezeigt werden. Zudem ließen sich sowohl durch die Bestimmung von Calprotectin als auch durch die Bestimmung von Lactoferrin Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf im Falle einer SBP ziehen. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte auch sowohl für Lactoferrin als auch für Calprotectin ein Cut-off im Hinblick auf eine frühe Diagnosestellung einer SBP gesetzt werden. Insbesondere der Verlauf der beiden Entzündungsmarker im Rahmen von Folgeuntersuchungen bei gleichen Probanden und die damit verbundenen möglichen Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf und folglich auch auf das Therapieansprechen bringen einen klinisch relevanten zusätzlichen Informationsgewinn. Als neue Biomarker im Krankheitsbild der SBP sind diese beiden Marker somit gut geeignet und ergänzen die etablierte Diagnostik.

S100a12 wurde durch diese Arbeit das erste Mal in der Aszitesflüssigkeit beschrieben und zeigte eine hohe Sensitivität und Spezifität zur Diagnostik einer SBP. Besonders hervorzuheben ist auch hier die Aussagekraft hinsichtlich der Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf, das Therapieansprechens und die

4 DISKUSSION

Ausheilung einer SBP, welche sich aus der Analyse von Folgepunktionen bei gleichen Probanden im zeitlichen Verlauf gewinnen lassen. Durch die hier dargestellten Untersuchungen wird mit S100a12 nicht nur ein mögliches neues diagnostisches Werkzeug mit klinischer Relevanz, sondern zudem ein Parameter zur Analyse des Krankheitsverlaufes etabliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit, mit Calprotectin, Lactoferrin und mit der Erstbeschreibung von S100a12 in der Aszitesflüssigkeit, drei potenzielle Biomarker zur Diagnosestellung im Krankheitsbild der SBP identifiziert und charakterisiert werden. Insbesondere muss nun weiter evaluiert werden, ob ggf. durch eine Kombination aus verschiedenen Entzündungsmarkern eine Optimierung der Diagnosestellung und Prognoseabschätzung erreicht werden kann. Hierzu sind weitere Untersuchungen und klinische Studien notwendig.

In unseren Untersuchungen zeigen wir nicht nur eine Korrelation der individuellen Biomarker mit den Diagnosekriterien einer SBP, sondern auch die Möglichkeit, Rückschlüsse auf den jeweiligen Krankheitsverlauf und somit auf ein Therapieansprechen, eine Therapieresistenz oder eine Ausheilung zu ziehen. So konnte dargestellt werden, dass die Konzentrationen sowohl von Calprotectin als auch von Lactoferrin und S100a12 bei Entwicklung einer SBP ansteigen und sich beim Abklingen der Infektion regredient zeigen. Somit eignen sich Calprotectin, Lactoferrin und auch S100a12 nicht nur zur Diagnosestellung, sondern auch zur Beurteilung des therapeutischen Ansprechens. Resultierend können im klinischen Alltag eventuell unwirksame antibiotische Therapien durch Verlaufsanalysen als solche erkannt und frühzeitig auf andere antibiotische Therapeutika eskaliert werden.

Der Zugewinn an Informationen aus den hier erhobenen Daten beschränkt sich folglich nicht nur auf die Diagnostik, sondern hat vielmehr auch das Potenzial zur Prognose des klinischen Verlaufes und des Therapieansprechens. Zur tatsächlichen Abschätzung der Aussagekraft müssen weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben erfolgen. Die hier erhobenen Ergebnisse stimmen jedoch sehr zuversichtlich.

Natürlich ist eine ELISA-Analyse nicht überall, insbesondere in der ambulanten Versorgung, verfügbar. Hier müssen vor allem schnelle und in der Handhabung einfache Testungen erfolgen. Für die Analyse von Calprotectin im Stuhl bei

4 DISKUSSION

chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurden bereits Bedside-Tests, teilweise sogar in Kombination mit einer App für ein Smartphone, entwickelt (115,117,118). Hierdurch liegt das Ergebnis der Konzentration der inflammatorischen Marker innerhalb weniger Minuten vor. Die Invention eines Bedside-Tests für die Diagnostik und Beurteilung des Krankheitsverlaufes einer SBP stellt nicht nur für die medizinische Versorgung im ambulanten Sektor, sondern auch für stationäre Patienten eine enorme Erleichterung dar. Insbesondere auf gastroenterologischen Intensiv- oder Normalstationen kann so kostbare Zeit, die die Dauer der Diagnostik aktuell benötigt, eingespart werden und eine frühzeitige Therapie oder Anpassung der Therapie erfolgen. Zur Entwicklung eines solchen Testkits auf der Basis der Erkenntnisse dieser Arbeit besteht bereits eine Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim.

