Einfluss von Tabakrauch auf die *CFTR*-Funktion

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Azadeh Bagheri-Hanson, geb. Bagheri-Behrouzi

Aus Teheran, Iran

Gießen, 2016

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Leiter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. med. Ludger Fink

Tag der Disputation: 21. November 2017

Erklärung zur Dissertation

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

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung: ... 1
1.1 Tabakrauch ... 1
1.2 Aufbau und Funktion des Ionenkanals *CFTR* ... 1
1.3 Funktionsmessungen am Epithel ... 3
1.4 Sekundäre *CFTR*-Funktionsstörung durch Tabakrauch ... 4
1.5 Ziel der Dissertation ... 5
2. Material und Methoden: ... 6
2.1 Untersuchungskollektiv und Rekrutierung der Probanden ... 6
2.2 Ablauf der Untersuchungen ... 6
2.3 Ethik ... 7
2.4 Schweißchloridmessung (Schweißtest, ST) ... 7
2.5 Cotininbestimmung im Urin ... 9
2.6 Nasale Potentialdifferenzmessung (nPD) ... 10
2.6.1 Versuchsaufbau nPD ... 12
2.6.2 nPD Versuchsdurchführung ... 15
2.6.3 Auswertung nPD ... 17
2.7 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM) ... 19
2.7.1 Allgemein ... 19
2.7.2 Entnahme der Rektumbiopsien ... 19
2.7.3 ICM Versuchsaufbau ... 20
2.7.4 Versuchsdurchführung ICM ... 22
2.7.5 Auswertung ICM ... 23
2.8 Verwendete Chemikalien ... 23
2.9 Datenverarbeitung und Statistik ... 24
3. Ergebnisse ... 26
3.1 Untersuchungskollektiv ... 26
3.1.2 Anamnestischer Zigarettenkonsum ... 26
3.2 Cotininmessung im Urin ... 27
3.3 Gesundheitsangaben ... 29
3.3.1 Zigarettenkonsum des Kollektivs ... 30
3.3.2 Passive Zigarettenrauchbelastung: ... 31
3.4 Schweißchloridmessung ... 32
3.4.1 Ergebnisse des Schweißchlorids zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion ... 32

3.4.2 Kategorisierung der Schweißchloridwerte anhand diagnostischer Referenzwerte 33
3.4.3 Schweißchloridergebnisse nach anamnestischer Nikotinbelastung: 34
3.5 Nasale Potentialdifferenzmessung 34
3.5.1 Kategorisierung des ΔPDFreeCl/Iso anhand diagnostischer Referenzwerte 35
3.5.2 Durchführung von Zweitmessungen 36
3.5.3 Ergebnisse des $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion 38
3.5.4 Basale Potentialdifferenz und Natrium-Resorption 40
3.5.5 Prüfung zellulärer Integrität 41
3.6 Intestinale Kurzschlussstrommessung 42
3.6.1 Ergebnisse des ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion ... 43
3.6.2 Kategorisierung des ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) anhand diagnostischer Referenzwerte 44
3.6.3 Ergebnisse des ΔI_{sc}(Forsk) zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion 44
4. Diskussion 46
4.1 Cotinin im Urin zur Objektivierung der individuellen Nikotinbelastung 46
4.2 Tabakrauch und *CFTR*-Funktion der Schweißdrüse 47
4.3 Tabakrauch und *CFTR*-Funktion am intestinalen Epithel 48
4.4 Tabakrauch und *CFTR*-Funktion am respiratorischen Epithel 50
4.5 Auswirkungen auf die Beurteilung der diagnostischer *CFTR*-Funktionstests 51
4.6 Reversibilität der tabakrauchinduzierten *CFTR*-Funktionsstörung 53
4.7 Limitationen 54
4.8 Schlussfolgerung und Aussichten: 54
5. Zusammenfassung 56
6. Summary 57
7. Verzeichnisse 58
7.1 Abbildungsverzeichnis 58
7.2 Tabellenverzeichnis 58
7.3 Abkürzungen 59
8. Literaturverzeichnis 61
Anhang 65
Einverständniserklärungen 65
Anamnesebogen nach SOP ICM_EU001, Version 2.7 69
Danksagung .....
Lebenslauf .....

1. Einleitung:

1.1 Tabakrauch

Tabakrauch führt durch unterschiedliche Substanzen zu Schädigungen in verschiedenen Organen, allem voran in den Atemwegen, im kardiovaskulären System, zu DNA-Schäden mit der Folge erhöhten Karzinomrisikos und zur Abhängigkeit. Dabei ist nicht für alle Erkrankungen ein lineares Dosis-Wirkungsprinzip zu finden (Surgeon General of the United States 2010).

In den Atemwegen führt Tabakrauch durch oxidativen Stress zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, die eine Inflammation auslösen, die auch Jahre nach Tabakentwöhnung fortbestehen kann (Adcock et al. 2011). Auch wurde eine tabakrauchinduzierte verminderte mukoziliäre Clearance in den oberen (Baby et al. 2014) und unteren Atemwegen (Bohning et al. 1975) gezeigt. Studien wurden veröffentlicht, die eine Funktionsstörung des *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator)-Kanals als Ursache beschrieben. Es wurde eine Reduktion des *CFTR* mRNA-Levels (Kreindler et al. 2005) und eine Verringerung der Airway Surface Layer (ASL)-Höhe als Folge erhöhter Internalisierung von *CFTR* durch Tabakrauch gezeigt (Clunes et al. 2012).

1.2 Aufbau und Funktion des Ionenkanals *CFTR*

CFTR befindet sich in der apikalen Zellmembran exokriner Drüsen und ist ein Ionentransporter. Er besteht aus 2 transmembranären (MSD) Domänen, 2 nukleotid-bindenden (NBD) sowie einer regulatorischen (R-) Domäne (Abb. 1-1).

CFTR wird durch die c-AMP abhängige Proteinkinase A reguliert. Beim Anstieg des c-AMP Levels intrazellulär kommt es zur Phosphorylierung der Serylreste an der R-Domäne und führt zu einer Konfigurationsänderung, vom geschlossenen zum offenen Zustand, sodass Chlorid aus der Zelle sezerniert wird (Loeffler 1997).

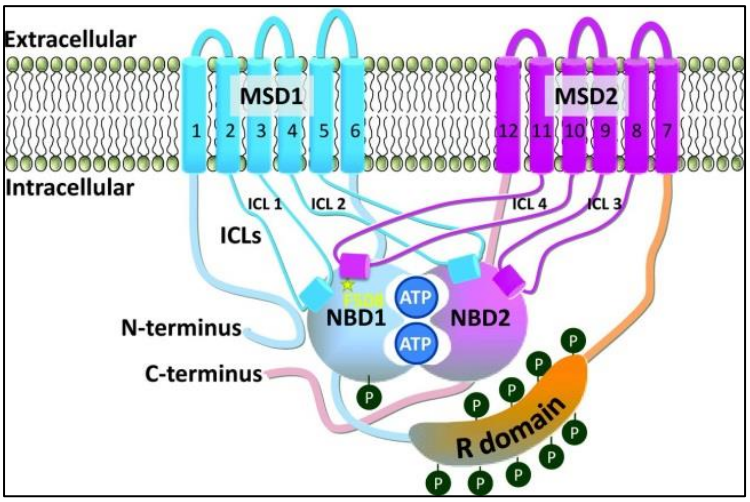

Abbildung 1-1 Aufbau des *CFTR*-Kanal, Abbildung entnommen aus (Chiaw et al. 2011)

Chloridsekretion aus der Zelle ist die elektrische Triebkraft für Natrium- und konsekutiv Wasseraustritt in das apikale Lumen. Neben calciumaktivierenden Chloridkanälen (CaCC) sorgt *CFTR* für diesen Chloridtransport. Indem *CFTR* indirekt den epithelialen Natriumkanal (ENaC) blockiert, der Natrium in das basolaterale Interstitium pumpt (Stutts et al. 1995), verstärkt er den Chloridtransport. ENaC wiederum hat eine entscheidende Bedeutung, weil er allein verantwortlich für die Wasser- und Salzresorption in die Zelle und den basolateralen Raum ist (Clunes and Boucher 2011).

Bei der Erkrankung Mukoviszidose kommt es zu einem nahezu kompletten Funktionsverlust des *CFTR* (Davis et al. 1996). Die dadurch verursachten Schäden am Atemwegstrakt, welche für die Mortalität der CF (Zystische Fibrose) hauptverantwortlich sind, werden durch folgende Phänomene erklärt: Die deutlich verminderte Chloridsekretion (Tarran et al. 2001) mit konsekutiv erhöhter Natriumrückresorption (Boucher et al. 1986) und osmotisch bedingtem Wasserrückstrom aus dem Lumen (Matsui et al. 1998) führt zur Dehydratation des Airway Surface Liquid (ASL) und verringert die mukoziliäre Clearance (Pilewski and Frizzell 1999). Dies begünstigt im Verlauf die bakterielle Besiedlung (Clunes and Boucher 2011) (Hidaka and Hidaka 1999) mit den o.g. Folgen für die Lunge (siehe Abb. 1-2).

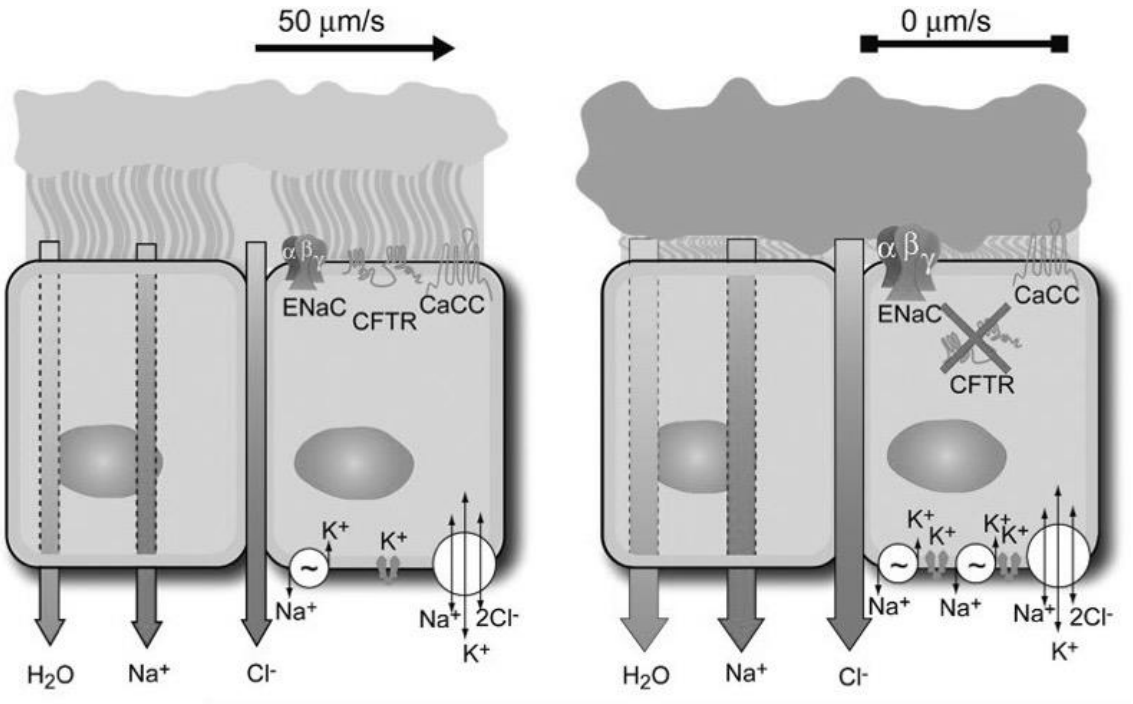

Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der CFTR-Funktion am Atemwegsepithel bei gesunden (links) und bei Mukoviszidose (rechts), aus Harrisons Innere Medizin, (Dietel et al. 2012)

Dieser Prozess ist für die reduzierte Lebenserwartung der Betroffenen hauptverantwortlich, die derzeit ca. 40 Jahre beträgt (MacKenzie et al. 2014).

1.3 Funktionsmessungen am Epithel

Schon vor der Entdeckung des *CFTR*-Gens 1989 haben Forscher zum besseren Verständnis der Erkrankung am respiratorischen Epithel der CF-Patienten elektrophysiologische Messungen durchgeführt (Knowles et al. 1981) und eine gestörte Chloridsekretion festgestellt. Auch in diesem Feld haben sich bis heute Fortschritte und Veränderungen ergeben, so dass ihr Benefit nicht mehr allein wissenschaftlichen Zwecken vorenthalten ist, sondern auch Eingang in diagnostische Algorithmen (De Boeck et al. 2011) gefunden hat. Diese sogenannten Funktionsmessungen können beim Menschen vor allem an Schweißdrüsen, Nasen-, und Rektumepithel durchgeführt werden. Für die nasale Potentialdifferenzmessung (nPD) und intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM) an rektalen Schleimhautbiopsaten (Derichs et al. 2010) wurden europäische und amerikanische Leitlinien und Standard Operating

Procedures (SOP´s) entwickelt. Weltweit werden sie an wenigen, ausgewählten Zentren angeboten. Die nPD-Messung setzt eine gewisse Mitarbeit des Untersuchten voraus und ist daher erst ab dem 6. Lebensjahr möglich. Die ICM wird nach Entnahme der Rektumschleimhaut ex vivo in einer Ussing-Kammer ausgeführt und kann somit in jedem Alter realisiert werden. Im klinischen Alltag werden diese Untersuchungen dann eingesetzt, wenn bei klinischem Verdacht eine klare Diagnose der CF nicht anhand eines pathologischen Schweißtestergebnisses oder Nachweis zweier Mukoviszidose-verursachender Mutationen bestätigt werden kann.

Im experimentellen Setting werden Funktionsmessungen zum Nachweis therapeutischer Wirksamkeit von Arzneistoffen eingesetzt. So konnte beispielsweise eine 10-fach verbesserte Chloridleitfähigkeit durch *CFTR*-Potentiator Ivacaftor anhand der ICM an Zellkulturen aus humanem Bronchialepithel von CF-Betroffenen gezeigt werden (Van Goor et al. 2009). Mit der ICM konnte auch an Patienten bei Ivacaftor eine Verbesserung der *CFTR*-Aktivität am intestinalen Epithel gemessen werden (Graeber et al. 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, das NPD und ICM sowohl zur Diagnosestellung der CF in unklaren Fällen als auch in der Wirksamkeit von Medikamenten, die gezielt am *CFTR* ansetzen, hilfreich sind.

1.4 Sekundäre *CFTR*-Funktionsstörung durch Tabakrauch

Bereits in den achtziger Jahren wurde in experimentellen Untersuchungen an caninen Atemwegsepithelien eine verminderte Chloridsekretion durch Tabakrauch gezeigt (Welsh 1983). Im Verlauf wurden eine Reduktion von *CFTR* mRNA an Zellkulturen von menschlichen Atemwegsepithelien durch Tabakrauchextrakt beschrieben (Kreindler et al. 2005). Eine kanadische Arbeitsgruppe publizierte erstmalig den Hinweis auf eine verminderte *CFTR* Funktion mittels nasaler Potentialdifferenzmessung an gesunden Rauchern (Cantin et al. 2006). Auch durch Messung der bronchialen Potentialdifferenz wurde eine Reduktion der Chloridleitfähigkeit bei Rauchern mit und ohne chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) um 50% gegenüber Nichtrauchern gezeigt (Dransfield et al. 2013, Raju et al. 2013).

Bei Voruntersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Generierung von Normwerten für die ICM und nPD, die an CF-Patienten und gesunden Probanden durchgeführt wurden, fanden wir eine pathologische Chloridleitfähigkeit bei der NPD bei 3 von 12 tabakrauchexponierten Teilnehmern, die im Bereich von CF-Patienten lag. In der ICM war ein solcher Effekt nicht messbar (Bagheri-Hanson et al. 2014).

1.5 Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist die explorative Untersuchung des Einflusses von Tabakrauch

1. auf die *CFTR*-Funktion an der Schweißdrüse (Schweißchloridmessung), dem respiratorischen (PD der Nasenschleimhaut) und intestinalen Epithel (ICM an Rektumbiopsaten) von gesunden Rauchern und Nichtrauchern.
2. auf die diagnostische Beurteilung *CFTR*-Funktionstests zur Diagnosestellung der Mukoviszidose.

2. Material und Methoden:

2.1 Untersuchungskollektiv und Rekrutierung der Probanden

Zur Durchführung der Querschnittsuntersuchung im Funktionsbereich Pädiatrische Pneumologie, Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie des Zentrums für Kinderheilkunde, wurden volljährige, gesunde Studienteilnehmer mit und ohne Nikotinbelastung gesucht. Wir planten, für jede Gruppe 15 Personen zu rekrutieren. Dazu wurden in der Universitätsklinik und im Hauptgebäude der Justus-Liebig-Universität Gießen Aushänge für freiwillige Teilnehmer angebracht. Interessenten wurden bei Anruf im persönlichem Gespräch das Vorhaben der Studie, die Untersuchungstechniken, möglichen Risiken, der Zeitaufwand und die Probandenvergütung erläutert. Bei Interesse wurde ein Termin für die Untersuchungen vereinbart.

2.2 Ablauf der Untersuchungen

Im Zeitraum von August 2014 bis August 2015 fanden sich die Teilnehmer zur Durchführung der Studie ein. Die Probanden wurden gebeten, vormittags im Zentrum einzutreffen. Nach einem ausführlichen ärztlichen Aufklärungsgespräch über den Ablauf der Untersuchungen sowie mögliche Risiken und Klärung offener Fragen, wurde bei allen Teilnehmern das schriftliche Einverständnis eingeholt.

Anschließend wurden die Teilnehmer u.a. zu Komorbiditäten, Erkrankungen an Mukoviszidose in der Familie und passiver und aktiver Nikotinbelastung befragt. Dies erfolgte anhand des standardisierten Fragebogens aus dem Standard Operating Procedures (SOP) für die nasale Potentialdifferenzmessung (NPD) (ECFS Diagnostic Network Working Group 2013). Ziel des Fragebogens war es, mögliche Einflüsse wie Medikamente, Vorerkrankungen, sowie Hinweise für eine Anlageträgerschaft einer *CFTR*-Mutation zu erkennen.

Wenn die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllt waren, wurden die Untersuchungen durchgeführt. Begonnen wurde mit der Schweißchloridmessung und der Abgabe einer Urinprobe. Im Anschluss daran fand die Messung der nasalen Potentialdifferenz statt und zuletzt die Entnahme der Biopsien für die ICM. Nach insgesamt 3-4 Stunden

verließen die Teilnehmer das Zentrum. Danach wurde im Labor die ICM-Messung durchgeführt, was nochmals 5-7 Stunden in Anspruch nahm.

Einschlusskriterium	**Ausschlusskriterium**
≥ 18 Jahre	akuter Atemwegsinfekt
Gesund	akuter Magendarm-Infekt
	Hämorrhoiden
	Blutungsneigung
	Mukoviszidose-Erkrankung

Tabelle 2-1 Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie

2.3 Ethik

Die Zustimmung der Ethik-Kommission der Justus-Liebig Universität Gießen zur Durchführung des Schweißtestes, der nPD und ICM lag bereits vor (AZ 109/12). Für die zusätzliche projektbezogene Bestimmung der Cotinin- und Kreatininkonzentration im Urin sowie einem Fragebogen zur Evaluation der Akzeptanz der durchgeführten Untersuchungen, wurde im Vorfeld der Studie ein Amendment bei der Ethik-Kommission eingereicht. Diesem wurde am 30. Juli 2014 zugestimmt.

2.4 Schweißchloridmessung (Schweißtest, ST)

Die Messung des Chloridgehaltes im Schweiß stellt im klinischen Alltag aufgrund der Verfügbarkeit, altersunabhängigen Durchführbarkeit und einer hohen Sensitivität und Spezifität (96,5% bzw. 99%) den diagnostischen Goldstandard zum Nachweis bzw. Ausschluss einer CF dar (Farrell et al. 2008, Naehrlich et al. 2013). Allerdings können bestimmte Konstellationen, wie z.B. Hypothyreose, Morbus Addison und eine sehr trockene Haut wie beim atopischen Ezkem, falsch-positive Schweiß-Chloridwerte zur Folge haben (Doherty-Fuller and Copeland 1988, Squires and Dolan 1989, Brand et al. 1996, Selimoglu et al. 2004). Falsch-negative Werte hingegen sind bei Ödemen und Einnahme von Mineralokortikoiden zu finden (LeGrys 1996).

Die Schweißtestuntersuchung wurde nach den Guidelines des Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) durchgeführt.

Abbildung 2-1 Iontophorese mittels Macroduct ® Sweat Inducer und Pilokarpingels

Die Stimulation der Schweißproduktion erfolgte mittels des Macroduct® Sweat Inducer 3700, Logan, USA. Hierzu wurden auf die entfettete und mit elektrolytfreiem Wasser gereinigte Haut zwei Pilogel®Scheiben (Macroduct) aufgebracht, welche 0,5% Pilokarpinnitrat enthielten und über zwei Elektroden (positive und negative Elektrode) mit dem Sweat Inducer verbunden waren (Abb. 2-1). Das Pilokarpin wurde mittels eines vom Sweat Inducer applizierten Stromes von 1,5 – 3 mA (in aufsteigender Intensität über 5 min) in die Haut eingebracht und führte dort zu einer vermehrten Schweißproduktion. Im Anschluss an die Stimulation wurde die Unterarminnenseite nochmals mit elektrolytfreiem Wasser gereinigt und getrocknet.

Der Macroduct® Sweat Collector (Wescor) wurde mittels Klettband über der Stelle der positiven Elektrode fixiert. Der Schweiß wurde durch Kapillarkräfte in den dünnen, zur Schnecke aufgerollten Schlauch gesogen und dort gesammelt (Abb. 2-2). Nach 30 min wurde der Sammelprozess beendet und die Schweißchloridkonzentration, mit dem ChloroCheck® Chloridmeter (Wescor, Utah, USA) bestimmt. Eine Mindestmenge von 15 µl Schweiß ist notwendig. Das Chloridmeter arbeitet nach dem Prinzip der coulometrischen Titration. Um den Qualitätsstandard und die Messgenauigkeit des Chloridmeters zu sichern, werden tägliche Chloridbestimmungen anhand von Standardlösungen mit einem definierten Chloridgehalt durchgeführt (23±2 mmol/l, 47±4 mmol/l und 98±8 mmol/l). Zudem erfolgte vor jeder Messung eine erneute Überprüfung mit einer Standardlösung von 100 mmol/l Cl^-.

Abbildung 2-2 Macroduct Sweat Collector

Die Ergebnisse des Chloridgehaltes werden in folgende klinische Kategorien eingeordnet (Naehrlich et al. 2013):

≤Bis 29 mmol/l Cl^-	unauffällig, Mukoviszidose unwahrscheinlich
≥30-59 mmol/l Cl^-	kontrollbedürftig,
≥ 60 mmol/l Cl^-	auffällig= vereinbar mit der Diagnose Mukoviszidose

2.5 Cotininbestimmung im Urin

Cotinin ist ein essentieller Nikotinmetabolit. Mit geringen Schwankungen durch Geschlecht, untersuchtem Gewebe und Anzahl der Zigaretten pro Tag hat Cotinin eine Halbwertszeit von ca. 20 Std. Bei Nikotin liegt dies bei ca. 2 Std. (Benowitz and Jacob 1994). Cotinin wird in der Leber durch CYP2A6 (Cytochrom P450, Family 2, Subfamily A, Polypeptide 6) oxidiert und ist im Speichel, Plasma und Urin nachweisbar. Eine Untersuchung mit Selbstauskunft über den Nikotinkonsum und Cotinin-Messung konnte zeigen, dass der Gehalt an Cotinin sowohl im Urin als auch im Speichel gut zwischen Raucher und Nicht-Rauchern differenziert. Zudem korreliert die Höhe des Cotinin-Spiegels im Urin mit der Schwere des Nikotinkonsums (Benowitz and Jacob 1994). Da die Gewinnung von Urin im klinischen Setting deutlich einfacher durchzuführen ist und bei der o.g. Studie auf hohe Akzeptanz stieß, wurde in dieser

Arbeit die Urin-Cotininbestimmung zur Objektivierung des Rauchverhaltens durchgeführt.

Die Studienteilnehmer wurden nach der Schweißtest-Untersuchung gebeten eine Urinprobe abzugeben. Anschließend wurde die Kreatinin-Konzentration des Urins mittels Jaffé-Reaktion in unserem hiesigen Labor bestimmt. Der Rest des Urins wurde portioniert und bei -70°C eingefroren. Eine Untersuchung aus dem Jahre 1995 zeigte, dass die Bestimmungen der Parameter Cotinin und Kreatinin auch nach 11 Jahren zuverlässig möglich ist (Riboli et al. 1995).

Nach Abschluss der Rekrutierung aller Probanden wurden die Urinproben anhand des Cotinin-ELISA Kits der Firma Abnova, Taipeh, Taiwan auf ihren Cotiningehalt untersucht. Die Cotinin-Konzentration wird entsprechend der Absorption bei 405 nm Wellenlänge im Verhältnis zu definierten Standardkonzentrationen photometrisch abgelesen.

Cotinin wurde in Relation zum Kreatinin-Wert gesetzt. Angelehnt an bisherige Veröffentlichungen wurden zwei Kategorien festgelegt: <100 ng Cotinin/mg Kreatinin und >200 ng/mg. Letztere Kategorie entspricht Werten aktiver Raucher mit einem Konsum von >10 Zigaretten/Tag. Bei Werten <100 ng/mg ist von Nichtrauchern auszugehen, Werte zwischen 50 und 100 ng Cotinin/mg Kreatinin wurden bei Passivrauchern, v.a. durch Exposition im häuslichen/beruflichem Umfeld, gefunden (Riboli et al. 1990, Riboli et al. 1995).

In dieser Arbeit werden als **Nichtraucher** Teilnehmer mit Werten <100 ng/mg Cot/Krea und **Raucher** mit Werten > 200 ng/mg definiert.

2.6 Nasale Potentialdifferenzmessung (nPD)

Die nasale Potentialdifferenzmessung (nPD) dient als *in vivo* Messverfahren zur funktionellen Diagnostik der einer Mukoviszidose zugrunde liegenden Ionentransportstörung. Sie wird in der klinischen Routine bei Patienten eingesetzt, bei denen durch Anamnese, Schweißtest und Mutationsanalyse keine genaue diagnostische Einordnung möglich ist. Die Messung stellt hohe Ansprüche an die Mitarbeit des Patienten und ist daher erst bei Kindern ab dem Grundschulalter durchführbar (Naehrlich et al. 2013).

Bei der nPD wird eine Spannungsdifferenz am nasalen respiratorischen Epithel gemessen. Hierbei befindet sich eine Elektrode an der Schleimhaut des Nasenbodens und eine Referenzelektrode in der Subkutis am Oberarm, welche isoelektrisch zur Submukosa der Nasenschleimhaut ist (ECFS Diagnostic Network Working Group 2013).

Aufgrund aktiver und passiver Ionentransportprozesse am respiratorischen Epithel kommt es zu einem Spannungsunterschied zwischen der mukosalen und serosalen Seite des Epithels. Hierbei spielt die Natriumabsorption durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und eine Chloridsekretion mittels *CFTR* und alternativer Chloridkanäle eine vorherrschende Rolle. Beide Transportprozesse führen dazu, dass sich ein lumen-negatives Potential aufbaut.

Zweck der nasalen Potentialdifferenzmessung (nPD) ist es, diesen Spannungsunterschied zu messen und im weiteren Verlauf der Messung so zu beeinflussen, dass man eine Aussage über die Funktion einzelner Ionentransportprozesse treffen kann. Nach Aufzeichnung der Ausgangswerte wird die Natriumabsorption des epithelialen Natriumkanals mittels Amilorid geblockt. Im Anschluss daran, wird der osmotische Gradient für Chlorid massiv erhöht, indem auf der mukosalen Seite eine Chlorid freie Lösung perfundiert wird. Im weiteren Verlauf der Messung wird dieser Lösung Isoproterenol zugesetzt, welches die cAMP-Konzentration innerhalb der Epithelzelle erhöht und somit den *CFTR*-Kanal stimuliert. Zum Ende der Messung wird der Lösung zusätzlich ATP beigefügt, welches über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer Aktivierung der alternativen Chloridkanäle führt.

Der Verlauf der Messkurve weist bei Gesunden und Mukoviszidose-Patienten charakteristische Unterschiede auf. Bedingt durch die bei Mukoviszidose vorliegende Natriumhyperabsorption findet man bei CF-Patienten ein negativeres Ausgangspotential und im weiteren Verlauf eine stärkere Depolarisation nach Gabe von Amilorid. Aufgrund des defekten *CFTR* bei CF lässt sich im weiteren Versuchsablauf keine nennenswerte Chloridsekretion nach Perfusion von Chlorid-armer Lösung und Isoproterenol herbeiführen, während es bei Gesunden zu einer durch Ausströme von Chlorid hervorgerufenen Repolarisation des Epithels kommt (siehe auch Abb.2.3).

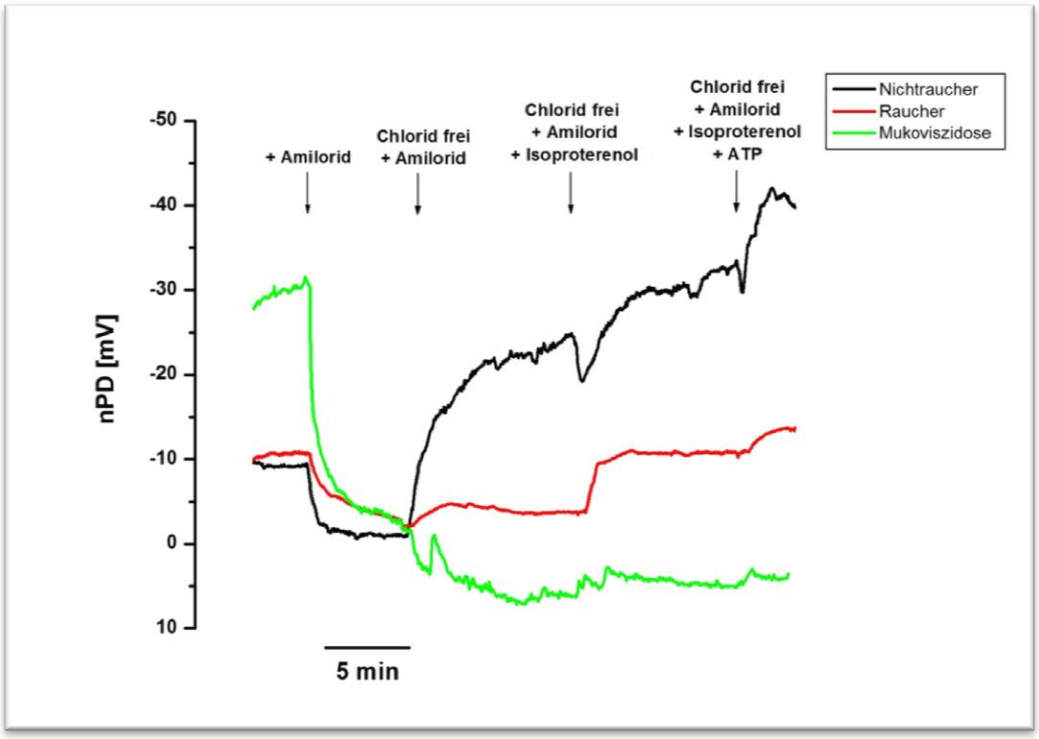

Abbildung 2-3 nPD-Messkurven des eigenen Kollektivs; Mukoviszidosepatient aus eigenen Voruntersuchungen

Die Durchführung der nPD erfolgte in dieser Studie nach der SOP Version 1.8 (ECFS Diagnostic Network Working Group 2013).

2.6.1 Versuchsaufbau nPD

Im Vorfeld jeder Messung wurden die Perfusionslösungen und Agargelbrücken der Mess- und Referenzelektrode semisteril hergestellt.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	148
$CaCl_2 * 2 H_2O$	2,25
KCl	4,05
K_2HPO_4	2,4
KH_2PO_4	0,4
$MgCl_2 * 6 H_2O$	1,2

Tabelle 2-2 Zusammensetzung der Basislösung (A)

Der pH-Wert der Basislösung wurde mittels 1N NaOH oder 1N HCl auf 7,4 eingestellt

Lösung	Abkürzung	Inhalt	Abkürzung
Basislösung	Basal	Gepufferte NaCl-Lösung	A
Basislösung + Amilorid	Amil	0.1 mM Amilorid-HCl in Lösung A	B
Cl^--freie Lösung + Amilorid	Free Cl^-	0.1 mM Amilorid-HCl in Cl^--arme Lösung	C
Cl^--freie Lösung + Amilorid + Isoproterenol	Iso	0.01 mM Isoproterenol-HCl in Lösung C	D
Cl^--freie Lösung + Amilorid + Isoproterenol + ATP	ATP	0.1 mM ATP in Lösung D	E

Tabelle 2-3 Verwendete Lösungen in der nPD

Substanz	Konzentration [mM]
Na^+-Gluconat	148
Ca^{2+}-Gluconat	2,25
K^+-Gluconat	4,05
K_2HPO_4	2,4
KH_2PO_4	0,4
$MgSO_4 * 7 H_2O$	1,2

Tabelle 2-4 Zusammensetzung der chloridfreien Lösung

Der pH-Wert der Lösung wurde mittels 1N NaOH oder 1N HCl auf 7,4 eingestellt.

Nach der Herstellung wurden die Lösungen mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert und bis zur Verwendung nach spätestens 30 Tage im Kühlschrank gelagert.

Am Tag der Messung wurden die Lösungen in Injektionsspritzen á 50 ml gefüllt, Isoproterenol und ATP unmittelbar vor der Untersuchung zugesetzt. Die gefüllten Spritzen wurden in Perfusorpumpen (Perfusor® Space, Braun, Melsungen) eingespannt und über Schläuche und 3-Wege-Hähne mit dem nichtmarkierten Lumen des Messkatheters verbunden.

Als Messelektrode wurde ein doppel-lumiger Marquart-Katheter und als Referenzelektrode eine 23 G Butterflynadel mit Luer-Lock-Schlauchadapter verwendet. Sowohl das markierte Lumen des Katheters als auch die Butterflynadel mit Schlauch wurden mit einer 3 %igen Agarlösung befüllt. Hierfür wurden 3 g Agar und 100 ml Basislösung (A) auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren aufgekocht und anschließend mit Hilfe einer sterilen Spritze befüllt. Nach dem Abkühlen wurden die Agargelbrücken einzeln in sterilen Behältern mit Basislösung (A) bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Das mit Agar gefüllte Lumen des Messkatheters wurde für die Messung in einem Becherglas mit 3 M KCl-Lösung fixiert und über eine Silberelektrode (Kalomel-Elektrode) elektrisch mit der Headstage (ISO-Z Isolation Headstage für BMA-200, AD Instruments) verbunden. Analog wurde mit dem Agar-gefüllten Schlauchende der Referenzelektrode verfahren. Die Headstage wurde über einen Vorverstärker an ein Powerlab angeschlossen, welches die Daten in digitalisierter Form an einen Computer weitergeleitet hat, wo sie kontinuierlich aufgezeichnet wurden (Abbildung 2.4)

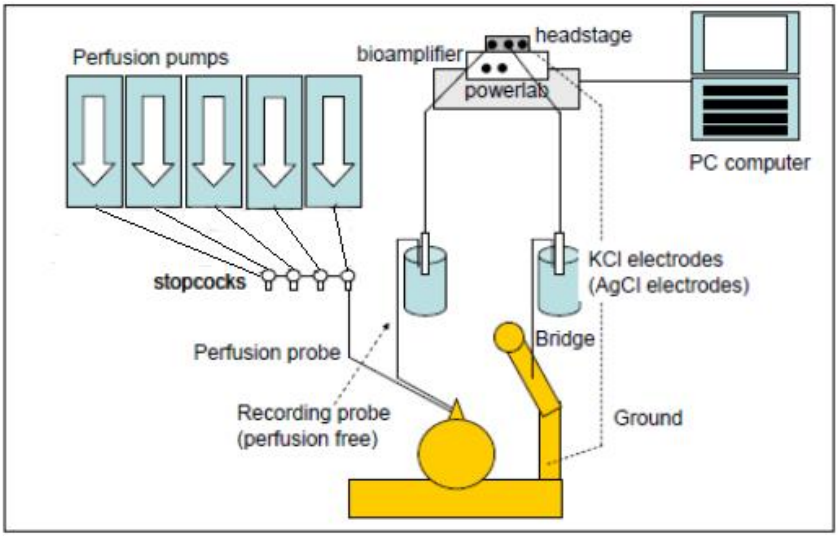

Abbildung 2-4 Schematischer Versuchsaufbau der nPD, anlehnend an die Abbildung aus (Therapeutic Develoment Network Coordinating Center 2009)

2.6.2 nPD Versuchsdurchführung

Vor Beginn der Messung wurden die Elektroden und Agargelbrücken auf ihre Funktionstüchtigkeit überprüft. Hierzu wurden beide Kalomel-Elektroden in denselben Behälter mit 3 M KCl platziert. War das Eigenpotential der Elektroden kleiner ± 2,5 mV, wurde mit der Messung fortgefahren. In einem zweiten Schritt wurden die selbst hergestellten Gelbrücken auf ihre elektrische Leitfähigkeit getestet. Hierzu wurde das mit Agar gefüllte Lumen des Marquart-Katheters sowie das Schlauchende der Referenzelektrode jeweils mit der entsprechenden Kalomel-Elektrode in einen Behälter mit 3M KCl fixiert. Die Butterfly-Nadel sowie die Spitze des Marquart-Katheters wurden zusammen in einen Behälter mit Basislösung (A) eingetaucht. War dieser *closed-loop-offset* im Bereich von ±2,5 mV, wurde das Offset-Potential mit Hilfe des Offset-Knopfes am Verstärker auf 0 korrigiert, um kleine Unterschiede der Versuchsbedingungen auszugleichen.