Wie bereits beschrieben, konnte durch diese Arbeit eine entzündliche Aktivität in der Aszitesflüssigkeit nachgewiesen werden. Im Rahmen unserer Untersuchung wurden auch Folgepunktionen von verschiedenen Patienten in unterschiedlichen zeitlichen Abständen durchgeführt. Auf der Basis der erhobenen Daten konnte bei Folgepunktionen teilweise ein Anstieg der inflammatorischen Aktivität ohne Erhöhung der neutrophilen Granulozyten auf mehr als 250 pro μl Aszitesflüssigkeit nachgewiesen werden. Aufgrund klinischer und laborchemischer Verlaufsuntersuchungen konnte eruiert werden, dass die neutrophilen Granulozyten in Verlaufspunktionen von rund 90% der Patienten mit erhöhter inflammatorischer Aktivität in der Aszitesflüssigkeit und einer Zellzahl von 100–249 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit ansteigen. 67 % dieser genannten Gruppe entwickeln in Verlaufspunktionen sogar eine SBP. Die entzündliche Aktivität ist somit noch vor der Zellzahlerhöhung in der Aszitesflüssigkeit nachweisbar. Eine Diagnosestellung und antibiotische Therapie sind mit diesen Analysen folglich frühzeitiger möglich, als es mit den bisher gültigen Diagnosekriterien der Fall ist.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist zu diskutieren, ob eine Herabsetzung des diagnostischen Kriteriums der Anzahl der neutrophilen Granulozyten auf einen Wert unter 250 pro μl Aszitesflüssigkeit sinnvoll ist. Zwar lässt das Follow-up in dieser Arbeit mit 9 Folgepunktionen lediglich orientierende Aussagen und keine statistischen Berechnungen zu, jedoch gibt es einen Anhaltspunkt, dass eine Infektion der Aszitesflüssigkeit bei inflammatorischer Aktivität auch bereits unterhalb

4 DISKUSSION

des Cut-offs von 250 PMNs pro μl Aszitesflüssigkeit stattfindet. Zur weiteren Analyse, insbesondere dieser Population (PMNs 100–249/ μl), führen wir weitere Untersuchungen insbesondere mit Folgepunktionen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung durch.

Sicherlich sind angesichts der hohen 1-Jahres-Mortalität der SBP die Grenzen der Diagnostik noch nicht erreicht. Ob eine Reduktion der Mortalität durch die Therapie einer Infektion bereits vor Erreichen des diagnostischen Goldstandards der neutrophilen Granulozyten anhand einzelner Biomarker oder auch der Kombination aus verschiedenen Biomarkern erfolgen kann, muss durch weitere klinische Studien analysiert werden. Umso mehr bleiben die klinische Relevanz sowie die Notwendigkeit neuer Biomarker, insbesondere in der modernen Medizin, unumstritten. Neue Biomarker sind nicht nur aufgrund von Forschungsaspekten per se interessant, sondern insbesondere auch durch ihre unmittelbare klinische Relevanz. Durch verschiedene Messsysteme ist eine unmittelbare Analyse und Bewertung im klinischen Alltag denkbar. Mit der Einführung neuer, zuverlässiger Biomarker kann ein weiterer Grundstein in Richtung individualisierter Medizin und Therapie gelegt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die SBP stellt eine schwere Komplikation bei Patienten mit einer Leberzirrhose dar. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind bis heute nicht abschließend geklärt. Aufgrund der nach wie vor hohen 1-Jahres-Mortalität der SBP sind neue Biomarker zur früheren Diagnosestellung von großer klinischer Bedeutung.

In unserer Untersuchung wurden 190 Aszitesflüssigkeitsproben von insgesamt 128 Patienten mittels ELISA und BCA-Assay analysiert. Die Diagnose einer SBP (PMNs $\geq 250/\mu\text{l}$ Aszitesflüssigkeit) konnte in 29 Proben gestellt werden. Ein klinisch sehr relevantes Ergebnis unserer Studie ist unser Befund, dass eine entzündliche Aktivität in der Aszitesflüssigkeit bereits bei Zellzahlen von weniger als 250 neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitesflüssigkeit nachgewiesen werden kann. Es kann keine Korrelation von IL-6 oder IP-10 mit den Diagnosekriterien oder dem Krankheitsverlauf bei einer SBP dargestellt werden. Trotz einer statistischen Korrelation von IL-8 und IL-10 mit den Diagnosekriterien einer SBP eignen sich die beiden Proteine nicht als Biomarker im Krankheitsbild einer SBP. Die C3a-Konzentration zeigt sich im Falle einer SBP verringert, verglichen mit Proben von Patienten ohne Leberzirrhose. Lactoferrin zeigt keine statistische Korrelation mit den Diagnosekriterien einer SBP, jedoch lassen sich aufgrund der Analyse von Verlaufspunkten Abschätzungen zum Krankheitsverlauf einer SBP anstellen. Calprotectin korreliert sowohl mit den Diagnosekriterien als auch mit dem Krankheitsverlauf einer SBP und stellt einen potenziellen Biomarker im Krankheitsbild der SBP dar. Im Rahmen dieser Arbeit gelingt die Erstbeschreibung von S100a12 als neuer Biomarker zur Diagnostik und Beurteilung des klinischen Verlaufes im Krankheitsbild der SBP.