Abbildung 2-5 Proband bei der nasalen PD Messung

Nach dieser Überprüfung des Setups wurde der Proband gebeten, Platz zu nehmen und seinen Kopf in eine Kopfstütze zu legen, um eine ruhige und entspannte Haltung während der Messung zu gewährleisten (Abb. 2-5). Mit einem Otoskop wurde die Nasenschleimhaut inspiziert und eventuelle Verletzungen, Rötungen, Polypen, Ulcera oder Ödeme wurden entsprechend ihres Schweregrades dokumentiert. Die mit Agar gefüllte Butterfly-Nadel der Referenzelektrode wurde nach Desinfektion des Hautareals am Oberarm subkutan angebracht und dort mit Pflaster fixiert. Die Perfusion der Basislösung wurde mit 80 ml/h gestartet, der Proband nahm zunächst den Messkatheter zwischen Daumen und Zeigerfinger. Der so bestimmte Finger-Wert stellt die Spannungsdifferenz zwischen Fingerspitze des Probanden und der subkutanen Referenzelektrode dar. Er sollte Werte ≤ -30 mV aufweisen und dient einer letzten Validierung des Versuchsaufbaus. Um den optimalen Punkt für die Messung zu finden, wurde der Messkatheter 6 cm entlang des Nasenbodens in das rechte Nasenloch eingeführt, dann langsam zurückgezogen und die Stelle mit der höchsten Potentialdifferenz notiert. Die gleiche Prozedur wurde im Anschluss am linken Nasenloch durchgeführt, wobei immer das mit Agar gefüllte Ende des Messkatheters der Nasenschleimhaut anlag. Der Katheter wurde an der Stelle der höchsten Potentialdifferenz mit Pflaster fixiert und die Durchflussgeschwindigkeit der Basislösung (A) auf 300 ml/h erhöht. Anschließend wurde solange gewartet, bis sich ein stabiles Plateau eingestellt hatte (weniger als +/- 1 mV Änderung der Spannung innerhalb von 30 sec) und dann auf die Basislösung + Amilorid (Lösung B) zur Blockade der epithelialen Natriumkanäle, mittels eines 3-Wege-Hahnes, umgestellt. Die Amilorid-Lösung musste mindestens 3 Minuten perfundiert werden, jedoch mussten auch hier, vor dem Umstellen auf chloridfreie Lösung (C), die Stabilitätskriterien erfüllt sein. Die Reaktion auf Chlorid-freie Lösung und folgend auch

auf Chlorid-freie Lösung + Isoproterenol (D) musste mindestens 5 Minuten aufgezeichnet werden. Zum Schluss wurde auf ATP (E) umgestellt und die Werte für mindestens 1 Minute oder dem Erreichen eines transienten Peaks aufgezeichnet. Nach Ende der Messung am rechten Nasenloch wurde die Durchflussgeschwindigkeit der Basislösung wieder auf 80 ml/h reduziert und erneut der Finger-Wert registriert. Anschließend wurde der gesamte Messablauf auch am linken Nasenloch durchgeführt. Hier wurde zum Abschluss neben dem Finger-Wert auch noch der Closed-loop Wert aufgezeichnet.

2.6.3 Auswertung nPD

Tabelle 2.5 gibt die Wirkung der einzelnen Stoffe sowie deren Interpretation für die nPD wieder. Hierzu wurde der Mittelwert der Spannung über die letzten 10 sec vor jedem Lösungswechsel gebildet Zur Bestimmung des Δ-Wertes wird die Differenz der Mittelwerte aus den aufeinanderfolgenden Lösungen gebildet. Lediglich bei Δ ATP wird der maximal erreichte Peak verwendet.

Wert/Lösung	**Funktion**
Basale PD	Ausdruck des globalen Ionentransportes an der Epithelzelle
Amilorid-Lsg.	Spezifischer Blocker des epithelialen Natriumkanals (ENaC)
Chlorfreie-Lsg.	Indirekte Stimulation der Chloridsekretion nach ENaC
Isoproterenol	ß-Agonist: Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit *CFTR*-Aktivierung
$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$	Synonym: Wiederanstieg Beurteilung der *CFTR*-spezifischen Chloridsekretion, Maß der *CFTR*-Aktivität
ATP	Stimulation der nicht *CFTR*-anhängigen Chloridsekretion
Δ ATP	Beurteilung der epithelialen Integrität

Tabelle 2-5 Lösungen und Werte mit entsprechender Wirkung bzw. Aussage, nach (Knowles et al. 1995)

Zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion wird $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ eingesetzt.

Zur Diagnosestellung bzw. zum Ausschluss einer Mukoviszidose stehen mehrere Berechnungen zur Verfügung. Vor deren Berechnung wurde die gesamte nPD-Messung analysiert. Hierzu wurde der Mittelwert der Spannung über die letzten 10 sec vor jedem Lösungswechsel ermittelt und anschließend dieser für die weiteren Berechnungen verwendet.

1. **$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$,** auch Wiederanstieg genannt, wird als eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden zur Bestimmung des *CFTR*-abhängigen Ionentransportes angesehen (Rowe et al. 2011). Hierbei wird die absolute Differenz zwischen der Potentialdifferenz bei Amilorid und nach Chlorid-armer Lösung + Isoproterenol berechnet. Ein Wert < -12 mV wird als normwertig (normale *CFTR*-Funktion), ein Wert > -7,7 mV als pathologisch (fehlende *CFTR*-Funktion) und Werte zwischen -7,7 und -12 mV Wiederanstieg als kontrollbedürftig (Keenan et al., 2015) angesehen. Hierbei kann zwischen dem Mittelwert aus den beiden Nasenhälften (**$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$**_Average) und dem besten Wiederanstieg ($\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best), der das bessere Ergebnis aus einem der beiden Nasenhälften ist, unterschieden werden. In den meisten Publikationen wird der gemittelte Wiederanstieg genutzt. Es gibt aber auch Hinweise, dass der Einsatz des besten Wiederanstieges Vorteile bei der Diagnosestellung haben könnte (Keenan et al. 2015).
2. Der **Wilschanski-Score** wird mit der Formel $e^{(\Delta FreeCl + \Delta Iso / \Delta Amilorid)}$ beschrieben. Ein Wert > 0,7 ist hier pathologisch im Sinne einer *CFTR*-Dysfunktion (Wilschanski et al. 2001).
3. Der **Sermet-Score** lautet: -0,11ΔFreeCl-Iso-0.05Δ Amilorid. Ein Wert > 0,27 spricht für eine intakte *CFTR*-Funktion und macht somit das Vorliegen einer Mukoviszidose unwahrscheinlich, ein Wert < 0,27 spricht für Mukoviszidose (Sermet-Gaudelus et al. 2010).

Probanden, deren nPD-Messung auf keiner der beiden Nasenseiten normwertige Ergebnisse des Wiederanstieges aufwiesen oder einen pathologischen Wilchanski-Scores hatten, wurden - sofern sie einverstanden waren - einer erneuten Messung zeitversetzt unterzogen, um etwaige Einflüsse, z.B. von unterschwelligen respiratorischen Infektionen, auszuschließen. Bei dieser 2. Messung wurden auch Cotinin- und Kreatinin im Urin erneut bestimmt.

2.7 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)

2.7.1 Allgemein

Die Ussing Kammer ist ein wissenschaftliches Hilfsmittel, um den Kurzschlussstrom zu messen, das als Indikator für den Netto-Ionentransport an Epithelien dient. Eine Ussing-Kammer besteht aus zwei Hälften, deren einzige Verbindung das zwischen ihnen eingespannte Epithel ist. Epithelien sind von Natur aus polar, d.h. sie haben eine mukosale und eine serosale Seite. In einer Ussing-Kammer ist es möglich, die mukosale von der serosalen Seite zu isolieren und so gezielt Ionentransporter zu beeinflussen. Die beiden Kammerhälften werden mit der gleichen Menge an Ringerlösung befüllt um chemische, mechanische oder elektrische Triebkräfte zu minimieren. In jedem Epithel findet Ionentransport von der mukosalen zur serosalen oder umgekehrt statt. Durch diesen Ionentransport entsteht eine Potentialdifferenz über das Epithel. Dieser Spannungsunterschied wird über zwei gewebsnahe Spannungselektroden gemessen. Bei der intestinalen Kurzschlussstrommessung wird dieser Spannungsunterschied kurzgeschlossen (auf 0 „geklemmt“). Hierzu injizieren zwei gewebsferne Stromelektroden genau so viel Strom, dass die Spannung 0 mV beträgt. Dieser Stromanteil, der injiziert wird, wird Kurzschlussstrom (Isc) genannt und spiegelt exakt den Netto-Ionentransport über das Epithel wieder. Laut Vorzeichenkonvention drückt sich ein Nettotransport positiver Ladungen von der mukosalen zur serosalen Seite bzw. ein Nettotransport von negativen Ladungen in die umgekehrte Richtung im Kurzschlussstrom als positiver Wert aus. Der Wert der transepithelialen Spannungsdifferenz bezieht sich auf die Oberflächenladung der mukosalen Membran und nimmt somit einen negativen Wert an.

2.7.2 Entnahme der Rektumbiopsien

Zur Entnahme der oberflächlichen Rektumsaugbiopsien wurde die Zange Willital (UE7605); Ulrich GmbH, Ulm, Germany genutzt. Pro Studienteilnehmer wurden 4-6 Biopsate entnommen. Vor Entnahme wurde sichergestellt, dass kein Ausschlusskriterium besteht. Als solches sind Gerinnungsstörungen sowie Hämorrhoiden definiert, um dem erhöhten Blutungsrisiko Rechnung zu tragen. Nachdem die Saugbiopsiekapsel in den Anus eingeführt wurde, wurde über ein mit der Biopsiezange verbundenes Manometer ein Unterdruck angelegt. Durch die zwei Öffnungen in der Saugbiopsiekapsel, wurde die Rektumschleimhaut mit einem

Saugdruck von 100 - 200 mbar angesaugt und anschließend durch die Schneidevorrichtung abgetrennt. Eine Sedierung der Probanden war nicht notwendig, da die Proben ca. 3-4 cm oberhalb der externen Schließmuskulatur entnommen wurden und entsprechend (bei fehlender sensibler Innervation) keine Schmerzen zu erwarten waren.

Die Proben wurden nach der Entnahme sofort in eine eisgekühlte Lösung, bestehend aus Dulbeccos Phosphatgepufferter NaCl-Lsg. und Indomethacin mit einer Endkonzentration von 10 µM, überführt. Unmittelbar nach Ende der Biopsieentnahme wurden die Proben ins Labor überführt und mit der Messung in der Ussing-Kammer begonnen, um mögliche Gewebsschäden durch Lagerung zu minimieren.

2.7.3 ICM Versuchsaufbau

Die Durchführung der ICM erfolgte nach den SOP der European Cystic Fibrosis Society-Therapeutic Development Network (ECFS Diagnostic Network Working Group 2011), Version 2.7, welche auf dem Protokoll der Arbeit von Hugo De Jonge (De Jonge et al. 2004) basiert.

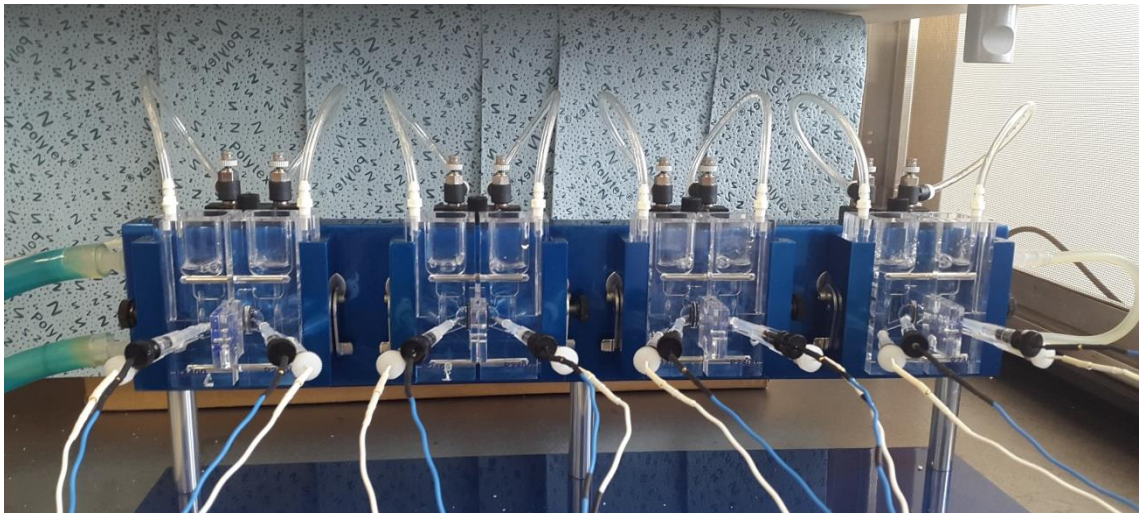

Abbildung 2-6 Ussing Kammer mit 4 Kammern

Wir setzten die Ussing-Kammer EM-CSYS-4 mit 4-Kammersystem von Physiologic Instrument, San Diego, USA ein (Abb. 2-6). Um eine physiologische Temperatur von 37 °C während der Messung aufrecht zu erhalten, wurde das Kammersystem an ein Wasserbad (Julabo,Seelbach, Germany) mit Wasserpumpe (Lauda Eco Silva, Lauda-

Königshofen, Germany). Zur angeschlossen Abschirmung elektromagnetischer Störungen befindet sich die Ussing-Kammer in einem Faraday-Käfig.

Die Elektroden für die Messung bezogen wir ebenfalls von Physiologic Instruments, San Diego, USA (Easy Mount Electrode Set P2020). Die Spitzen der Elektroden wurde mit 3 M KCl-Agar befüllt, mit 3 M KCl überschichtet und luftblasenfrei mit einer Ag/AgCl-Elektrode verschraubt. Zur Lagerung der fertigen Elektroden, wurden zur Verhinderung einer Austrocknung die Spitzen in ein Becherglas mit 3 M KCl gestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Unter Verwendung einer Stereolupe wurden die Biopsate entsprechend ihrer Größe entweder auf einem Slider mit einer messbaren Fläche von 0,018 cm² (P2407C) oder 0,011 cm² (P2407B) platziert und in die Ussing-Kammer eingespannt.

Anschließend wurden gewebsnah die Spannungselektroden und gewebsfern die Stromelektroden angebracht. Jede Kammerhälfte wurde mit 2 ml Meyler-Puffer (Tab. 2-7) befüllt und mit Carbogen begast (95 % O_2 + 5 % CO_2). Die Elektroden wurden über das DM MC6 Single Channel Electrode Input Module (Physiologic Instruments) mit dem voltage-clamp Verstärker VCC MC4 (Physiologic Instruments) verbunden. Der Verstärker wiederum war mit dem PowerLab 8/30 konnektiert, welcher mit Hilfe der LabChart® Software, Version 7.2, ADInstruments Pty Ltd., Oxford, UK auf einem Computer die Messung registrierte.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	128
$CaCl_2 * 2 H_2O$	1,3
KCl	4,07
HEPES	10
Na_2HPO_4	0,3
NaH_2PO_4	0,4
$MgCl_2 * 6 H_2O$	1,0
$NaHCO_3$	20,2

Tabelle 2-6 Zusammensetzung des Meyler-Puffer für ICM

Vor der Entnahme der Biopsate, wurden die Pufferlösungen fertiggestellt und auf Eis bzw. im Wasserbad bei 37 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.4 Versuchsdurchführung ICM

Vor der Messung an Biopsaten wurde die Ussing-Kammer mit leeren Slidern bestückt, zusammengebaut und die Elektroden angeschlossen. Auf 37 °C vorgewärmter Meyler-Puffer wurde in die Kammern gegeben, die Begasung mit Carbogen gestartet. Nach einer Equilibrierungsphase von mindestens 30 Minuten, wurden im Open-circuit-Modus das Eigenpotential der Elektroden und der Widerstand des Systems korrigiert.

Nach Entnahme der Biopsien wurden diese zwischen den entsprechenden Slidern positioniert und in die vorgewärmte Ussing-Kammer platziert. Um durch die lange Untersuchungsdauer der ICM eine vorzeitige Gewebsschädigung zu vermeiden, wurden alle Kammern durch die gesamte Untersuchung mit Carbogengas (95% O2/5% CO2) versetzt. Lab Chart wurde gestartet und für 5 Minuten die transepitheliale Potentialdifferenz im open-circuit Modus aufgezeichnet. Am Ende des Zeitraumes wurde ein kurzer Strompuls von 15 µA gegeben und über das Ohm'sche Gesetz der Widerstand des Gewebes berechnet. Betrug der Widerstand mindestens 10 Ω * cm², wurde die Messung fortgesetzt, ansonsten die entsprechende Biopsie gegen eine neue Biopsie ausgetauscht. Am Verstärker wurde der Modus auf voltage-clamp umgestellt. Von diesem Zeitpunkt an wurde das transepitheliale Potential auf 0 mV geklemmt und der Kurzschlussstrom (Isc), der hierfür nötig war, wurde aufgezeichnet. Nach weiteren 5 Minuten wurde auf der serosalen Seite der Kammer Carbachol in einer Endkonzentration von 100 µM appliziert. Carbachol führt zu einer Öffnung der serosalen Kaliumkanäle. Durch die dadurch entstandene elektrische Triebkraft in der Zelle kommt es konsekutiv zu einer transienten, cholinerg getriggerten Chlorid-Sekretion. Dieser Schritt dient zur Überprüfung der zellulären Integrität: Falls keine Reaktion auf Carbachol zu sehen ist, muss entsprechend der SOP die Biopsie ersetzt werden. Zum Auswaschen des Carbachols aus dem Gewebe, wird der Meyler-Puffer in der Ussing-Kammer 3 Mal im Abstand von 10 Minuten erneuert. Zur Hemmung des epithelialen Natriumkanals wurde Amilorid (100 µM) auf der mukosalen Seite hinzugegeben. Im nächsten Schritt folgte nach 5 min die Stimulation der Chloridsekretion mittels Forskolin (10 µM) und IBMX (100µM), welche sowohl mukosal als auch serosal appliziert wurden. Forskolin führt durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zu einer Aktivierung des CFTR-Kanals. Die gleichzeitige Gabe

von IBMX, einem Phosphodiesterase-Inhibitor, verlangsamt den Abbau von cAMP in der Zelle. Nach weiteren 10 Minuten wurde auf beide Seiten des Epithels der CFTR-Potentiator Genistein (10 µM) zugegeben. Nun folgte wiederum serosal Carbachol in einer Konzentration von 100 µM. Zur Hemmung des nicht CFTR-vermittelten Chloridtransportes wurde 200 µM DIDS (4,4-Diisothiocyano-2,2-stilbenedisulfonic acid) mukosal eingesetzt. Zum Ende der Messung wurde Histamin (500 µM) auf der serosalen Seite appliziert, um die Ca^{2+}-gesteuerte Chloridsekretion zu reaktivieren.

Zum Schluss der Messung wurde zur erneuten Überprüfung des Setups und der Elektroden in den open-circuit Modus gewechselt, die Potentialdifferenz abgelesen und der Widerstand des Gewebes mittels eines Strompulses bestimmt.