Die Entwicklung eines Bedside-Tests, ggf. auch als App, aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ist in Planung.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ca.	circa
dl	Deziliter
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
etc.	et cetera
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HCC	hepatozelluläres Karzinom
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
INR	International Normalized Ratio
IP-10	Interferon-gamma-induziertes Protein 10
MELD	Model for End-stage Liver Disease
min	Minuten
ml	Milliliter
MLNs	mesenteriale Lymphknoten
mm ³	Kubikmillimeter
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBC	primär biliäre Cholangitis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Picogramm
PMNs	polymorphnukleäre Zellen
SBC	sekundär biliäre Zirrhose
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
SIBO	small intestinal bacterial overgrowth
TMB	Tetramethylbenzidin
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vgl.	vergleiche

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* 2019;70(1):151–71. doi:10.1016/j.jhep.2018.09.014
2. J. J. Heidelbaugh, M. Bruderly. Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I. Diagnosis and Evaluation. *Am Fam Physician* [Internet]. 2006 [cited 2016 Aug 22];74. Available from: <http://www.aafp.org/afp/2006/0901/p756.pdf>
3. Loomba R, Adams LA. Advances in non-invasive assessment of hepatic fibrosis. *Gut.* 2020;69(7):1343–52. doi:10.1136/gutjnl-2018-317593
4. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020;9(4):875. doi:10.3390/cells9040875
5. Poynard T, Mathurin P, Lai C, Guyader D, Poupon R, Tainturier M, Myers RP, Muntenau M, Ratzu V, Manns M, Vogel A, Capron F, Chedid A, Bedossa P. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2003;38(3):257–65. doi:10.1016/S0168-8278(02)00413-0
6. Pugh RN, Im Murray-Lyon, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973;60(8):646–9.
7. Freeman RB JR, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, Merion R, Wolfe R, Turcotte J, Teperman L. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl.* 2002;8(9):851–8. doi:10.1053/jlts.2002.35927
8. Cirrhosis in adults: Overview of complications, general management, and prognosis - UpToDate [Internet]. 2019 [updated 2019 Mar 4; cited 2019 Mar 12]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/cirrhosis-in-adults-overview-of-complications-general-management-and-prognosis?search=child-pugh&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H52738331
9. Zoubek ME, Trautwein C, Strnad P. Reversal of liver fibrosis: From fiction to reality. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2017;31(2):129–41. doi:10.1016/j.bpg.2017.04.005
10. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015;148(3):547–55. doi:10.1053/j.gastro.2014.11.039
11. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Cales P. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology.* 1997;113(5):1609–16. doi:10.1053/gast.1997.v113.pm9352863
12. Liao W, Hou M, Chang C, Lee F, Lin H, Lee S. Potential precipitating factors of esophageal variceal bleeding: a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(1):96–103. doi:10.1038/ajg.2010.342

7 LITERATURVERZEICHNIS

13. Mumtaz K, Ahmed US, Abid S, Baig N, Hamid S, Jafri W. Precipitating factors and the outcome of hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2010;20(8):514–8.
14. Sundaram V, Shaikh OS. Hepatic encephalopathy: pathophysiology and emerging therapies. *Med Clin North Am*. 2009;93(4):819-36, vii. doi:10.1016/j.mcna.2009.03.009
15. Haderer M, Neubert P, Rinner E, Scholtis A, Broncy L, Gschwendtner H, Kandulski A, Pavel V, Mehrl A, Brochhausen C, Schlosser S, Gülow K, Kunst C, Müller M. Novel pathomechanism for spontaneous bacterial peritonitis: Disruption of cell junctions by cellular and bacterial proteases. *Gut*. 2021;5gutjnl-2020-321663. doi:10.1136/gutjnl-2020-321663
16. Berzigotti A, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Morillas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Groszmann RJ. Obesity is an independent risk factor for clinical decompensation in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2011;54(2):555–61. doi:10.1002/hep.24418
17. Berzigotti A, Seijo S, Reverter E, Bosch J. Assessing portal hypertension in liver diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;7(2):141–55. doi:10.1586/egh.12.83
18. Garcia-Pagan J, Gracia-Sancho J, Bosch J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol*. 2012;57(2):458–61. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.007
19. Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med*. 2001;344(6):452–4. doi:10.1056/NEJM200102083440610
20. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27 Suppl 265–8. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.07002.x
21. Lewis JH, Stine JG. Review article: prescribing medications in patients with cirrhosis - a practical guide. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(12):1132–56. doi:10.1111/apt.12324
22. Gerbes AL, Labenz J, Appenrodt B, Dollinger M, Gundling F, Gülberg V, Holstege A, Lynen-Jansen P, Steib CJ, Trebicka J, Wiest R, Zipprich A. Aktualisierte S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) „Komplikationen der Leberzirrhose“ [Updated S2k-Guideline "Complications of liver cirrhosis". German Society of Gastroenterology (DGVS)]. *Z Gastroenterol*. 2019;57(5):e168. ger. doi:10.1055/a-0928-2800
23. Baskol M, Ozbakir O, Coskun R, Baskol G, Saraymen R, Yucesoy M. The role of serum zinc and other factors on the prevalence of muscle cramps in non-alcoholic cirrhotic patients. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(6):524–9.
24. Carbonell AM, Wolfe LG, DeMaria EJ. Poor outcomes in cirrhosis-associated hernia repair: a nationwide cohort study of 32,033 patients. *Hernia*. 2005;9(4):353–7. doi:10.1007/s10029-005-0022-x

7 LITERATURVERZEICHNIS

25. Marsman HA, Heisterkamp J, Halm JA, Tilanus HW, Metselaar HJ, Kazemier G. Management in patients with liver cirrhosis and an umbilical hernia. *Surgery*. 2007;142(3):372–5. doi:10.1016/j.surg.2007.05.006
26. Ozden I, Emre A, Bilge O, Tekant Y, Acarli K, Alper A, Aryogul O. Elective repair of abdominal wall hernias in decompensated cirrhosis. *Hepatogastroenterology*. 1998;45(23):1516–8.
27. Argo CK, Balogun RA. Blood products, volume control, and renal support in the coagulopathy of liver disease. *Clin Liver Dis*. 2009;13(1):73–85. doi:10.1016/j.cld.2008.09.007
28. Seeff LB, Everson GT, Morgan TR, Curto TM, Lee WM, Ghany MG, Shiffman ML, Fontana RJ, Di Bisceglie, Bonkovsky HL, Dienstag JL. Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the HALT-C trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(10):877–83. doi:10.1016/j.cgh.2010.03.025
29. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: An update. *Hepatology*. 2009;49(6):2087–107. doi:10.1002/hep.22853
30. Gottardi A de, Thévenot T, Spahr L, Morard I, Bresson-Hadni S, Torres F, Giostra E, Hadengue A. Risk of complications after abdominal paracentesis in cirrhotic patients: A prospective study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(8):906–9. doi:10.1016/j.cgh.2009.05.004
31. Pache I, Bilodeau M. Severe haemorrhage following abdominal paracentesis for ascites in patients with liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21(5):525–9. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02387.x
32. Lin C, Shih F, Ma MH, Chiang W, Yang C, Ko PC. Should bleeding tendency deter abdominal paracentesis? *Dig Liver Dis*. 2005;37(12):946–51. doi:10.1016/j.dld.2005.07.009
33. Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology*. 2003;37(4):897–901. doi:10.1053/jhep.2003.50119
34. Conn HO, Fessel JM. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme. *Medicine (Baltimore)*. 1971;50(3):161–97.
35. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol*. 2000;32(1):142–53.
36. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology*. 2002;35(1):140–8. doi:10.1053/jhep.2002.30082
37. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis*. 1988;157(5):1032–8.

7 LITERATURVERZEICHNIS

38. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2014;60(1):197–209. doi:10.1016/j.jhep.2013.07.044
39. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology.* 1988;8(1):27–31.
40. Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, Coll S, Oliver MI. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology.* 1993;104(4):1133–8.
41. Silvain C, Besson I, Ingrand P, Mannant PR, Fort E, Beauchant M. Prognosis and long-term recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *J Hepatol.* 1993;19(1):188–9.
42. Terg R, Levi D, Lopez P, Rafaelli C, Rojter S, Abecasis R, Villamil F, Aziz H, Podesta A. Analysis of clinical course and prognosis of culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and neutrocytic ascites. Evidence of the same disease. *Dig Dis Sci.* 1992;37(10):1499–504.
43. Gines P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forne M, Miranda ML, Llach J, Salmeron JM, et al. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology.* 1990;12(4 Pt 1):716–24.
44. Terg R, Fassio E, Guevara M, Cartier M, Longo C, Lucero R, Landeira C, Romero G, Dominguez N, Munoz A, Levi D, Miguez C, Abecasis R. Ciprofloxacin in primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a randomized, placebo-controlled study. *J Hepatol.* 2008;48(5):774–9. doi:10.1016/j.jhep.2008.01.024
45. Guarner C, Sola R, Soriano G, Andreu M, Novella MT, Vila MC, Sabat M, Coll S, Ortiz J, Gomez C, Balanzo J. Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels. *Gastroenterology.* 1999;117(2):414–9.
46. ROLACHON A. Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis: Results of a prospective controlled trial*1. *Hepatology.* 1995;22(4):1171–4. doi:10.1016/0270-9139(95)90626-6
47. Soriano G, Guarner C, Teixidó M, Such J, Barrios J, Enríquez J, Vilardell F. Selective intestinal decontamination prevents spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology.* 1991;100(2):477–81. doi:10.1016/0016-5085(91)90219-B
48. Pauwels A, Mostefa-Kara N, Debenes B, Degoutte E, Levy VG. Systemic antibiotic prophylaxis after gastrointestinal hemorrhage in cirrhotic patients with a high risk of infection. *Hepatology.* 1996;24(4):802–6. doi:10.1002/hep.510240408
49. Hsieh WJ, Lin HC, Hwang SJ, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. The effect of ciprofloxacin in the prevention of bacterial infection in patients with cirrhosis after upper gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(6):962–6. doi:10.1111/j.1572-0241.1998.00288.x