2.7.5 Auswertung ICM

Folgende Kriterien müssen für eine valide Messung erfüllt sein: Der Gewebswiderstand sollte ≥ 10 Ω * cm² sein und im Verlauf der Messung das Gewebe mindestens auf eine Substanz eine Reaktion gezeigt haben.

In Voruntersuchungen wurde als bester Marker zur Differenzierung von Patienten mit klassischer CF, pakreassuffizienter CF und nicht-CF die Summe der Änderung des Kurzschlussstromes nach Applikation von Forskolin / IBMX, Carbachol und Histamin= ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) angesehen (Derichs et al. 2010). Bei 4 bis 6 verwertbaren Messungen pro Patient wurde ein Mittelwert für ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) über alle SOP konformen Messungen des jeweiligen Probanden gebildet. Dabei werden aufgrund der unterschiedlichen Messfläche der verwendeten Slider die einzelnen Werte zuvor auf µA/cm² normalisiert.

Anhand einrichtungseigener Normwerte wurden folgende Grenzwerte genutzt:

ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) > 39,6 µA/cm² = intakte *CFTR*-Funktion, CF unwahrscheinlich

ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) <39,6 µA/cm², Mukoviszidose wahrscheinlich.

2.8 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
$CaCl_2$	Merck, Darmstadt
KCl	Merck
$MgCl_2$	Merck
HEPES	Roth, Karlsruhe
Na_2HPO_4	Sigma Aldrich
NaH_2PO_4	Sigma Aldrich
$NaHCO_3$	Sigma Aldrich
D-Glucose	Merck
Indometacin	Sigma Aldrich
Amilorid HCl - USP	Sigma Aldrich
Forskolin	Sigma Aldrich
IBMX	Sigma Aldrich
Genistein	Sigma Aldrich
Carbachol	Sigma Aldrich
DIDS	Sigma Aldrich
Histamin	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma Aldrich
Ethanol	Roth

Tabelle 2-7 Chemikalien und Pharmaka für nPD und ICM

2.9 Datenverarbeitung und Statistik

Alle Messdaten aus der Cotinin-, Kreatinin, Schweißchlorid, nasale Potentialdifferenz- und intestinale Kurzschlussstrom-Messung sowie die Gesundheitsdaten der Probanden wurden in die SPSS-Datenbank eingegeben. Alle Auswertungen fanden mit der SPSS-Statistik, Version 23.0.0.0; IBM; Armonk, USA statt. Die Darstellungen aus der nPD und ICM (Abb. 2.3) wurden mit dem Programm OriginLab (Version 6.1, Northampton, USA) bearbeitet.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die deskriptive Statistik sowie Boxplot-Graphiken eingesetzt. Alle Daten wurden auf Normalverteilung untersucht. Bei nicht-normalverteilten Variablen wurde der Median sowie der Interquartilbereich angegeben. Hierbei gibt n den Stichprobenumfang an. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U Test, bzw. dem Kruskal-Wallis Test auf Signifikanz

geprüft. Das Signifikanzniveau lag bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5%, entsprechend $p \leq 0,05$. Der exakte Fisher Test wurde zum Vergleich von Probanden mit Werten im pathologischen, kontrollbedürftigen und normwertigen Bereich für Mukoviszidose genutzt. Dabei geben Balken über den Boxplots, sofern vorhanden, das Signifikanzniveau wieder.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungskollektiv

Im Rahmen dieser Dissertation wurden insgesamt 32 Probanden untersucht. Bei 31 Teilnehmer (97%) konnten alle vorgesehenen CFTR-Funktionsuntersuchungen durchgeführt werden.

Die Probanden setzten sich aus 18 Männer im Alter von 19 bis 57 Jahre und 14 Frauen im Alter 20 bis 57 Jahre zusammen. Der Alters-Median bei den Männern betrug 24,0 Jahre, bei den Frauen 24,5 Jahren.

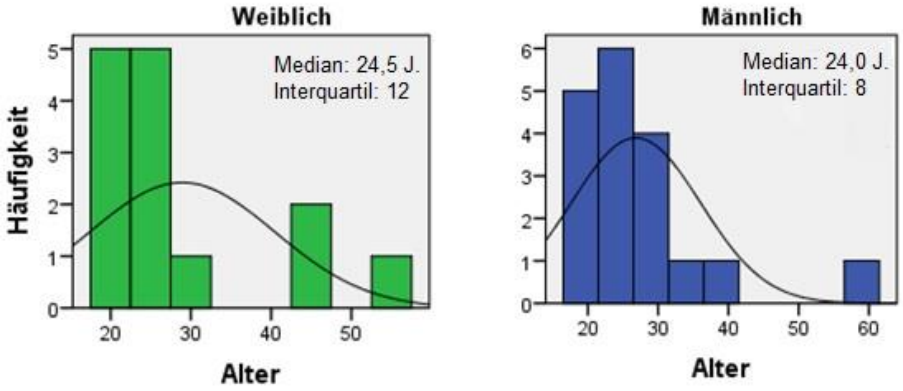

Abbildung 3-1 Altersverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Altersverteilung beider Geschlechter wurde auf Normalverteilung untersucht: Beim Shapiro-WilkTest wurde eine Signifikanz von 0,000 für Männer sowie eine von 0,001 bei Frauen gezeigt, somit konnte eine Normalverteilung nicht bestätigt werden.

3.1.2 Anamnestischer Zigarettenkonsum

Das Rauchverhalten wurde vom Kollektiv wie folgt berichtet: 17 Probanden berichteten nicht zu rauchen (53%), entsprechend 15 gaben täglichen Zigarettenkonsum an (47%).

3.2 Cotininmessung im Urin

Zur Objektivierung des Rauchverhaltens wurde bei allen Teilnehmern der Cotinin/Kreatinin-(Cot/Krea)-Quotient gemessen. Bei der Anwendung anhand der Referenzwerte mit <100 ng/mg für Nichtraucher und >200 ng/mg für Raucher (Riboli et al. 1990) zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung gegenüber den anamnestischen Angaben (Abb. 3-2).

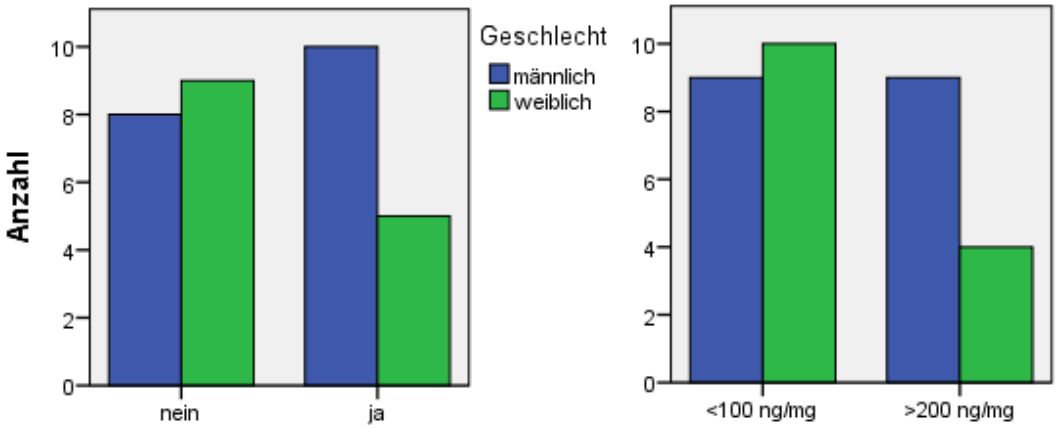

Abbildung 3-2 Anamnestische Nikotinbelastung links versus Raucherstatus nach Cotinin/Kreatinin Quotient rechts; die Y-Achse entspricht Anzahl der Probanden

69 % des Raucherkollektivs sind Männer, der Anteil von Frauen bei den Nichtrauchern war 53%.

Aktiver Nikotinkonsum	**Cotinin-Kreatinin Quotient im Urin (ng/mg)**		
	<100	**≥100 bis ≤200**	**>200**
Nein	17	0	0
Ja	2	0	13

Tabelle 3-1 Raucherstatus nach Cotinin Krea Quotient versus anamnestisch berichteter aktiver Nikotinbelastung

Teilnehmer, die keinen aktiven Nikotinkonsum berichteten, hatten alle einen Cot/Krea < 100 ng/mg. Dies war auch unabhängig davon, ob sie Passivrauch ausgesetzt waren ober nicht.

13 der 15 Probanden, die über aktiven Zigarettenkonsum berichteten, lagen über dem Wert von > 200 ng/mg Cot/Krea. Bei den Studienteilnehmern 13 und 14 waren

Cot/Krea Werte von 18 bzw. 57 ng/mg zu messen, welche im Bereich von Nichtrauchern lagen (=< 100 ng/mg)(Tab. 3-1). Diese beiden berichteten, 5-6 Zig./Tag in der Woche sowie 10-15/Tag an den Wochenenden bzw. 5 Zig./Tag und 10/Tag an den Wochenenden zu rauchen.

Die Unterteilung des Kollektivs in dieser Studie erfolgte anhand des Cotinin/Kreatinin Quotienten in Raucher und Nichtraucher, da er uns über die tatsächlich aufgenommene Zigarettenrauchmenge des Organismus mehr Auskunft gab. Lediglich bei der Passivrauch-Exposition wurde aufgrund fehlender Grenzwerte die Unterteilung nach anamnestischen Angaben durchgeführt.

3.3 Gesundheitsangaben

Anlehnend an die SOP ICM wurden anhand des Fragebogens 1 Angaben zur aktuellen Gesundheitssituation der Eigen- und Familienanamnese erfragt. Insbesondere wurden respiratorische und atopische Erkrankungen sowie medikamentöse Therapien festgehalten, aber auch nach einer Mukoviszidose-Erkrankung in der Familie gefragt. Die Tabelle 2 stellt die Antworten zusammen.

	Alter Median	**Raucher n (%)**	**Nichtraucher n (%)**			**n aller TN (%)**
			mit PR	ohne PR	**∑ NR* (%)**	
Männlich	24,0	9 (69)	4 (50)	5 (45)	9 (47)	18 (56)
Weiblich	24,5	4 (31)	4 (50)	6 (55)	10 (53)	14 (44)
Allergien		4	2	3	5	9
ARC		2	1	3	4	6
Chronische Rhinitis		0	0	1	1	1
Adenoide		1	1	1	2	3
Akuter IDOL		2	1	0	1	3
HNO-OP		3	3	1	4	7
Lungenerkrankung		0	0	0	0	0
Mukoviszidose in Familie		0	0	0	0	0
Hepatopathie		0	0	0	0	0
Hämorrhoiden		0	0	1	1	1
Medikamentöse Therapie		0	0	0	0	0
Infertilität		0	0	0	0	0

Tabelle 3-2 Gesundheitsdaten des Untersuchungskollektivs, gruppiert nach Raucherstatus

Es waren keine relevanten Unterschiede bezüglich Allergien, Pollinosis, HNO-OPs zwischen Raucher und Nichtraucher zu finden. Alle Teilnehmer gaben an, gesund zu sein. Eine medikamentöse Therapie wurde ebenfalls von allen verneint.

Obwohl wir beim ersten Telefonat mit allen Teilnehmern vereinbart hatten, im Falle eines Atemwegsinfektes die geplanten Untersuchungen, v.a. wegen der nPD, zu verschieben, erschienen 3 mit abklingendem Infekt zum Termin. Nach ärztlicher Untersuchung entschieden wir uns die Messungen bei den Probanden durchzuführen und vereinbarten mit den Teilnehmern im Falle uneindeutiger Ergebnisse der nPD die Messungen zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen, sofern die Probanden sich einverstanden erklärten.

3.3.1 Zigarettenkonsum des Kollektivs

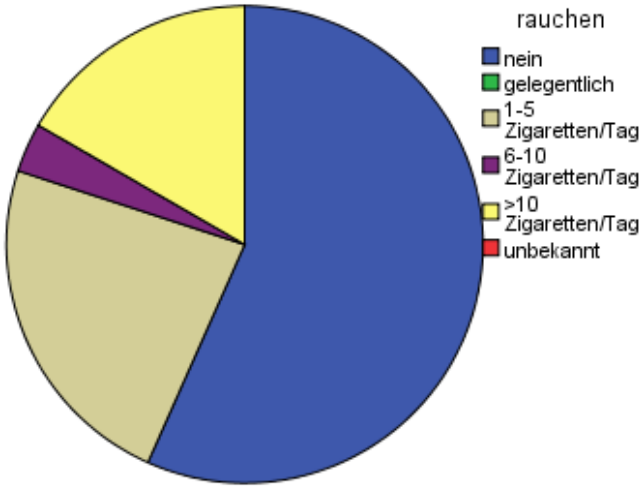

Abbildung 3-3 Täglicher Zigarettenkonsum

Die aktiven Raucher zeigten folgende Verteilung: 7 Personen rauchten 1-5 Zigaretten täglich, eine Person 6-10 Zigaretten und 7 mehr als 10 Zigaretten pro Tag. Die Angaben der Studienteilnehmer 13 und 14 wurden hier exkludiert.

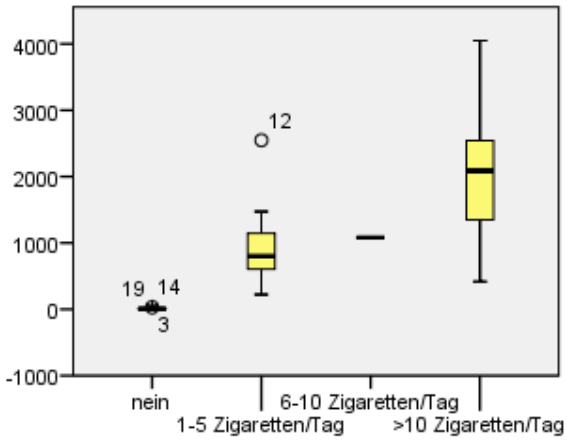

Abbildung 3-4 CotininKreatinin Konzentration in ng/mg im Verhältnis zu Rauchmenge. In diesem Boxplot wurden Proband 13 und 14 aus der Analyse entfernt

Zigarettenkonsum	**Cotinin-Kreatinin Quotient (ng/mg)**		
	Median	Minimum	Maximum
0	10	2	50
1-5 Zigaretten/Tag	802	221	2548
6-10 Zigaretten/Tag*	1081	1081	1081
>10 Zigaretten/Tag	2086	417	4048

Tabelle 3-3 Median und Range der Cot/Krea im Verhältnis zur täglich gerauchter Zigarettenmenge; Proband 13 und 14 wurden aus der Analyse entfernt

Es war eine positive Korrelation zwischen berichteter Zigarettenmenge und Cot/Krea zu beobachten.

3.3.2 Passive Zigarettenrauchbelastung:

Passivrauchexposition	Nichtraucher	Raucher	Gesamt
Nein	11	7	18
Täglich	2	5	7
mehrmals pro Woche	2	1	3
einmal pro Woche	3	0	3
Seltener	1	0	1
∑ PR-Exponierten	8	6	14

Tabelle 3-4 Passivrauchexposition der Teilnehmer

Alle Probanden wurden auch nach bestehender Passivrauch-Exposition befragt. 14 von 18 Teilnehmern berichteten über eine passive Nikotinbelastung. In der Gruppe der Nichtraucher lag dieser Anteil bei 42% (8 von 19). Davon waren 4 Probanden täglich bzw. mehrmals in der Woche Passivrauch exponiert. 3 der Nichtraucher waren diesem einmal pro Woche und eine Person seltener als 1x/Woche exponiert. 11 der Nichtraucher hatten keinerlei PR-Belastung. Bei den Rauchern hatten von insgesamt 13 Probanden 7 keine Exposition (Tab 3-4).

3.4 Schweißchloridmessung

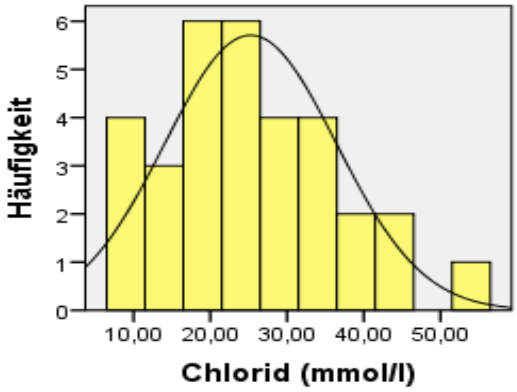

Abbildung 3-5 Verteilung der Schweißchloridwerte der Probanden

Bei den Schweißtest-Ergebnissen fand sich keine Normalverteilung (p= 0,23).

3.4.1 Ergebnisse des Schweißchlorids zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion

Chlorid	**Raucher**	**Nichtraucher**		
		Mit PR	**Ohne PR**	**∑ Nichtraucher**
Anzahl Probanden	13	8	11	19
Median (mmol/l)	22	27	25	25
Interquartil	16	19	22	20
Min/Max (mV)	10;36	15;44	9;56	9;56

Tabelle 3-5 Median, Interquartil und Range der Schweißchloridergebnisse

Der Median der Schweißtest-Resultate für alle Probanden betrug 25 mmol/l. Die Verteilung anhand des Raucherstatus zeigte einen Median von 25 mmol/l bei den Rauchern, und einen Median von 22 mmol/l bei den Nichtrauchern. Nichtraucher mit PR-Exposition hatten einen Median von 27 mmol/l, jene ohne PR-Belastung einen von 25 mmol/l.

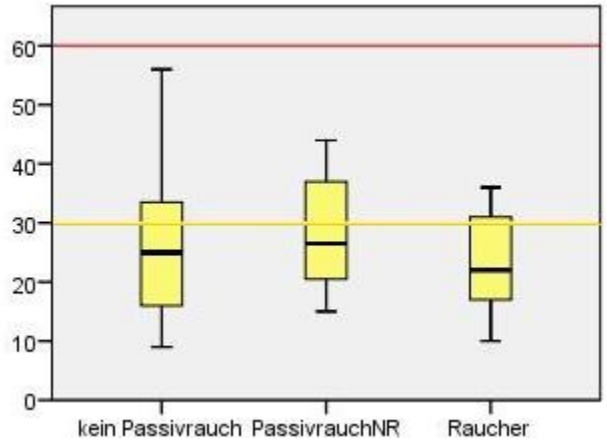

Abbildung 3-6 Boxplot Raucherstatus und Schweißchlorid in mmol/l, unterhalb orangene Linie: Normbereich, oberhalb der roten Linie pathologischer Bereich

Es war bei den Chlorid-Ergebnissen weder ein signifikanter Unterschied zwischen Raucher und Nichtraucher (p= 0,362) noch einer zwischen den 3 Gruppen aktive Raucher, Nichtraucher ohne und Nichtraucher mit PR-Exposition zu finden (p=0,534).

3.4.2 Kategorisierung der Schweißchloridwerte anhand diagnostischer Referenzwerte

Schweißchlorid		**mit PR**	**ohne PR**	**∑ Nichtraucher**	
Normbereich	0	0	0	31	21
Kontrollbereich	4	3	4	7	11
Pathologisch	0	0	0	0	0
Gesamt	0	0	0	31	32

Tabelle 3-6 Kategorielle Verteilung der Schweißchloridwerte

Setzt man die Schweißchloridwerte in Beziehung zu den für die diagnostische Beurteilung definierten Referenzbereichen aus dem deutschsprachigen Raum (Naehrlich et al. 2013), so lagen 21 Teilnehmer im Normbereich (= Mukoviszidose

unauffällig). Für 4 Nichtraucher ohne PR-, 3 Nichtraucher mit PR-Exposition und 4 Rauchern lagen die Ergebnisse im Kontrollbereich (30-60 mmol/l). Kein Proband hatte einen Schweißtest > 60 mmol/l (= vereinbar mit der Diagnose Mukoviszidose). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht (zweiseitiger, exakter Fisher Test 1,0).

3.4.3 Schweißchloridergebnisse nach anamnestischer Nikotinbelastung:

Chlorid (mmol/)	**Nicht-aktive Nikotinbelastung**	**aktive Nikotinbelastung**
Median	25	22
Interquartil	17	15
Minimum; Maximum	9; 44	10; 56

Tabelle 3-7 Schweißchlorid bei anamnestisch berichteter aktiver und nicht-aktiver Nikotinbelastung

Es wurde geschaut, ob sich die Statistik durch die Aufteilung der Kohorte nach anamnestisch berichteter Zigarettenbelastung verändern würde. D.h. also, das Studienteilnehmer 13 und 14 zu denen mit aktiver Nikotinbelastung gehöhrten. Auch bei diesem Rechenexemplar war kein signifikanter Unterschied nachweisbar: Der Median für die Teilnehmer mit aktiver Nikotinbelastung betrug 22 mmol/l, der für nicht-aktiv Nikotinbelasteten lag bei 25 mmol/l, entsprechend einem Signifikanzniveau von (p= 0,551).

3.5 Nasale Potentialdifferenzmessung

Alle in der nasalen Potentialdifferenz gemessenen Parameter waren nicht normalverteilt: $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Average (p=0,09), $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best (p=0,003), Δ Amilorid (p=0,081), Δ ATP (p=0,047), basale PD (Shapiro-Wilk Test p=0,450, Koglomorow-Smirnov p=0,200).

Zur Beurteilung der *CFTR* Funktion am Nasenepithel wurde die Summe des Wiederanstieg der Potentialdifferenz nach Gabe der chloridfreien Lösung und des Isoproterenols (= $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$) herangezogen. Dazu wurden sowohl der Mittelwert aus der Messung der linken und rechten Nase ($\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Average) als auch der höchste zu messende Wiederanstieg ($\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best) an einer der beiden Nasenhälften betrachtet (Keenan et al. 2015).

3.5.1 Kategorisierung des ΔPDFreeCl/Iso anhand diagnostischer Referenzwerte

$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best	**Raucher**	**Nichtraucher**			**Gesamt**
		mit PR	**ohne PR**	**∑ Nichtraucher**	
Normbereich	6	6	9	15	21
Graubereich	5	1	2	3	8
Pathologisch	2	1	0	1	3
Gesamt	13	8	11	19	32

Tabelle 3-8 Verteilung des besten Wiederanstieges anhand diagnostischer Referenzwerte

Die Ergebnisse aller Teilnehmer verteilten sich auf die Referenzbereiche, die im klinischen Setting zur Diagnose einer Mukoviszidose verwendet werden, wie folgt: 3 Probanden, davon 2 Raucher, hatte Werte im pathologischen Bereich von >-7,7 mV. Acht Ergebnisse, davon 5 von Rauchern, befanden sich im Graubereich (Tab 3-8). Zweiseitiger Fisher´s Exakt betrug p=1,0.

HNO_OP	$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best			
	Normbereich	Graubereich	Pathologisch	Gesamt
Nein	16	7	**2**	25
Ja	**5**	1	1	7
Gesamt	21	8	3	32

Tabelle 3-9 Zusammenhang zwischen HNO_OP und bester Wiederanstieg

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen erfolgter HNO-OP und den jeweiligen Referenzbereichen Norn-, Grau- und pathologischer Bereich bestand nicht (Exakter Fisher-Test p= 0,358).

Wilschanski	**Raucher**	**Nichtraucher**			**Gesamt**
		mit PR	**ohne PR**	**∑ Nichtraucher**	
Normbereich	13	7	11	18	31
Pathologisch	0	1	0	1	1
Gesamt	13	8	11	19	32

Tabelle 3-10 Ergebnis des Wilschanski Scorest

Nach dem Wilschanski Score lag nur eine Probandin im pathologischen Bereich. Der zweiseitige exakte Fisher Test betrug p=1,0 (Tab. 3-10). Bei dieser Probandin bestand anamnestisch 1x pro Woche Passivrauch-Exposition; sie hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung einen abklingenden oberen Luftwegs Infekt. 2 Raucher mit oberem Luftwegsinfekt waren in der Messung vertreten, ihre Wilschanski Scores lagen im Normbereich.

Sermet	**Raucher**	**Nichtraucher**		**∑ Nichtraucher**	**Gesamt**
		mit PR	**ohne PR**		
Normbereich	11	7	10	17	28
Pathologisch	2	1	1	2	4
Gesamt	13	8	11	19	32

Tabelle 3-11 Ergebnis des Sermet Scores

Beim Sermet Score lagen 2 Raucher und 2 Nichtraucher im pathologischen Bereich (Tab. 3-11). Zwei Raucher mit oberem Luftwegsinfekt waren in der Messung vertreten, ihre Wilschanski Scores lagen im Normbereich.

3.5.2 Durchführung von Zweitmessungen

Wir führten bei allen Probanden, die grenzwertige oder pathologische Ergebnisse der $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best hatten und telefonisch erreicht werden konnten (siehe Tabelle 3-8), die nPD-Messung ein zweites Mal durch. Es gelang uns, 7 Probanden zu erreichen. Ein Proband erschien nicht zum vereinbarten Termin, sodass eine zweite erfolgreiche Messung bei 6 Teilnehmern realisiert wurde.

Anschließend wählten wir die intraindividuell bessere Messung, also die mit der höheren $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best für jeden einzelnen der 6 Teilnehmer aus. Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass eine Probandin zum Zeitpunkt der 2. Messung, 8 Monate nach ihrer 1. Messung, das Rauchen aufgegeben hatte. Dies ließ sich durch ein Cot/Krea <100 ng/mg bestätigen. Ihre 2. Messung ergab ein besseres Resultat des besten Wiederanstieges, so dass sie der Gruppe der Nichtrauchern zugeordnet wurde und entsprechend die Auswertungen 12 Raucher und 20 Nichtraucher beinhalteten.

$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best	**Raucher**	**Nichtraucher**			**Gesamt**
		mit PR	**ohne PR**	**∑ Nichtraucher**	
Normbereich	7	8	12	20	27
Graubereich	4	0	0	0	4
Pathologisch	1	0	0	0	1
Gesamt	12	8	12	20	32

Tabelle 3-12 Verteilung des besten Wiederanstieges auf die Referenzbereiche nach bester Auswahl aus 2 Messungen

Für die bei der ersten Messung im Grenz- oder pathologischen Bereich liegenden Probanden war der Wiederanstieg ($\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best) nach der Auswahl der besseren Messung (=Beste Auswahl aus 2 Messungen) wie folgt verteilt: es lagen bei 4 Rauchern die Werte im Graubereich, bei einem Raucher war er weiterhin pathologisch (Tab 3-12). Diesen Raucher hatten wir nicht erreicht, um eine 2. Messung durchzuführen.

Wilschanski	**Raucher**	**Nichtraucher**			**Gesamt**
		mit PR	**ohne PR**	**∑ Nichtraucher**	
Normbereich	12	8	12	20	32
Pathologisch	0	0	0	0	0
Gesamt	12	8	12	20	32

Tabelle 3-13 Ergebnis Wilschanski Score nach bester Auswahl aus 2 Messungen

Nach Auswahl der jeweils besseren Ergebnisse für die 6 Probanden lag nach dem Wilschanski Score keiner der Teilnehmer im pathologischen Bereich (Tab. 3-13).

Sermet	Raucher	Nichtraucher			Gesamt
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher	
Normbereich	9	8	12	20	29
Pathologisch	3	0	0	0	3
Gesamt	12	8	12	20	32

Tabelle 3-14 Ergebnis Sermet Score nach bester Auswahl aus 2 Messungen

Für den Sermet Score ändert sich die Verteilung auf 3 pathologische Ergebnisse bei 3 Rauchern. Fisher´s Exakt p=0,004 (Tab. 3-14).

3.5.3 Ergebnisse des $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion

$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best	Raucher	Nichtraucher		
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher
Anzahl Probanden	12	8	12	20
Median (mV)	-13,7	-33,4	-31,2	-32,6
Interquartil	7,54	12,9	25,2	20,1
IQI 90	-5,5/-36,7	-28,4/-51,5	-13,6/- 60,4	-11,5/-59,9
Min/Max (mV)	-4,5/-36,6	-20,2/- 51,5	-11,1/- 60,4	-11,1/-60,4

Tabelle 3-15 Median, Interquartil und Range des ΔPDFreeCl/Iso_Best nach bester Auswahl

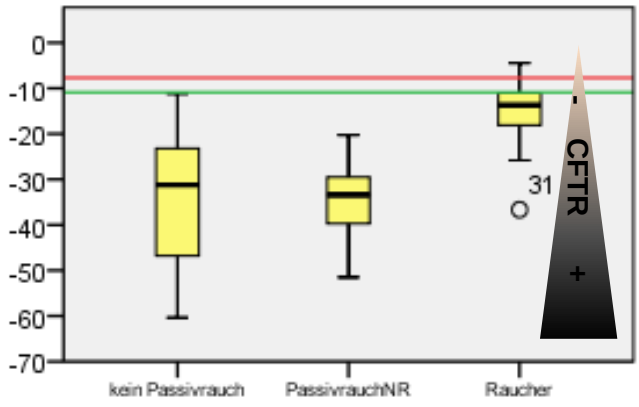

Abbildung 3-7 Boxplot ΔPDFreeCl/Iso_Best, angegeben in mV, nach bester Auswahl aus 2 Messungen oberhalb der roten Linie ist der pathologische Bereich, unterhalb der grünen Linie der Normalbereich

$\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Average	Raucher	Nichtraucher		
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher
Anzahl Probanden	12	8	12	20
Median (mV)	-9,0	-28,0	-30,2	-28,4
Interquartil	6,9	20,1	20,9	14,5
IQI 90	-4,1/-36,2	-20,6/-47,1	-11,4/-52,9	-9,9/-52,9
Min/Max (mV)	-2,98/-36.2	-13,4/-47,1	-9,9/-52,9	-9,9/-52,9

Tabelle 3-16 Median, Interquartil und Range des ΔPDFreeCl/Iso_Average nach bester Auswahl

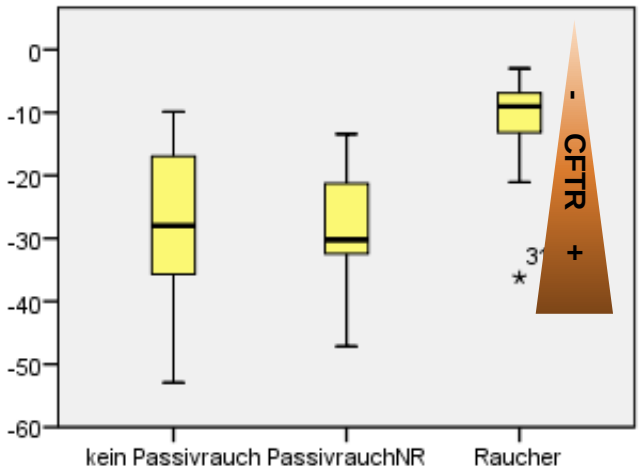

Abbildung 3-8 Boxplot ΔPDFree Cl/Iso_Average angegeben in mV, nach bester Auswahl aus 2 Messungen

Sowohl der $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$-Best (Abb. 3-7) als auch $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Average (Abb. 3-8) waren bei Rauchern signifikant gegenüber Nichtrauchern erniedrigt (p= 0,000).

Auch Unterschiede bei Rauchern, Nichtrauchern mit und Nichtrauchern ohne PR-Expositon waren sowohl für den besten als auch den mittleren Wiederanstieg signifikant (p=0,001) (Tab. 3-15) bzw. (Tab. 3-16).

3.5.4 Basale Potentialdifferenz und Natrium-Resorption

Basale PD	Raucher	Nichtraucher		
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher
Anzahl Probanden	12	8	12	20
Median (mV)	-12,6	-11,2	-10,5	-11,1
Interquartil	7,9	8,7	10,0	9,3
Min/Max (mV)	-3,1;-22,4	-3,0;-24,2	-3,2;-20,3	-3,0; -24,2

Tabelle 3-17 Median, Interquartil und Range der Basale PD aus bester Auswahl von 2 Messungen

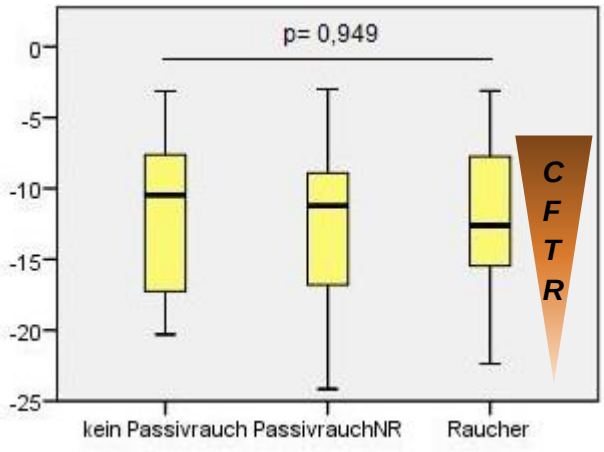

Abbildung 3-8 Abbildung Basale PD in mV aus bester Auswahl aus 2 Messungen

Die basale PD Werte unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant, p= 0,949 (Abb. 3-8).

Δ Amilorid	Raucher	Nichtraucher		∑ Nichtraucher
		mit PR	ohne PR	
Anzahl Probanden	13	8	11	19
Median (mV)	9,6	10,1	8,4	8,6
Interquartil	5,1	6,3	8,0	6,8
Min/Max (mV)	3,0;12,8	5,5;23,5	3,8;18,6	3,8;23,5

Tabelle 3-18 Änderung der Potentialdifferenz nach Gabe von Amilorid bei bester Auswahl aus 2 Messungen

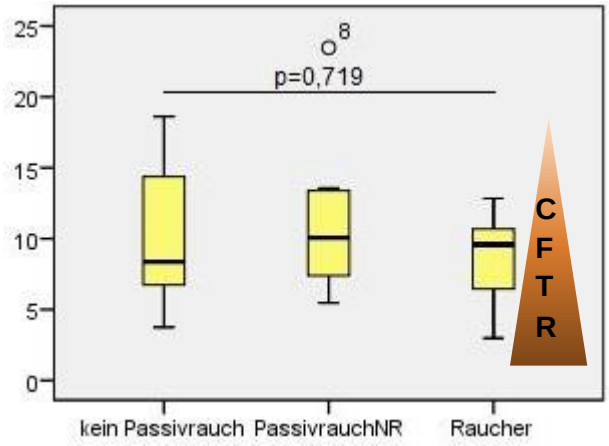

Abbildung 3-9 Amiloridantwort in mV aus bester Auswahl aus 2 Messungen

Auch die Änderung der Potentialdifferenz nach Gabe von Amilorid als Parameter für die Natriumresorptionsblockade am epithelialen Natriumkanal war zwischen den 3 Gruppen (Raucher, Nichtraucher mit und Nichtraucher ohne PR) nicht signifikant unterschiedlich (p= 0,719).

3.5.5 Prüfung zellulärer Integrität

Δ ATP	**Raucher**	**Nichtraucher**		
		mit PR	**ohne PR**	**∑ Nichtraucher**
Anzahl Probanden	12	8	12	20
Median (mV)	-3,9	-4,5	-5,6	-5,4
Interquartil	3,7	5,3	5,3	5,4
Min/Max (mV)	-2,1;-8,3	-1,4;-8,6	-1,4;-11,5	-1,4;-11,5

Tabelle 3-19 Median, Interquartil und Range für Änderung der PD nach Gabe von ATP bei bester Auswahl aus 2 Messungen

Die Mediane für Δ ATP betrugen -3,9 mV bei Rauchern, -4,5 mV bei Nichtrauchern mit PR- und -5,6 mV bei Rauchern ohne PR-Exposition. Ein Trend zur besseren Reaktion des Epithels war bei Probanden ohne jegliche Rauchbelastung gegenüber den Passiv- und Aktivrauchern sichtbar (Tab. 3-19).

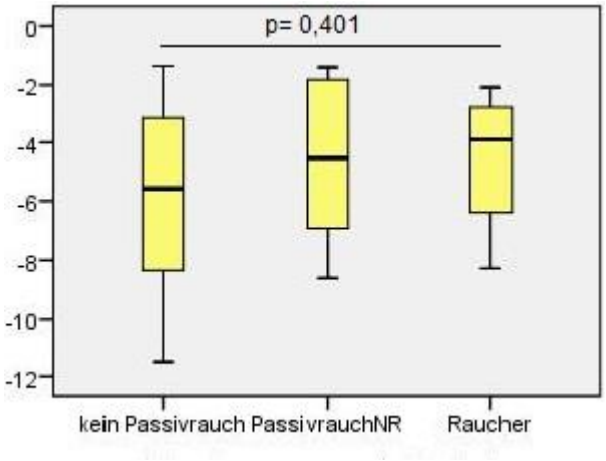

Abbildung 3-10 ATP Antwort in mV nach bester Auswahl aus 2 Messungen

Die ATP-Antwort, u.a. ein Maß für intaktes Epithel in der nPD, unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (p=0,401 nach Kruskal-Wallis) (Abb. 3-10).

3.6 Intestinale Kurzschlussstrommessung

Diese Untersuchung wurde nur bei 31 der insgesamt 32 Probanden durchgeführt, da eine Probandin erst im Aufklärungsgespräch über ein Hämorrhoidalleiden mit operativer Behandlung in der Vergangenheit berichtete. Hämorrhoidalleiden waren als Ausschlusskriterium definiert, um der erhöhten Blutungsgefahr nach Rektumbiopsieentnahme Rechnung zu tragen.

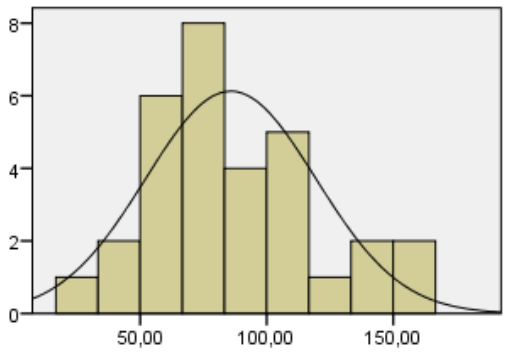

Abbildung 3-11 Normalverteilung der Stromstärken-Summe nach Gabe von Forskolin, Histamin und Carbachol in µA/cm²

Eine Normalverteilung lag bei den Ergebnissen der ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) nicht vor (p= 0,178) (Abb. 3-11).