7 LITERATURVERZEICHNIS

50. Bajaj JS, Zadvornova Y, Heuman DM, Hafeezullah M, Hoffmann RG, Sanyal AJ, Saeian K. Association of proton pump inhibitor therapy with spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(5):1130–4. doi:10.1038/ajg.2009.80
51. Obstein KL, Campbell MS, Reddy KR, Yang YX. Association between model for end-stage liver disease and spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(12):2732–6. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01485.x
52. Harputluoglu MM, Dertli R, Otlu B, Demirel U, Yener O, Bilgic Y, Erdogan MA, Atayan Y, Cagin YF. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2 Variants in Patients with Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Dig Dis Sci.* 2016;61(6):1545–52. doi:10.1007/s10620-015-4024-y
53. Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grunhage F, Lammert F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U, Appenrodt B. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2011;55(5):1010–6. doi:10.1016/j.jhep.2011.02.022
54. Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(5):1330-40.e1. doi:10.1053/j.gastro.2012.07.099
55. Gabele E, Muhlbauer M, Paulo H, Johann M, Meltzer C, Leidl F, Wodarz N, Wiest R, Scholmerich J, Hellerbrand C. Analysis of monocyte chemotactic protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol.* 2009;15(44):5558–62.
56. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Lei D, Wang Y, Zhu B, Li L. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology.* 2011;54(2):562–72. doi:10.1002/hep.24423
57. Corazza GR, Menozzi MG, Strocchi A, Rasciti L, Vaira D, Lecchini R, Avanzini P, Chezzi C, Gasbarrini G. The diagnosis of small bowel bacterial overgrowth. Reliability of jejunal culture and inadequacy of breath hydrogen testing. *Gastroenterology.* 1990;98(2):302–9.
58. Chang CS, Yang SS, Kao CH, Yeh HZ, Chen GH. Small intestinal bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36(1):92–6.
59. Jun DW, Kim KT, Lee OY, Chae JD, Son BK, Kim SH, Jo YJ, Park YS. Association between small intestinal bacterial overgrowth and peripheral bacterial DNA in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci.* 2010;55(5):1465–71. doi:10.1007/s10620-009-0870-9
60. Yang CY, Chang CS, Chen GH. Small-intestinal bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis, diagnosed with glucose H₂ or CH₄ breath tests. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33(8):867–71.

7 LITERATURVERZEICHNIS

61. Morencos FC, de las Heras Castano G, Martin RL, Lopez AMJ, Ledesma F, Pons RF. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 1995;40(6):1252–6.
62. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 1979;23(2):403–11.
63. Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, Bevins CL, Stange EF, Wehkamp J. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology*. 2012;55(4):1154–63. doi:10.1002/hep.24789
64. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675–80. doi:10.1038/90609
65. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001;2(4):361–7. doi:10.1038/86373
66. Munoz L, Jose Borrero M, Ubeda M, Lario M, Diaz D, Frances R, Monserrat J, Pastor O, Aguado-Fraile E, Such J, Alvarez-Mon M, Albillos A. Interaction between intestinal dendritic cells and bacteria translocated from the gut in rats with cirrhosis. *Hepatology*. 2012;56(5):1861–9. doi:10.1002/hep.25854
67. Kirkland D, Benson A, Mirpuri J, Pifer R, Hou B, DeFranco AL, Yarovinsky F. B cell-intrinsic MyD88 signaling prevents the lethal dissemination of commensal bacteria during colonic damage. *Immunity*. 2012;36(2):228–38. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.019
68. Trivedi PJ, Adams DH. Gut-liver immunity. *J Hepatol*. 2016;64(5):1187–9. doi:10.1016/j.jhep.2015.12.002
69. Moriwaki K, Balaji S, McQuade T, Malhotra N, Kang J, Chan FK. The necroptosis adaptor RIPK3 promotes injury-induced cytokine expression and tissue repair. *Immunity*. 2014;41(4):567–78. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.016
70. Schneider KM, Bieghs V, Heymann F, Hu W, Dreymueller D, Liao L, Frissen M, Ludwig A, Gassler N, Pabst O, Latz E, Sellge G, Penders J, Tacke F, Trautwein C. CX3CR1 is a gatekeeper for intestinal barrier integrity in mice: Limiting steatohepatitis by maintaining intestinal homeostasis. *Hepatology*. 2015;62(5):1405–16. doi:10.1002/hep.27982
71. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang K, Vonderheide RH, Kaplan DE. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology*. 2012;55(3):709–19. doi:10.1002/hep.24689
72. Owens WE and Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. - PubMed - NCBI. *Infect Immun* [Internet]. 1980 [cited 2017 Mar 6]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=W.E.+Owens%2C+R.D.+Berg++B>

7 LITERATURVERZEICHNIS

- acterial+translocation+from+the+gastrointestinal+tract+of+athymic+(nu%2Fnu)+mice
73. DeMeo AN, Andersen BR. Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N Engl J Med.* 1972;286(14):735–40. doi:10.1056/NEJM197204062861401
 74. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis.* 2000;182(2):526–33. doi:10.1086/315742
 75. Holdstock G, Leslie B, Hill S, Tanner A, Wright R. Monocyte function in cirrhosis. *J Clin Pathol.* 1982;35(9):972–9.
 76. Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Frances R, Shah N, Mookerjee RP, Such J, Jalan R. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol.* 2011;55(3):574–81. doi:10.1016/j.jhep.2010.11.034
 77. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2011;53(1):96–105. doi:10.1002/hep.24018
 78. Levi AC, Borghi F, Petrino R, Bargoni A, Fronticelli CM, Gentili S. Modifications of the trophism of intestinal mucosa after intestinal and bilio-pancreatic diversion in the rat. *Ital J Gastroenterol.* 1991;23(4):202–7.
 79. Taylor CT, Dzus AL, Colgan SP. Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology.* 1998;114(4):657–68.
 80. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31263–71. doi:10.1074/jbc.M111.238147
 81. Clark E, Hoare C, Tanianis-Hughes J, Carlson GL, Warhurst G. Interferon gamma induces translocation of commensal *Escherichia coli* across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1258–67.
 82. Ivison SM, Wang C, Himmel ME, Sheridan J, Delano J, Mayer ML, Yao Y, Kifayet A, Steiner TS. Oxidative stress enhances IL-8 and inhibits CCL20 production from intestinal epithelial cells in response to bacterial flagellin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(3):G733–41. doi:10.1152/ajpgi.00089.2010
 83. Obermeier F, Gross V, Scholmerich J, Falk W. Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide. *J Leukoc Biol.* 1999;66(5):829–36.
 84. Wallace JL, Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology.* 2000;119(2):512–20.

7 LITERATURVERZEICHNIS

85. ASTALDI G, STROSSELLI E. Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J Dig Dis.* 1960;5603–12.
86. Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol.* 1997;108(6):652–7.
87. Norman DA, Atkins JM, Seelig LL JR, Gomez-Sanchez C, Krejs GJ. Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension. *Gastroenterology.* 1980;79(4):707–15.
88. Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, Spiliopoulou I, Kaltezioti V, Charonis A, Nikolopoulou VN, Scopa CD, Thomopoulos KC. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(4):439–46. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02609.x
89. Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect.* 2008;10(4):424–31. doi:10.1016/j.micinf.2008.01.001
90. Lewis K, Lutgendorff F, van Phan, Soderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(7):1138–48. doi:10.1002/ibd.21177
91. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology.* 1995;108(6):1835–41.
92. Nagral AS, Joshi AS, Bhatia SJ, Abraham P, Mistry FP, Im Vora. Congestive jejunopathy in portal hypertension. *Gut.* 1993;34(5):694–7.
93. Gundling F, Schmidtler F, Hapfelmeier A, Schulte B, Schmidt T, Pehl C, Schepp W, Seidl H. Fecal calprotectin is a useful screening parameter for hepatic encephalopathy and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Liver Int.* 2011;31(9):1406–15. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02577.x
94. Saitoh O, Sugi K, Lojima K, Matsumoto H, Nakagawa K, Kayazawa M, Tanaka S, Teranishi T, Hirata I, Katsu KK. Increased prevalence of intestinal inflammation in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 1999;5(5):391–6.
95. Balmer ML, Slack E, Gottardi A de, Lawson MA, Hapfelmeier S, Miele L, Grieco A, van Vlierberghe H, Fahrner R, Patuto N, Bernsmeier C, Ronchi F, Wyss M, Stroka D, Dickgreber N, Heim MH, McCoy KD, Macpherson AJ. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):237ra66. doi:10.1126/scitranslmed.3008618
96. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 1993;18(3):353–8. doi:10.1016/S0168-8278(05)80280-6

7 LITERATURVERZEICHNIS

97. Bobadilla M, Sifuentes J, Garcia-Tsao G. Improved method for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol.* 1989;27(10):2145–7. doi:10.1128/JCM.27.10.2145-2147.1989
98. Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology.* 1988;95(5):1351–5. doi:10.1016/0016-5085(88)90372-1
99. Tuncer I, Topcu N, Durmus A, Turkdogan MK. Oral ciprofloxacin versus intravenous cefotaxime and ceftriaxone in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatogastroenterology.* 2003;50(53):1426–30.
100. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas V, Rimola A, Marco F, Guarner C, Forne M, Planas R, Banares R, Castells L, Jimenez DAM, Arroyo V, Rodes J. Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology.* 1996;111(4):1011–7.
101. A.L. Gerbes, V. Güllberg, T. Sauerbruch, R. Wiest, B. Appenrodt, M. J. Bahr, M. M. Dollinger, M. Rössle, M. Schepke. S3-Leitlinie "Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom" [Internet] [cited 2016 Aug 22]. Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-017I_S3_Aszites_2011-abgelaufen.pdf
102. Felisart J, Rimola A, Arroyo V, Perez-Ayuso RM, Quintero E, Gines P, Rodes J. Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology.* 1985;5(3):457–62.
103. Rimola A, Salmeron JM, Clemente G, Rodrigo L, Obrador A, Miranda ML, Guarner C, Planas R, Sola R, Vargas V, et al. Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. *Hepatology.* 1995;21(3):674–9.
104. Gomez-Jimenez J, Ribera E, Gasser I, Artaza MA, Del VO, Pahissa A, Martinez-Vazquez JM. Randomized trial comparing ceftriaxone with cefonicid for treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(8):1587–92.
105. Ariza X, Castellote J, Lora-Tamayo J, Girbau A, Salord S, Rota R, Ariza J, Xiol X. Risk factors for resistance to ceftriaxone and its impact on mortality in community, healthcare and nosocomial spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol.* 2012;56(4):825–32. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.010
106. Cheong HS, Kang CI, Lee JA, Moon SY, Joung MK, Chung, Koh KC, Lee NY, Song JH, Peck KR. Clinical significance and outcome of nosocomial acquisition of spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis.* 2009;48(9):1230–6. doi:10.1086/597585
107. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology.* 1986;91(6):1343–6. doi:10.1016/0016-5085(86)90185-X