3.6.1 Ergebnisse des ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion

ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His)	Raucher	Nichtraucher		
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher
Anzahl Probanden	13	8	10	18
Median (µA/cm²)	72,1	68,6	100,0	80,2
Interquartil	57,4	24,1	37,2	44,2
Min/Max (µA/cm²)	46,9;162,1	21,9;155,0	68,2;141,7	21,9;155,0

Tabelle 3-20 Median, Interquartil und Range der Stromstärken-Summe nach Forskolin, Histamin und Carbachol in µA/cm²

Der Median aller Werte für ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) betrug 77,2 µA/cm². Bei den Rauchern lag er mit 72,1 µA/cm² niedriger als bei den Nichtrauchern insgesamt (80,2 µA/cm²), dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant (p=0,541). Der ΔI_{sc} bei den Nichtrauchern ohne PR lag bei einem Median von 100,0 µA/cm² und somit höher als bei den Nichtrauchern mit PR (68,6 µA/cm²). Dieser Unterschied war signifikant (p= 0,027). Der Unterschied zwischen den 3 Gruppen Raucher, Nichtraucher mit und ohne PR war nicht signifikant (p=0,111).

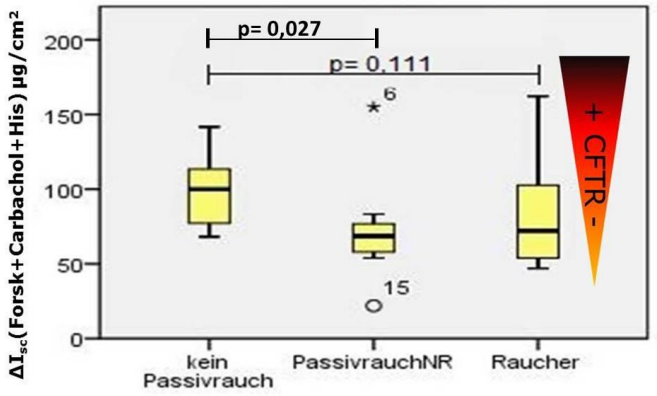

Abbildung 3-12 Boxplot für ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) in µg/cm²

3.6.2 Kategorisierung des ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) anhand diagnostischer Referenzwerte

ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His)	Raucher	Nichtraucher			Gesamt
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher	
Normbereich	13	7	11	18	30
Pathologisch	0	1	0	0	1
Gesamt	13	8	11	19	31

Tabelle 3-21 Verteilung der Stromstärken-Summe nach Gabe von Forskolin, Histamin und Carbachol auf die Referenzbereiche

Bis auf eine Teilnehmerin lagen die ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His)-Werte aller Probanden oberhalb der zentrumseigenen Normwertgrenze von 39, 6 µA/cm² (Bagheri et al). Die Teilnehmerin mit erniedrigtem Ergebnis von 21,9 µA/cm² ist Nichtrauchern mit mehrmals pro Woche bestehender PR-Exposition und einem Cot/Krea-Wert von 10 ng/mg. Der ΔI_{sc}-Wert wurde aus den 4 Messungen mit Werten von 12,4 µA/cm², 10,2 µA/cm², 13,6 und 51,3 µA/cm² gemittelt. Die Teilnehmerin hatte keine Allergien, war gesund und litt zum Zeitpunkt der Messung nicht an einer Infektion.

3.6.3 Ergebnisse des ΔI_{sc}(Forsk) zur Beurteilung der *CFTR*-Funktion

ΔI_{sc} (Forsk)	Raucher	Nichtraucher		
		mit PR	ohne PR	∑ Nichtraucher
Anzahl Probanden	13	8	10	18
Median (µA/cm²)	28,7	21,4	33,8	28,1
Interquartil	28,5	12,7	16,1	13,6
Min/Max (µA/cm²)	11,8;87,32	-7,5; 29,1	23,5;50,7	-7,5;50,7

Tabelle 3-22 Median, Interquartil und Range von ΔIsc(Forsk)

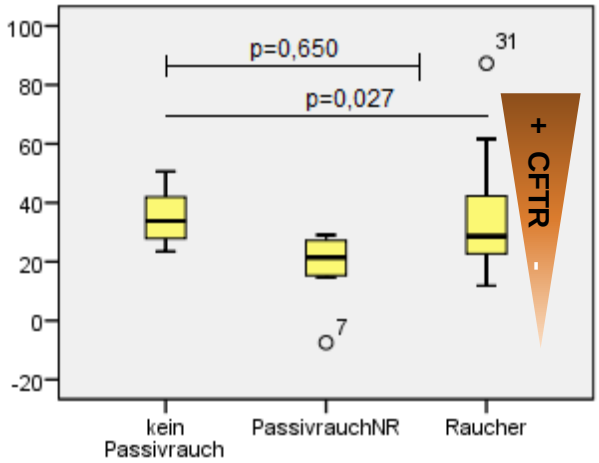

Abbildung 3-13 Boxplot Δ Isc (Forsk) in µg/cm²

ΔI_{sc}(Forsk) unterschied sich zwischen Raucher und Nichtrauchern nicht signifikant (p=0,650). Die Differenz der Mediane zwischen Raucher, Nichtrauchern mit und Nichtrauchern ohne PR-Exposition war aber signifikant (Kruskal-Wallis p= 0,027). Im U-Test war ein Signifikanzniveau zwischen Nichtrauchern mit und Nichtrauchern ohne PR Exposition zu finden (p=0,002), nicht aber zwischen Rauchern und Nichtrauchern ohne PR-Exposition (p=0,522).

4. Diskussion

Nach Einschluss von 13 gesunden Raucher und 19 gesunden Nichtraucher anhand ihrer Cot/Krea-Werte und Unterteilung der Nichtraucher anhand ihrer Passivrauchbelastung, widmeten wir uns der Frage, ob in diesen Gruppen eine *CFTR*-Funktionsbeeinträchtigung messbar ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Schweißtestuntersuchung, der nPD und ICM im Kontext der Literatur diskutiert. Auch wird die Cotininbestimmung erörtert, um ihre Vorteile, aber auch Limitationen zu beschreiben.

4.1 Cotinin im Urin zur Objektivierung der individuellen Nikotinbelastung

Nach Einschluss aller Teilnehmer und sechs Zweitmessungen der nPD erfolgte die Cotinin-Bestimmung im Urin, um die Nikotinbelastung durch aktiven oder passiven Zigarettenrauch zu objektivieren. Hier bestand bei 30 von 32 Teilnehmern eine Übereinstimmung zwischen anamnestisch berichtetem Rauchverhalten und gemessenem Cot/Krea-Grenzen. Alle 17 Probanden, die keinen aktiven Tabakrauchkonsum angaben, hatten eine Cot/Krea-Konzentration im Urin von Cot/Krea <100 ng/mg, die in Voruntersuchungen als valide Grenze für Nichtraucher definiert wurde (Riboli et al. 1995). Bei zwei Probanden fanden wir Diskrepanzen. Sie berichteten über einen Zigarettenkonsum von 6-10 Zigaretten täglich, hatten aber Cot/Krea-Konzentrationen <100 ng/mg. Riboli et al berichteten ebenfalls von wenigen Rauchern mit „falsch-negativen“ Cot/Krea <100 ng/mg. Ein Erklärungsversuch der Autoren war, dass in der Studie lediglich nach dem Nikotinkonsum der letzten Monate gefragt worden war, jedoch keine Informationen über die Rauchmenge der letzten 3-4 Tagen vorlagen. Bei einer HWZ des Cotinin von 20 Std. könnte somit bei diesen Teilnehmern eine Rauchabstinenz genau in den letzten 3-4 Tagen vorgelegen haben und dadurch der Cotiningehalt im Urin im Bereich von Nichtrauchern gesunken sei.

Wir führen die niedrige Cot/Krea-Konzentration unserer 2 Teilnehmer auf das Vorgehen unserer Probanden-Rekrutierung zurück. Studienteilnehmer 13 und 14 gaben beide an, am Abend vor der Messung geraucht zu haben. Wir vermuten daher, dass diese beiden sich als Raucher ausgegeben haben, um an der Studie teilnehmen zu können. Denn nachdem sich die Teilnehmer-Rekrutierung schwieriger als vermutet

darstellte, baten wir die Probanden in ihrem Bekanntenkreis mögliche Interessenten mit Nikotinkonsum anzusprechen und diese mit uns in Verbindung zu bringen. Insbesondere Raucher waren zurückhaltender und gaben als Grund ein schlechtes Gewissen an, womöglich messbare Funktionsstörungen durch ihr Rauchverhalten zu erfahren. So fragten auch Teilnehmer 13 und 14 erst an, nachdem wir die Rekrutierung auf Raucher begrenzten.

Bei allen anderen Teilnehmern bestand eine Übereinstimmung zwischen anamnestisch berichtetem Rauchverhalten und gemessenem Cot/Krea-Grenzen. So wurden in dieser Arbeit umso höhere Cotinin-Konzentrationen gemessen, je kürzer der Abstand vom Zeitpunkt des Aufwachens war. 7 unserer 13 Raucher berichteten, dass sie am Morgen der Vorstellung geraucht hatten und 5 weitere innerhalb der letzten 24 Std. Nur von einem Raucher kennen wir den Zeitpunkt der letzten Zigarette nicht. Dies könnte die klar über dem Grenzwert für Raucher liegenden Cot/Krea auch für die „Wenigraucher“ erklären.

In der Kohorte waren vorwiegend junge Studenten eingeschlossen. Innerhalb der deutschen Population stellen sie die Gruppe dar, die im Vergleich zur Gesamtbevölkerung einen geringeren Raucheranteil hat (RP-Online 2006, Statistisches Bundesamt 2013). Wir haben uns bewusst für Studenten entschieden, um damit ein gesünderes Kollektiv zu haben, um mögliche Einflussstörungen auf die Funktionsmessungen, wie z.B. medikamentöse Einnahme, Komorbiditäten, zu minimieren.

Das Geschlechterverhältnis entsprach annähernd den deutschen Verhältnissen. Im bundesdeutschen Vergleich sind 58% der Raucher Männern (Statistisches Bundesamt 2013, Statistisches Bundesamt 2014), in unserem Kollektiv waren 69% aller Raucher männlich.

4.2 Tabakrauch und *CFTR*-Funktion der Schweißdrüse

Der mit Pilokarpin-Iontophorese gemessene Schweißchlorid zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern in der eigenen Kohorte überwiegend junger Erwachsener. In der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse: Raju et al. fand bei 33 gesunden Nichtrauchern (NR) und 31 gesunden Rauchern im Alter von 48±8 bzw. 50±7 Jahren einen signifikanten Unterschied für die (Mittelwerte) Schweiß-Chloridwerte von 14,5±7,7 versus 29,5±13 (Raju et al. 2013).

Aus der gleichen Arbeitsgruppe war eine weitere Arbeit mit 18 NR und 12 Rauchern mit einem Zigarettenkonsum >10 pro Tag und >10 Packjahren veröffentlicht, bei der sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Schweißchloridgehalt dieser beiden Gruppen zeigte (Courville et al. 2014). Beide Kohorten aus der Literatur waren deutlich älter als die Unseren, umfassen einen hohen Anteil von Afroamerikanern und weisen z.T. eine langfristige Tabakrauchbelastung von im Mittel 31±14 Packungsjahren (Courville 2014) auf. Da zehn unserer Raucher jünger als 25 Jahre sind und acht der 13 Raucher weniger als 10 Zigaretten/Tag rauchen, sind sie deutlich geringer belastet als die Raucher in den beiden anderen Studien. Im Gegensatz zu unserem Kollektiv litten die Patienten in den Vergleichsstudien in 28% (Raju et al. 2013) bzw. 18% (Courville et al. 2014) auch unter einer chronischen Bronchitis.

In den letzten Jahren wurde die *CFTR*-Funktionsmessung an der Schweißdrüse um die experimentell eingesetzte ß-adrenerge Stimulation erweitert (Quinton et al. 2012). Mit dieser Methode wurde longitudinal bei 7 gesunden Rauchern, die den Nikotinkonsum beendeten, bereits nach 14 Tagen eine Normalisierung der ß-adrenergen (*CFTR*-abhängig) Schweißrate (Courville et al. 2015) gemessen. In der konventionellen Schweißchloridmessung war jedoch keine Veränderung messbar.

Somit scheint eine *CFTR*-Funktionsstörung auch an den Schweißdrüsen nachweisbar zu sein. Allerdings ist sie nicht immer mit der klassischen Schweißtestuntersuchung nach Gibson-Cooke erfassbar.

4.3 Tabakrauch und *CFTR*-Funktion am intestinalen Epithel

In der vorliegenden Untersuchung findet sich ein Trend zur verminderten *CFTR* Antwort bei Rauchern ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) im Vergleich zu den Nichtrauchern (Median 72,1 µA/cm² vs. 80,2 µA/cm² bei Nichtraucher); das Ergebnis ist aber nicht signifikant. In einer amerikanischen Studie wurde die *CFTR*-Funktion in der ICM als ΔI_{sc} (Forskolin+IBMX) wiedergegeben und zeigte in den Mittelwerten eine signifikante verminderte *CFTR*-Funktion bei Rauchern (Raju et al. 2013). Auch nach Anwendung des ΔI_{sc} (Forskolin+IBMX) für die hiesige Studie findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern, die Unterschiede der Mediane sind sogar noch geringer (Raucher 28,7 vs. 28,1 µA/cm² bei NR). Die Publikation von Raju enthält bis auf das Alter und die Ethnie der Probenden keine Charakteristika der Probanden. Im Mittel lag das Alter der Studienteilnehmer bei 52±15 für Nichtraucher

bzw. 60±7 Jahren bei den Rauchern. Die Autoren der Publikation betrachten ihr Ergebnis der ICM als Beweis der *CFTR*-Störung jenseits des Atemwegstraktes und somit einer systemischen Reaktion durch Nikotin.

Bei der Unterteilung der Nichtraucher nach anamnestischer Passivrauchexposition konnte ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Nichtraucher-Untergruppen sowohl für ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His), p=0,027 als auch ΔI_{sc}(Forsk/IBMX) gezeigt werden, p= 0,002. Überraschenderweise waren diese Parameter bei Rauchern höher als bei den Nichtrauchern mit Passivrauchbelastung. Die Gruppengröße und die Inhomogenität der Passivrauchbelastung der NR mit Passivrauchbelastung schränken aber die Aussagekraft stark ein.

Ob die Unterschiede dieser Studie zu jener von Raju et al. durch das deutlich jüngere Alter der hiesigen Probanden oder auch dem inhomogeneren Nikotinkonsum unserer Rauchergruppe zu erklären sind, ist nicht klar. Es ist auch aus der o.g. Publikation nicht genau zu entnehmen, wie viele Rektumbiopsate entnommen wurden, ob das kleinere Kollektiv der 15 gesunden Nichtraucher und 17 gesunden Raucher der gleichen Kohorte angehörte, bei der auch die Schweißtestuntersuchungen durchgeführt wurden. Es stellt sich die Frage, ob es sich - wie bei der Schweißtestuntersuchung der o.g. Studie - bei den Rauchern um ein anderes Kollektiv mit höherer Morbidität handelt. Raju et al. präsentiert die Ergebnisse der ICM als Mittelwerte. Die hierfür notwendige Normalverteilung fand sich in unserem Kollektiv nicht.

4.4 Tabakrauch und *CFTR*-Funktion am respiratorischen Epithel

Am respiratorischen Epithel zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern für den mittleren Wiederanstieg $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Average (-9,0 vs. -28,4 mV, p=0,000). Zwei andere Gruppen haben gleiche signifikante Unterschiede im Wiederanstieg der nPD von Rauchern und Nichtrauchern gefunden. Bei der ersten Gruppe handelt es sich um das in Kapitel 4.2 genannte Kollektiv aus 18 gesunden Rauchern und 12 gesunden NR (-9.6+4,0 vs. -22,3+10,1 mV) (Cantin et al. 2006), bei der 2. Gruppe ist es das Kollektiv mit 33 gesunden Rauchern und 31 gesunden Nichtrauchern (-6,3±1,4 vs. -15,2±2,7 mV) (Sloane et al. 2012). Die Messungen dieser Gruppen erfolgten entsprechend den amerikanischen nPD-Protokoll, das eine leichte Abwandlung zum hier verwendeten Protokoll darstellt. Ersteres gibt eine Messung an der unteren Nasenmuschel vor, die Perfusionslösungen werden angewärmt und die Perfusionsraten kürzer gewählt. Trotz der unterschiedlichen Protokolle stimmen die Aussage der o.g. Studien mit dieser Arbeit überein und bestätigen eine gute Teststärke des Parameters $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$.

In dieser Arbeit war die zelluläre Integrität der Atemwegsepithelien bei Rauchern und Nichtrauchern nicht gestört, da sich die Potentialdifferenz (PD) nach Gabe von ATP nicht signifikant unterschied (3,9 bzw. 5,4 mV, p=0,501). Auch die basale PD (-12,6 vs. -11,1 mV) als Ausdruck des globalen Ionentransportes am Atemwegsepithel differierte bei Rauchern und Nichtrauchern nicht signifikant. In den o.g. Vergleichsstudien waren für diese 2 Parameter keine Aussagen getroffen worden.

In dieser Studie war auch bei der Potentialänderung nach Gabe des ENaC-Blockers Amilorid (ΔAmilorid) zwischen Rauchern und Nichtrauchern kein signifikanter Unterschied messbar (9,6 vs. 8,6 mV). Bei CF liegt als Ausdruck der gesteigerten Natriumrückresorption ΔAmilorid deutlich höher als bei nicht-CF. Beide oben zitierten Studien kommen bei ihren Kohorten zum gleichen Ergebnis.

Betrachtet man nun die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich einer Relevanz der Passivrauchexposition, so lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern mit und ohne Passivrauchbelastung zeigen (p=0,678). Publikation zu dieser Fragestellung sind bisher nicht veröffentlicht worden. Somit benötigt es weitere Untersuchungen, um die Frage der Relevanz von Passivrauch auf *CFTR* zu beantworten. Da nicht immer von einem linearen Dosis-Wirkungsprinzip bei tabakrauchinduzierten Schäden auszugehen ist, ist eine sekundäre *CFTR*-Schädigung auch bei Passivrauch vorstellbar. So treten Inflammation und endotheliale

Funktionsstörung bereits bei geringen Passivrauchbelastungen auf (Surgeon General of the United States 2010).

4.5 Auswirkungen auf die Beurteilung der diagnostischer *CFTR*-Funktionstests

Die Schweißchloridwerte in der Pilokarpin-Iontophorese liegen bei einem Median von 25 mmol/l. Fast jede dritte Messung weist Werte zwischen 30 und 59 mmol/l und in keinem Fall über 60 mmol/l auf. Diese Verteilung ist für gesunde Erwachsene im Gegensatz zu Kindern und Jugendlichen typisch, da die Schweißchloridwerte bei gesunden Probanden altersabhängig sind und bis zum Erwachsenenalter leicht, aber statistisch signifikant ansteigen (Mishra et al. 2008). Der diagnostische bedeutsame Grenzwert von >60 mm/l für die Mukoviszidose gilt hingegen altersunabhängig (Naehrlich et al. 2013). Die vorgelegten Ergebnisse entsprechen denen gesunder Probanden anderer Kohortenuntersuchungen (Mishra et al. 2008). Für die im Absatz 4.3 genannten Studien waren bei 8 von 30 Teilnehmer bzw. 17 von 64 Teilnehmern Werte von ≥ 30 bis ≤ 60 zu finden (Raju et al. 2013, Courville et al. 2014). Bei ca. 25-30% der erwachsenen gesunden Patienten liegen die Schweißchloridwerte im Kontrollbereich zwischen 30-59 mmol/l. Dies hat zur Folge, dass nach den aktuellen Leitlinien bei jedem vierten Erwachsenen mit Verdacht auf Mukoviszidose eine weiterführende *CFTR*-Diagnostik im Sinne einer *CFTR*-Genotypisierung und elektrophysiologische *CFTR*-Funktionstestung (NPD/ICM) empfohlen werden müsste, unabhängig vom Raucherstatus. Vielmehr ist zu überlegen, ob die unteren Grenzwerte des Schweißchlorids nicht auch entsprechend den nordamerikanischen Empfehlungen für Erwachsene auf 40 mmol/l angehoben werden sollten (Farrell et al. 2008).