108. Llach J, Rimola A, Navasa M, Ginès P, Salmerón JM, Ginès A, Arroyo V, Rodés J. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: Relevance of ascitic fluid protein concentration. *Hepatology*. 1992;16(3):724–7. doi:10.1002/hep.1840160318
109. Nousbaum J, Cadranel J, Nahon P, Khac EN, Moreau R, Thévenot T, Silvain C, Bureau C, Nouel O, Pilette C, Paupard T, Vanbiervliet G, Oberti F, Davion T, Jouannaud V, Roche B, Bernard P, Beaulieu S, Danne O, Thabut D, Chagneau-Derrode C, Lédighen V de, Mathurin P, Pauwels A, Bronowicki J, Habersetzer F, Abergel A, Audigier J, Sapey T, Grangé J, Tran A. Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 2007;45(5):1275–81. doi:10.1002/hep.21588
110. Campillo B, Richardet J, Dupeyron C. Diagnostic value of two reagent strips (Multistix® 8 SG and Combur® 2 LN) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and symptomatic bacterascites. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2006;30(3):446–52. doi:10.1016/S0399-8320(06)73201-8
111. Thévenot T, Cadranel J, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, Merzoug N. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(6):579–83. doi:10.1097/00042737-200406000-00011
112. Sapey T, Kabissa D, Fort E, Laurin C, Mendler MH. Instant diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis using leukocyte esterase reagent strips: Nephur-Test vs. MultistixSG. *Liver Int*. 2005;25(2):343–8. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01086.x
113. Nguyen-Khac E, Cadranel JF, Thevenot T, Nousbaum JB. Review article: The utility of reagent strips in the diagnosis of infected ascites in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(3):282–8. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03735.x
114. Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*. 2004;344(1-2):37–51. doi:10.1016/j.cccn.2004.02.023
115. Sydora MJ, Sydora BC, Fedorak RN. Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *J Crohns Colitis*. 2012;6(2):207–14. doi:10.1016/j.crohns.2011.08.008
116. van Rheenen PF, van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: Diagnostic meta-analysis. *BMJ*. 2010;341c3369.
117. Wassell J, Wallage M, Brewer E. Evaluation of the Quantum Blue® rapid test for faecal calprotectin. *Ann Clin Biochem*. 2012;49(Pt 1):55–8. doi:10.1258/acb.2011.011106

7 LITERATURVERZEICHNIS

118. Haisma S, Galaurchi A, Almahwzi S, Adekanmi Balogun JA, Muller Kobold AC, van Rheenen PF. Head-to-head comparison of three stool calprotectin tests for home use. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214751. doi:10.1371/journal.pone.0214751
119. Burri E, Schulte F, Muser J, Meier R, Beglinger C. Measurement of calprotectin in ascitic fluid to identify elevated polymorphonuclear cell count. *World J Gastroenterol*. 2013;19(13):2028–36. doi:10.3748/wjg.v19.i13.2028
120. Lutz P, Pfarr K, Nischalke HD, Krämer B, Goeser F, Glässner A, Wolter F, Kokordelis P, Nattermann J, Sauerbruch T, Hoerauf A, Strassburg CP, Spengler U. The ratio of calprotectin to total protein as a diagnostic and prognostic marker for spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis and ascites. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(12):2031–9. doi:10.1515/cclm-2015-0284
121. Abdel-Razik A, Mousa N, Elhammady D, Elhelaly R, Elzehery R, Elbaz S, Eissa M, El-Wakeel N, Eldars W. Ascitic Fluid Calprotectin and Serum Procalcitonin as Accurate Diagnostic Markers for Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Gut Liver*. 2016;10(4):624–31. doi:10.5009/gnl15120
122. Fernandes SR, Santos P, Fatela N, Baldaia C, Tato Marinho R, Proença H, Ramalho F, Velosa J. Ascitic Calprotectin is a Novel and Accurate Marker for Spontaneous Bacterial Peritonitis. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(6):1139–45. doi:10.1002/jcla.21994
123. Lee SS, Min HJ, Choi JY, Cho HC, Kim JJ, Lee JM, Kim HJ, Ha CY, Kim HJ, Kim TH, Kim JH, Lee O. Usefulness of ascitic fluid lactoferrin levels in patients with liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol*. 2016;16(1):132. doi:10.1186/s12876-016-0546-9
124. Lopez RN, Leach ST, Lemberg DA, Duvoisin G, Gearry RB, Day AS. Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(3):577–82. doi:10.1111/jgh.13611
125. Parsi MA, Saadeh SN, Zein NN, Davis GL, Lopez R, Boone J, Lepe MR, Guo L, Ashfaq M, Klintmalm G, McCullough AJ. Ascitic fluid lactoferrin for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*. 2008;135(3):803–7. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.045
126. Mustafa G, Khan M, Alam K, Rahman S, Ahmad N, Alam S, Ahmed S. Study on ascitic fluid complement 3 level in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and without spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(79):1905–7.
127. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol*. 1988;6(1):80–4. doi:10.1016/S0168-8278(88)80465-3
128. Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazón JM, Pérez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis

- and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology*. 2002;36(1):135–41. doi:10.1053/jhep.2002.33715
129. Bruns T, Sachse S, Straube E, Assefa S, Herrmann A, Hagel S, Lehmann M, Stallmach A. Identification of bacterial DNA in neutrocytic and non-neutrocytic cirrhotic ascites by means of a multiplex polymerase chain reaction. *Liver Int*. 2009;29(8):1206–14. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02073.x
 130. Appenrodt B, Lehmann LE, Thyssen L, Gentemann M, Rabe C, Molitor E, Trebicka J, Stüber F, Sauerbruch T. Is detection of bacterial DNA in ascitic fluid of clinical relevance? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(12):1487–94. doi:10.1097/MEG.0b013e328340c43a
 131. Bruns T, Reuken PA, Stengel S, Gerber L, Appenrodt B, Schade JH, Lammert F, Zeuzem S, Stallmach A. The prognostic significance of bacterial DNA in patients with decompensated cirrhosis and suspected infection. *Liver Int*. 2016;36(8):1133–42. doi:10.1111/liv.13095
 132. Abdel-Razik A, Abdelsalam M, Gad DF, Abdelwahab A, Tawfik M, Elzehery R, Elhelaly R, Hasan AS, El-Wakeel N, Eldars W. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: Novel predictors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020;32(6):718–26. doi:10.1097/MEG.0000000000001578
 133. Mayr U, Lukas M, Elnegouly M, Vogt C, Bauer U, Ulrich J, Schmid RM, Huber W, Lahmer T. Ascitic Interleukin 6 Is Associated with Poor Outcome and Spontaneous Bacterial Peritonitis: A Validation in Critically Ill Patients with Decompensated Cirrhosis. *J Clin Med*. 2020;9(9). doi:10.3390/jcm9092865
 134. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*. 1992;307(1):97–101. doi:10.1016/0014-5793(92)80909-Z
 135. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170–81. doi:10.1038/nri2711

8 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich, Sophia Helke Sabine Rusch (geb. Scherm), geboren am 03.05.1995 in Weiden i.d.OPf., erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberatern oder anderen Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift der Verfasserin

9 DANKSAGUNG

Abschließend ergeht mein Dank allen Personen, ohne die ein erfolgreicher Abschluss dieser Dissertationsschrift nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere möchte ich Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling meinen Dank aussprechen. Zunächst für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und der für die Arbeit notwendigen Laboreinrichtungen und Mittel. Und auch besonders für die sehr kompetente Unterstützung und die thematisch wertvollen Ideen, die diese Arbeit fortlaufend vorangetrieben haben.

Weiterhin bin ich meiner Arbeitsgruppe zu großem Dank verpflichtet: PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow, PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst, Dr. rer. physiol. Marika Haderer, Elisabeth Aschenbrenner, Kirstin Pollinger, Manuela Stieber-Gunckel, Heidi Gschwendtner und Martina Meisinger.

Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. rer. physiol. Marika Haderer für die Einarbeitung, die guten Ratschläge und das offene Ohr bis zum Schluss. Außerdem ein herzliches Dankeschön für die schöne Laborzeit mit Lorenz Wächter.

Einen Dank für die erfreuliche Kooperation und Vorfreude auf die kommenden Untersuchungen möchte ich der Firma Immundiagnostik AG und stellvertretend für alle Mitarbeiter Dr. Franz Paul Armbruster aussprechen.

Last, but not least möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit durch ihre Unterstützung und ihre uneingeschränkte Bereitschaft, diesen Weg mit mir zu beschreiten, möglich machten. Mein nie endender Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern und meinem Ehemann Maximilian Rusch.

10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Aufgeführt sind die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Kongressbeiträge:

• **6th German-Romanian Symposium of Gastroenterology, Regensburg (2019)**

Scherm, S., Haderer, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). On the way to innovative potential biomarkers in spontaneous bacterial peritonitis from ascitic fluid. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 28(Suppl 1)

• **47. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V., Passau (2019)**

Scherm, S., Haderer, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). Entzündungsparameter im Aszites bei Leberzirrhosepatienten – neue potentielle Biomarker zur Diagnose der spontan bakteriellen Peritonitis? Zeitschrift für Gastroenterologie, 57(6)

• **125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., Wiesbaden (2019)**

Scherm, S., Haderer, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). Entzündungsparameter im Aszites bei Leberzirrhosepatienten – neue potentielle Biomarker zur Diagnose der spontan bakteriellen Peritonitis? Internist 2019, 60(Suppl 1)

• **35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Heidelberg (2019)**

Scherm, S., Haderer, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2019). Innovative biomarkers detecting spontaneous bacterial peritonitis in ascitic fluid of liver cirrhosis patients. Zeitschrift für Gastroenterologie, 57(1)

• **26th United European Week, Wien (2018)**

Scherm, S., Haderer, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Kunst, C., Müller-Schilling, M. (2018). Inflammatory activity in ascitic fluid of liver cirrhosis patients – on the way to novel potential biomarkers for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. United European Gastroenterology Journal 2018, 6(Suppl 1)

• **73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, München (2018)**

Scherm, S., Haderer, M., Aschenbrenner, E., Pollinger, K., Schlosser, S., Müller-Schilling, M., Kunst, C. (2018). Entzündungsparameter im Aszites bei

10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Leberzirrhosepatienten – neue potentielle Biomarker zur Diagnose der spontan bakteriellen Peritonitis? Zeitschrift für Gastroenterologie, 56(8)