Die ICM-Messungen der vorliegenden Kohorte liegen trotz tendenziell reduzierter *CFTR*-Funktion bei Rauchern und mit Ausnahme einer nichtrauchenden Probandin im Normbereich. Tabakrauch beeinträchtigt die Aussagekraft des ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) als Diagnostikum nicht. Der niedrigste Wert bei Rauchern lag mit 49,6 µA/cm² deutlich über dem Cut-Off von 39,6 µA/cm².

Bei der Probandin mit pathologischem ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) lag mehrmals pro Woche Passivrauchexposition vor. Bei der Betrachtung der ICM-Messung dieser Probandin waren alle Qualitätskriterien für eine verwertbare ICM-Messung erfüllt. Es zeigt sich eine positive Reaktion auf Forskolin/IBMX, die bei Mukoviszidose im negativen Bereich liegt, jedoch keine positive Reaktion auf Carbachol und Histamin in drei der 4 Proben.

Bei Nicht-CF ist auch bei Carbachol und Histamin eine positive Reaktion vorhanden. Eine Zweitmessung wurde angestrebt, von der Teilnehmerin aber abgelehnt. Vergleichsstudien liegen nicht vor, so dass bei dieser gesunden Probandin eine Erklärung für den pathologischen Befund derzeit nicht möglich ist.

Bei der nPD ist die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie in Bezug auf eine diagnostische Wertigkeit komplexer:

- Nach Durchführung der ersten nPD bei allen 32 Teilnehmern liegt das Ergebnis für $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best, der dem besten Wiederanstieg auf chloridfreie Lösung und Isoproterenol einer Nasenhälfte entspricht, bei 11 Teilnehmern nicht im Normbereich, wenn die vorherrschenden Kriterien zur Diagnose einer CF herangezogen werden (Keenan et al. 2015). Eine Signifikanz bezüglich Rauchverhalten liegt dabei nicht vor (exakter zweiseitiger Fisher Test p=0,176).

- Bei Anwendung des Wilschanski Scores für das Kollektiv liegt das Ergebnis einer einzigen Probandin im pathologischen Bereich für Mukoviszidose-Erkrankte. Diese war Nichtraucherin, litt zum Zeitpunkt der Messung jedoch an einem akuten Atemwegsinfekt.

- Bei Verwendung des Sermet Scores sind 2 Raucher und 2 Nichtraucher im pathologischen Bereich für Mukoviszidose-Patienten. Eine Nichtraucherin mit pathologischem Score hatte einen Atemwegsinfekt.

Eine Zweitmessung bei allen 11 Personen mit nicht im Normbereich liegenden $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best-Werten wurde angestrebt, um die o.g. Ergebnisse zu verifizieren, war aber nur bei 6 Probanden zu realisieren, da die übrigen nicht erreichbar waren.
Nach Auswahl des besseren $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best aus den beiden Messungen der 6 Personen erfolgte erneut die Beurteilung anhand der diagnostischen Scores. Folgende Veränderungen waren zu finden:

- $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best: Ein Raucher liegt weiterhin im pathologischen Bereich von CF-Erkrankten. Leider ist bei ihm keine zweite Messung möglich gewesen. 4 weitere Raucher lagen im kontrollbedürftigem Bereich (siehe auch Tab 3.9a).

- Beim Wilschanski Score sind nun die Werte aller Probanden im Normbereich.

- Beim Sermet Score sind 3 Raucher im pathologischen Bereich.

Dies lässt folgende Aussagen über den Einfluss von Tabakrauch auf die diagnostische Wertigkeit der nPD zu:

- Unabhängig vom Raucherstatus sollte bei allen Teilnehmern eine zweite, bestätigende Messung erfolgen, wenn $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best herangezogen wird und sich pathologische oder grenzwertige Befunde zeigen.
- Bei Einsatz des $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best führt die sekundäre *CFTR*-Störung durch Nikotinrauch in einigen Fällen zur Überlappung mit den für CF-Diagnostik bestehenden Referenzbereichen. Daher ist beim Einsatz dieses Parameters zumindest eine Zweitmessung, optimalerweise nach Rauchabstinenz empfehlenswert, weil eine Erholung des *CFTR*-Funktion möglich erscheint.
- Bei Verwendung des Wilschanski Scores ist bereits bei der 1. Messung kein Einfluss von Tabakrauch auf die diagnostische Aussage vorhanden. Die einzige Person, die Nichtraucherin ist, und einen pathologischen Score hatte, litt an einem Infekt und hätte deswegen auch im Rahmen einer diagnostischen Abklärung eine Empfehlung zur Zweitmessung erhalten.
- Der Sermet Score bewegt sich in seiner Aussagekraft zwischen dem $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ und Wilschanski Score.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Wilschanski Score in dieser Kohorte am besten zwischen primärer und sekundärer *CFTR*-Störung differenzieren kann. Dies liegt daran, dass er neben der $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ auch die Amiloridantwort (ΔAmil) einbezieht, die bei CF durch die verstärkte Na^{2+}-Rückresorption deutlich verstärkt ist, aber nicht bei Rauchern. Ein statistisch signifikanter Unterschied des ΔAmilorid liegt in dieser Studie zwischen Rauchern und Nichtrauchern nicht vor (p= 0,526).

4.6 Reversibilität der tabakrauchinduzierten *CFTR*-Funktionsstörung

In der Literatur sind keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich einer Reversibilität der *CFTR*-Funktionsstörung nach Rauchabstinenz zu finden:

So zeigt eine Arbeitsgruppe einen signifikanten Unterschied in den Schweißchlorid-ergebnissen von ehemaligen Rauchern mit COPD im Gegensatz zu gesunden Kontrollen, nach mehr als einem Jahr Nikotinabstinenz. In der selben Kohorte unterscheidet sich der Wiederanstieg der PD nach chloridfreier Lösung und Isoproterenol bei den ehemaligen Rauchern nicht von den gesunden Nichtrauchern (Raju et al. 2013). Die ist allerdings nur eine Querschnittsstudie.

Bisher ist eine Längsschnittuntersuchung zu dieser Frage durchgeführt worden. Hier wurde die *CFTR*-Funktionsmessung an der Schweißdrüse mittels ß-adrenerger Stimulation durchgeführt (Quinton et al. 2012). Mit diesem Verfahren war bei 7 gesunden Rauchern, die den Nikotinkonsum im Rahmen der Studie beendeten, bereits nach 14 Tagen eine Normalisierung der ß-adrenergen (*CFTR*-abhängig) Schweißrate (Courville et al. 2015) zu messen.

4.7 Limitationen

Die aufwendigen Untersuchungen am Patienten setzen der Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie enge Grenzen. Gerade die Rekrutierung von Rauchern gestaltete sich schwierig, da der negative Effekt von Tabakrauch untersucht und die Rate von Rauchern unter der primären Rekrutierungsgruppe, junger Studenten, mit 16% (RP-Online 2006) deutlich unter der der Allgemeinbevölkerung von 25-30% (Statistisches Bundesamt 2013) liegt. Weiterhin wurde auf eine *CFTR*-Genotypisierung aller Probanden verzichtet, da die geschätzten Heterozygotenfrequenz in Deutschland mit 1:50 deutlich unter unserer Probandenzahl lag. Auch war es bei einem Probanden mit im pathologischen Bereich für Mukoviszidose liegenden $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ nicht möglich eine Zweimessung durchzuführen, wie das für 6 andere Teilnehmer erfolgte.

Die PR-exponierten Nichtraucher stellten eine inhomogene Gruppe dar. Während 4 Probanden täglich bzw. mehrmals in der Woche PR exponiert waren die übrigen 4 diesem nur einmal pro Woche oder seltener ausgesetzt. Die Ungleichheit der Gruppe könnte ein Grund für die fehlende Signifikanz der $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$-Werte im Vergleich zum Kollektiv der NR ohne PR sein.

4.8 Schlussfolgerung und Aussichten:

In dieser Untersuchung wurde eine sekundär durch Tabakrauch induzierte *CFTR*-Funktionsstörung am respiratorischen Epithel, jedoch nicht an der Schweißdrüse und an intestinalem Epithel nachgewiesen, die 2 Kernaussagen zulässt:

1. Der Nachweis einer sekundären *CFTR*-Funktionsstörung, die auch von anderen Arbeitsgruppen bei Rauchern gezeigt wurde, bietet neue therapeutische Ansätze für die hauptsächlich durch Tabakrauch hervorgerufene (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) COPD, weil auch Symptome wie chronische Bronchitis bei dieser Volkskrankheit denen der CF ähneln. So wurde der oral

bioverfügbare *CFTR*-Potentiator Ivacaftor, welcher bei CF-Patienten mit Gating-Mutationen bereits erfolgreich eingesetzt wird, zur Verbesserung von tabakrauchinduzierter *CFTR*-Störung an Zellkulturen aus humanem Bronchialepithel untersucht. Nach Gabe von Ivacaftor konnte eine signifikante Steigerung der mukoziliären Transportrate sowie Zunahme des Airway surface liquid (ASL) an Tabakrauchextrakt exponierten Zellen gegenüber der Kontrolle gezeigt werden (Sloane et al. 2012). Unlängst wurde auch eine doppelblind-placebokontrollierte Pilotstudie mit Ivacaftor an Rauchern und ehemaligen Rauchern mit chronischer Bronchitis initiiert. Nach 14tägiger Therapie zeigten sich in der Verumgruppe ein Trend zur verbesserten *CFTR*-Funktion im Schweißchlorid und in der nasalen Potentialdifferenzmessung, die aber noch nicht signifikant war (Solomon et al. 2016).

2. Die sekundäre *CFTR*-Störung durch Tabakrauch kann die Diagnostik einer CF mittels nPD beeinflussen, wenn der Einsatz des besten oder mittleren Wiederanstiegs nach chloridfreier Lösung und Isoproterenol (= $\Delta PD_{FreeCl/Iso}$_Best bzw. _Average) verwendet wird. Demgegenüber war der Wilschanski-Scores zur Diskriminierung einer sekundär bedingten *CFTR*-Dysfunktion von einer primären deutlich überlegen. Es empfiehlt sich in der Funktionsdiagnostik zum Ausschluss oder Nachweis einer CF die Erfassung des Raucherstatus, optimalerweise durch Cotinin-Bestimmungen, durchzuführen, um diesem „Bias“ gerecht zu werden. Wenn auch in dieser Studie keine signifikanten *CFTR*-Störungen durch Passivrauch zu messen waren, so ist eine Beeinträchtigung nicht grundsätzlich ausgeschlossen und bedarf weiterer Untersuchungen, da bei passivrauchexponierten Kindern eine deutliche Überschreitung der Cotinin-Kreatinin Konzentration über den für Erwachsene definierten CutOff von >200 ng/mg im Urin gezeigt werden konnte (Reese et al. 1992). Hier sind weitere Studien notwendig.

5. Zusammenfassung

Tabakrauch führt u.a. über Inflammation und verminderter mukoziliärer Clearance an den Atemwegen zur chronischen Bronchitis und chronisch obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen eine Verminderung des mRNA-Spiegels des *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)-Proteins sowie des Chloridtransports nach Exposition mit Tabakrauchextrakt.

CFTR ist ein wichtiger Chloridkanal an der apikalen Zellmembran exokriner Drüsen. Der Mukoviszidose liegt ein *CFTR*-Funktionsverlust von mehr als ≥70% zugrunde, der über Sekretretention zu chronischer Inflammation und Infektion der Atemwege führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezielt bei 13 gesunden Rauchern im Vergleich zu 19 gesunden Nichtrauchern der Schweißtest, die nasale Potentialdifferenzmessung und die intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM) am Rektumepithel untersucht. Der Tabakrauchkonsum wurde mittels Cotininbestimmung im Urin objektiviert. Ziele der Untersuchung waren der Einfluss von Tabakkonsum auf die quantitative *CFTR*-Funktion der verschiedenen Organsystemen und die diagnostische Wertigkeit von Schweißtest, nPD und ICM.

Raucher weisen eine in der nPD signifikante Reduktion *CFTR*-abhängiger Chloridsekretion bei Gabe der chloridfreien Lösung und Isoproterenol auf ($\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ -9,0 mV vs.-28,4 mV, p=0,000). In der ICM war ein Trend zur erniedrigten CFTR-Funktion bei den Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern messbar, (ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) 72,1 vs. 80,2 µA/cm²). Beim Schweißtest zeigten sich keine Unterschiede. Unter Berücksichtigung diagnostischer Referenzwerte sind die erniedrigten Chloridwerte in der nPD bei 4 Rauchern als kontrollbedürftig zu bewerten und bei einem Raucher im pathologischen Bereich für Mukoviszidose. Wendet man dagegen den sog. Wilschanski-Score für die nPD an, der auch die Funktion des epithelialen Natriumkanals berücksichtigt, so lagen alle Probanden unabhängig vom Raucherstatus im Normbereich. Beim Schweißtest und der ICM lagen Raucher trotz *CFTR*-Funktionsstörung nicht im pathologischen Bereich, der für die Mukoviszidose definiert ist.

Die sekundäre *CFTR*-Funktionsstörung bei Tabakrauch bietet therapeutische Ansätze (z.B. Ivacaftor) zur Behandlung tabakrauchinduzierter Lungenerkrankungen. Für die

diagnostische Beurteilung von *CFTR*-Funktionstests für die Mukoviszidose ist das Wissen um den Tabakkonsum notwendig.

6. Summary

Tobacco smoke induces inflammation and impaired mucocilliary clearance in the airways, which leads to chronic bronchitis and chronic obstructive lung disease (COPD). Animal models showed reduced CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) mRNA levels and decreased chloride secretion after cigarette smoke exposure.

CFTR is an important chloride channel in the apical epithelial membrane of exocrine glands. Cystic fibrosis is caused by a functional deficit of more than 70% of *CFTR* which results in mucus retention preceding chronic inflammation and infection in the respiratory tract.

In this study sweat test, nasal potential difference (nPD) and intestinal current measurement (ICM) in rectal biopsies were performed in 13 healthy smokers and 19 healthy nonsmokers. Cigarette smoke exposure was defined by urine cotinine. The aim of the study was to determine the impact of cigarette smoke on the quantitative *CFTR*-function in sweat glands, airway and intestine and on the diagnostic cut-offs of these diagnostic techniques.

Smokers had a significant decreased chloride secretion in nPD compared to nonsmokers ($\Delta PD_{FreeCl/Iso}$ -9,0 mV vs.-28,4 mV, p=0,000) after perfusion of chloridefree solution and isoproterenol. There was a trend to reduced CFTR-function in the ICM of smokers, although not significant (ΔI_{sc} (Forsk+Ca+His) smokers 72,1 vs.nonsmokers 80,2 µA/cm²).

From the CF diagnostic point of view one smoker had a pathologic and four smokers showed an intermediate range due to CFTR-dysfunction. In contrast the so called Wilschanski Score (reflecting function of CFTR-channel and epithelial sodium channel (ENaC)) in nPD as well as sweat test and ICM results did not reach pathologic cut-offs.

The suppressed *CFTR* function due to tobacco smoke offers a target for therapeutic efforts in COPD, i.e. the *CFTR* potentiator ivacaftor. Information about smoking status is important for the use of nPD and ICM as diagnostic tools for cystic fibrosis .

7. Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Aufbau des *CFTR*-Kanal 2
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der CFTR-Funktion am Atemwegsepithel ... 3
Abbildung 2-1 Iontophorese mittels Macroduct ® Sweat Inducer und Pilokarpingels 8
Abbildung 2-2 Macroduct Sweat Collector 9
Abbildung 2-3 nPD-Messkurven des eigenen Kollektivs 12
Abbildung 2-4 Schematischer Versuchsaufbau der nPD 15
Abbildung 2-5 Proband bei der nasalen PD Messung 16
Abbildung 2-6 Ussing Kammer mit 4 Kammern 20
Abbildung 3-1 Altersverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht 26
Abbildung 3-2 Anamnestische Nikotinbelastung versus Raucherstatus nach Cotinin/Kreatinin Quotient 27
Abbildung 3-3 Täglicher Zigarettenkonsum 30
Abbildung 3-4 CotininKreatinin Konzentration im Verhältnis zu Rauchmenge 31
Abbildung 3-5 Verteilung der Schweißchloridwerte der Probanden 32
Abbildung 3-6 Boxplot Raucherstatus und Schweißchlorid in mmol/l 33
Abbildung 3-7 Boxplot ΔPDFreeCl/Iso_Best, angegeben in mV, nach bester Auswahl aus 2 Messungen 38
Abbildung 3-8 Abbildung Basale PD in mV aus bester Auswahl aus 2 Messungen 40
Abbildung 3-9 Amiloridantwort in mV aus bester Auswahl aus 2 Messungen 41
Abbildung 3-10 ATP Antwort nach bester Auswahl aus 2 Messungen 42
Abbildung 3-11 Normalverteilung der Stromstärken-Summe nach Gabe von Forskolin, Histamin und Carbachol in µA/cm² 42
Abbildung 3-12 Boxplot für ΔI_{sc}(Forsk+Ca+His) in µg/cm² 43
Abbildung 3-13 Boxplot Δ Isc (Forsk) 45

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie 7
Tabelle 2-2 Zusammensetzung der Basislösung (A) 13
Tabelle 2-3 Verwendete Lösungen in der nPD 13
Tabelle 2-4 Zusammensetzung der chloridfreien Lösung 13
Tabelle 2-5 Lösungen und Werte mit entsprechender Wirkung bzw. Aussage, nach (Knowles, Paradiso and Boucher 1995) 17
Tabelle 2-6 Zusammensetzung des Meyler-Puffer für ICM 21
Tabelle 2-7 Chemikalien und Pharmaka für nPD und ICM 24
Tabelle 3-1 Raucherstatus nach Cotinin Krea Quotient versus anamnestisch berichteter aktiver Nikotinbelastung 27
Tabelle 3-2 Gesundheitsdaten des Untersuchungskollektivs 29
Tabelle 3-3 Median und Range der Cot/Krea im Verhältnis zur täglich gerauchter Zigarettenmenge 31
Tabelle 3-4 Passivrauchexposition der Teilnehmer 31
Tabelle 3-5 Median, Interquartil und Range der Schweißchloridergebnisse 32
Tabelle 3-6 Kategorielle Verteilung der Schweißchloridwerte 33
Tabelle 3-7 Schweißchlorid bei anamnestisch berichteter aktiver und nicht-aktiver Nikotinbelastung 34

Tabelle 3-8 Verteilung des besten Wiederanstieges anhand diagnostischer Referenzwerte 35
Tabelle 3-9 Zusammenhang zwischen HNO_OP und bester Wiederanstieg 35
Tabelle 3-10 Ergebnis des Wilschanski Scorest 36
Tabelle 3-11 Ergebnis des Sermet Scores 36
Tabelle 3-12 Verteilung des besten Wiederanstieges auf die Referenzbereiche nach bester Auswahl aus 2 Messungen 37
Tabelle 3-13 Ergebnis Wilschanski Score nach bester Auswahl aus 2 Messungen 37
Tabelle 3-14 Ergebnis Sermet Score nach bester Auswahl aus 2 Messungen 38
Tabelle 3-15 Median, Interquartil und Range des ΔPDFreeCl/Iso_Best nach bester Auswahl 38
Tabelle 3-16 Median, Interquartil und Range des ΔPDFreeCl/Iso_Average nach bester Auswahl 39
Tabelle 3-17 Median, Interquartil und Range der Basale PD aus bester Auswahl von 2 Messungen 40
Tabelle 3-18 Änderung der Potentialdifferenz nach Gabe von ATP bei bester Auswahl aus 2 Messungen 40
Tabelle 3-19 Median, Interquartil und Range für Änderung der PD nach Gabe von ATP bei bester Auswahl aus 2 Messungen 41
Tabelle 3-20 Median, Interquartil und Range der Stromstärken-Summe nach Forskolin, Histamin und Carbachol in µA/cm² 43
Tabelle 3-21 Verteilung der Stromstärken-Summe nach Gabe von Forskolin, Histamin und Carbachol auf die Referenzbereiche 44
Tabelle 3-22 Median, Interquartil und Range von ΔIsc(Forsk) 44

7.3 Abkürzungen

Abkürzung	Vollständiger Name
ARC	Allergische Rhinokonjunktivitis
ASL	airway surface layer
CF	Zystische Fibrose, Mukoviszidose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
Cot/Krea	Cotinin Kreatinin
DNWG	Diagnostic Network Working Group
ECFS	European Cystic Fibrosis Society
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ICM	Intestinal Current Measurement
Isc	Kurzschlussstrom
KCL	Kaliumchlorid
Mol	Molar
mV	Millivolt

nPD	Nasale Potentialdifferenzmessung
NR	Nichtraucher
PD	Potentialdifferenz
PR	Passivrauch
Sek	Sekunde
SOP	Standard Operating Procedure
ST	Schweißtest
Std.	Stunden
TN	Teilnehmer
Zig.	Zigaretten

8. Literaturverzeichnis

Adcock, I. M., G. Caramori and P. J. Barnes (2011). "Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights." Respiration **81**(4): 265-284.

Baby, M. K., P. K. Muthu, P. Johnson and S. Kannan (2014). "Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance: A comparative analysis using saccharin test." Lung India **31**(1): 39-42.

Bagheri-Hanson, A., S. Nedwed, C. Rueckes-Nilges and L. Naehrlich (2014). "Intestinal current measurement versus nasal potential difference measurements for diagnosis of cystic fibrosis: a case-control study." BMC Pulm Med **14**: 156.

Benowitz, N. L. and P. Jacob, 3rd (1994). "Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method." Clin Pharmacol Ther **56**(5): 483-493.

Bohning, D. E., R. E. Albert, M. Lippmann and W. M. Foster (1975). "Tracheobronchial particle deposition and clearance. A study of the effects of cigarette smoking in monozygotic twins." Arch Environ Health **30**(9): 457-462.

Boucher, R. C., M. J. Stutts, M. R. Knowles, L. Cantley and J. T. Gatzy (1986). "Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation." J Clin Invest **78**(5): 1245-1252.

Brand, P. L., J. Gerritsen and W. M. van Aalderen (1996). "A baby with eczema and an abnormal sweat test." Lancet **348**(9032): 932.

Cantin, A. M., J. W. Hanrahan, G. Bilodeau, L. Ellis, A. Dupuis, J. Liao, J. Zielenski and P. Durie (2006). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers." Am J Respir Crit Care Med **173**(10): 1139-1144.

Chiaw, P. K., P. D. W. Eckford and C. E. Bear (2011). "Insights into the mechanisms underlying CFTR channel activity, the molecular basis for cystic fibrosis and strategies for therapy." Essays In Biochemistry **50**: 233-248.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Sweat testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis. Wayne, PA, USA. **29**.

Clunes, L. A., C. M. Davies, R. D. Coakley, A. A. Aleksandrov, A. G. Henderson, K. L. Zeman, E. N. Worthington, M. Gentzsch, S. M. Kreda, D. Cholon, W. D. Bennett, J. R. Riordan, R. C. Boucher and R. Tarran (2012). "Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration." Faseb j **26**(2): 533-545.

Clunes, M. T. and R. C. Boucher (2011). "Introduction to section I: overview of approaches to study cystic fibrosis pathophysiology." Methods Mol Biol **742**: 3-14.

Courville, C. A., S. V. Raju, B. Liu, F. J. Accurso, M. T. Dransfield and S. M. Rowe (2015). "Recovery of Acquired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dysfunction after Smoking Cessation." Am J Respir Crit Care Med **192**(12): 1521-1524.

Courville, C. A., S. Tidwell, B. Liu, F. J. Accurso, M. T. Dransfield and S. M. Rowe (2014). "Acquired defects in CFTR-dependent beta-adrenergic sweat secretion in chronic obstructive pulmonary disease." Respir Res **15**: 25.

Davis, P. B., M. Drumm and M. W. Konstan (1996). "Cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **154**(5): 1229-1256.

De Boeck, K., N. Derichs, I. Fajac, H. R. de Jonge, I. Bronsveld, I. Sermet, F. Vermeulen, D. N. Sheppard, H. Cuppens, M. Hug, P. Melotti, P. G. Middleton and M. Wilschanski (2011). "New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe." J Cyst Fibros **10 Suppl 2**: S53-66.

De Jonge, H. R., M. Ballmann, H. Veeze, I. Bronsveld, F. Stanke, B. Tummler and M. Sinaasappel (2004). "Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers." J Cyst Fibros **3 Suppl 2**: 159-163.

Derichs, N., J. Sanz, T. Von Kanel, C. Stolpe, A. Zapf, B. Tummler, S. Gallati and M. Ballmann (2010). "Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data." Thorax **65**(7): 594-599.

Dietel, M., N. Suttorp and M. Zeitz (2012). Harrisons Innere Medizin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
Doherty-Fuller, E. and K. C. Copeland (1988). "Sweat tests in patients with diabetes insipidus." Clin Pediatr (Phila) **27**(7): 330-332.
Dransfield, M. T., A. M. Wilhelm, B. Flanagan, C. Courville, S. L. Tidwell, S. V. Raju, A. Gaggar, C. Steele, L. P. Tang, B. Liu and S. M. Rowe (2013). "Acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in the lower airways in COPD." Chest **144**(2): 498-506.
ECFS Diagnostic Network Working Group (2011). Ion Transport in Rectal Biopsies for Daignostic and Clinical Trials in Cystic Fibrosis. E. C. F. Society.
ECFS Diagnostic Network Working Group (2013). Nasal Potential Difference Measurement for Diagnosis and Clinical Trials in Cystic Fibrosis. Standard Operating Procedure. D. N. W. G. C. T. Network.
Farrell, P. M., B. J. Rosenstein, T. B. White, F. J. Accurso, C. Castellani, G. R. Cutting, P. R. Durie, V. A. Legrys, J. Massie, R. B. Parad, M. J. Rock, P. W. Campbell, 3rd and F. Cystic Fibrosis (2008). "Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report." J Pediatr **153**(2): S4-S14.
Graeber, S. Y., M. J. Hug, O. Sommerburg, S. Hirtz, J. Hentschel, A. Heinzmann, C. Dopfer, A. Schulz, J. G. Mainz, B. Tummler and M. A. Mall (2015). "Intestinal Current Measurements Detect Activation of Mutant CFTR in Patients with Cystic Fibrosis with the G551D Mutation Treated with Ivacaftor." Am J Respir Crit Care Med **192**(10): 1252-1255.
Hidaka, N. and Y. Hidaka (1999). "[Cystic fibrosis lung disease and its management]." Nihon Rinsho **57**(9): 2139-2144.
Keenan, K., J. Avolio, C. Rueckes-Nilges, E. Tullis, T. Gonska and L. Naehrlich (2015). "Nasal potential difference: Best or average result for CFTR function as diagnostic criteria for cystic fibrosis?" J Cyst Fibros **14**(3): 310-316.
Knowles, M., J. Gatzy and R. Boucher (1981). "Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis." N Engl J Med **305**(25): 1489-1495.
Knowles, M. R., A. M. Paradiso and R. C. Boucher (1995). "In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis." Hum Gene Ther **6**(4): 445-455.
Kreindler, J. L., A. D. Jackson, P. A. Kemp, R. J. Bridges and H. Danahay (2005). "Inhibition of chloride secretion in human bronchial epithelial cells by cigarette smoke extract." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology **288**(5): L894-L902.
LeGrys, V. A. (1996). "Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations." J Pediatr **129**(6): 892-897.
Loeffler, G. P., P.E. (1997). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
MacKenzie, T., A. H. Gifford, K. A. Sabadosa, H. B. Quinton, E. A. Knapp, C. H. Goss and B. C. Marshall (2014). "Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry." Ann Intern Med **161**(4): 233-241.
Matsui, H., B. R. Grubb, R. Tarran, S. H. Randell, J. T. Gatzy, C. W. Davis and R. C. Boucher (1998). "Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease." Cell **95**(7): 1005-1015.
Mishra, A., R. Greaves, K. Smith, J. B. Carlin, A. Wootton, R. Stirling and J. Massie (2008). "Diagnosis of cystic fibrosis by sweat testing: age-specific reference intervals." J Pediatr **153**(6): 758-763.
Naehrlich, L., M. Stuhrmann-Spangenbergberg, J. Barben, J. Bargon, O. Blankenstein, W. Bremer, F. Brunsmann, Buchholz, H. Ellenmunter, C. Fusch, U. Gembruch, J. Hammermann, J. Jacobeit, A. Jung, V. Keim, S. Loff, S. Mayr, S. Pfeiffer-Auler, R. Rossi, H. Sitter, M. Stern, C. Strassburg and N. Derichs (2013). S2-Konsensus-Leitlinie „Diagnose der Mukoviszidose“

(AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie. AWMF online.
Pilewski, J. M. and R. A. Frizzell (1999). "Role of CFTR in airway disease." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S215-255.
Quinton, P., L. Molyneux, W. Ip, A. Dupuis, J. Avolio, E. Tullis, D. Conrad, A. K. Shamsuddin, P. Durie and T. Gonska (2012). "beta-adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **186**(8): 732-739.
Raju, S. V., P. L. Jackson, C. A. Courville, C. M. McNicholas, P. A. Sloane, G. Sabbatini, S. Tidwell, L. P. Tang, B. Liu, J. A. Fortenberry, C. W. Jones, J. A. Boydston, J. P. Clancy, L. E. Bowen, F. J. Accurso, J. E. Blalock, M. T. Dransfield and S. M. Rowe (2013). "Cigarette smoke induces systemic defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function." Am J Respir Crit Care Med **188**(11): 1321-1330.
Reese, A. C., I. R. James, L. I. Landau and P. N. Lesouef (1992). "Relationship between urinary cotinine level and diagnosis in children admitted to hospital." Am Rev Respir Dis **146**(1): 66-70.
Riboli, E., N. J. Haley, F. De Waard and R. Saracci (1995). "Validity of urinary biomarkers of exposure to tobacco smoke following prolonged storage." Int J Epidemiol **24**(2): 354-358.
Riboli, E., S. Preston-Martin, R. Saracci, N. J. Haley, D. Trichopoulos, H. Becher, J. D. Burch, E. T. Fontham, Y. T. Gao, S. K. Jindal and et al. (1990). "Exposure of nonsmoking women to environmental tobacco smoke: a 10-country collaborative study." Cancer Causes Control **1**(3): 243-252.
Rowe, S. M., J. P. Clancy and M. Wilschanski (2011). "Nasal potential difference measurements to assess CFTR ion channel activity." Methods Mol Biol **741**: 69-86.
RP-Online (2006) "Mikozensus 2005: Drei Viertel der Deutschen sind Nichtraucher."
Selimoglu, M. A., S. Altinkaynak and H. Yigit (2004). "Sweat test results in children with primary protein energy malnutrition." J Pediatr Gastroenterol Nutr **39**(2): 213-214.
Sermet-Gaudelus, I., E. Girodon, D. Sands, N. Stremmler, V. Vavrova, E. Deneuville, P. Reix, S. Bui, F. Huet, M. Lebourgeois, A. Munck, A. Iron, V. Skalicka, T. Bienvenu, D. Roussel, G. Lenoir, G. Bellon, J. Sarles, M. Macek, M. Roussey, I. Fajac and A. Edelman (2010). "Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport." Am J Respir Crit Care Med **182**(7): 929-936.
Sloane, P. A., S. Shastry, A. Wilhelm, C. Courville, L. P. Tang, K. Backer, E. Levin, S. V. Raju, Y. Li, M. Mazur, S. Byan-Parker, W. Grizzle, E. J. Sorscher, M. T. Dransfield and S. M. Rowe (2012). "A pharmacologic approach to acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in smoking related lung disease." PLoS One **7**(6): e39809.
Solomon, G. M., H. Hathorne, B. Liu, S. V. Raju, G. Reeves, E. P. Acosta, M. T. Dransfield and S. M. Rowe (2016). "Pilot evaluation of ivacaftor for chronic bronchitis." Lancet Respir Med **4**(6): e32-33.
Squires, L. and T. F. Dolan (1989). "Abnormal sweat chloride in auto-immune hypothyroidism." Clin Pediatr (Phila) **28**(11): 535-536.
Statistisches Bundesamt. (2013). "Mikrozensus- Fragen zur Gesundheit, Rauchgewohnheiten der Bevölkerung." Retrieved Nov 2016, 2016, from https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Gesundheitszustand/Rauchgewohnheiten5239004139004.pdf?__blob=publicationFile.
Statistisches Bundesamt (2014). Fragen zur Gesundheit/Rauchgewohnheiten der Bevölkerung. Wiesbaden, Germany. **Fachserie/12/S3**.
Stutts, M., C. Canessa, J. Olsen, M. Hamrick, J. Cohn, B. Rossier and R. Boucher (1995). "CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels." Science **269**(5225): 847-850.
Surgeon General of the United States (2010). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. U. S. D. o. H. a. H. Services. Atlanta (GA), Centers for Disease Control and Prevention (US).

Tarran, R., B. R. Grubb, J. T. Gatzy, C. W. Davis and R. C. Boucher (2001). "The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition." J Gen Physiol **118**(2): 223-236.
Therapeutic Develoment Network Coordinating Center (2009). Standardization of Measurement of Nasal Membrane Transepithelial Potential Difference (NPD). CFFT.
Van Goor, F., S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, A. Turnbull, A. Singh, J. Joubran, A. Hazlewood, J. Zhou, J. McCartney, V. Arumugam, C. Decker, J. Yang, C. Young, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock and P. Negulescu (2009). "Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18825-18830.
Welsh, M. J. (1983). "Cigarette smoke inhibition of ion transport in canine tracheal epithelium." J Clin Invest **71**(6): 1614-1623.
Wilschanski, M., H. Famini, N. Strauss-Liviatan, J. Rivlin, H. Blau, H. Bibi, L. Bentur, Y. Yahav, H. Springer, M. R. Kramer, A. Klar, A. Ilani, B. Kerem and E. Kerem (2001). "Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis." Eur Respir J **17**(6): 1208-1215.

Anhang

Einverständniserklärungen

Studie zu neuen Methoden zur Diagnose der Mukoviszidose

(Information für volljährige Probanden; Version 1.1. vom 07.07.2014)

Liebe Studienteilnehmer,

die Diagnose der Mukoviszidose (angeborene Stoffwechselerkrankung mit Bauchspeicheldrüsenunterfunktion und/oder chronischer Lungenerkrankung) ist auch im Zeitalter von Schweißtest und genetischen Untersuchungen im Einzelfall schwierig zu stellen. In diesen Fällen sind Funktionsuntersuchungen des Chloridkanals an der Oberfläche schleimbildender Drüsen von besonderer Bedeutung. Diese Funktionsuntersuchungen werden an der Nasen- und Darmschleimhaut durchgeführt. Zur Beurteilung der Ergebnisse sind wir auf Befunde von Mukoviszidosepatienten und Gesunden angewiesen.

1. Ziele, Methoden und Ausschlusskriterien der Untersuchung

Im Rahmen dieser Studie sollen Ergebnisse der Funktionsuntersuchungen an der Nasen- und Darmschleimhaut erhoben und bei Mukoviszidosepatienten und Gesunden verglichen werden. Diese Untersuchungen sollen bei 50 Mukoviszidosepatienten und 50 Gesunden zur Erhebung von Referenzbereichen sowie bei Patienten mit Verdacht auf Mukoviszidose durchgeführt werden. **Sollten Sie in den letzten 30 Tagen vor dem Untersuchungszeitpunkt an einer Medikamentenstudie teilgenommen haben, sollte die Untersuchung verschoben werden. Sollte bei Ihnen eine vermehrte Blutungsneigung und/oder Hämorrhroiden vorliegen, bitten wir Sie, uns dies mitzuteilen.**

2. Ablauf der Untersuchungen

Die Probanden werden in die Studie eingeschlossen, sobald Sie zugestimmt haben. Die Untersuchung besteht aus einem Schweißtest, der Messung der Chloridkanalfunktion an der Nasenschleimhaut (nasale Potentialdifferenzmessung) und einer Entnahme von Enddarmgewebeproben

zur Messung der Chloridkanalfunktion außerhalb des Körpers (im Labor) (intestinale Kurzstrommessung).

Beim *Schweißtest* werden für 5 min auf dem Unterarm zwei ca. 5 cm große Gelscheiben mittels eines elastischen Bands befestigt und über einen niedrigen Strom die Schweißproduktion angeregt. Dabei kann es zu einem Kribbeln und einer Hautrötung kommen, die sich innerhalb einiger Stunden vollständig zurückbildet. Anschließend werden die Gelscheiben entfernt und an einer dieser Stellen ein Schweißsammelgefäß (ähnlich wie eine Armbanduhr) mit einem elastischen Band für 30 min befestigt. Dieses wird anschließend entfernt und der Schweiß aus dem Sammelgefäß zur Untersuchung weitergeleitet. Die Untersuchung dauert insgesamt 40 min.

Für die *Messung der Choridkanalfunktion an der Nase* wird am Oberarm eine kleine Nadel oberflächlich in die Haut eingeführt. Mit einem zweiten weichen Schlauch wird in einer Nase ein Messpunkt gesucht und der Schlauch anschließend mit Pflastern befestigt. Danach spülen wir über diesen Schlauch die Nase mit unterschiedlichen, geschmacklosen Flüssigkeiten, die Natriumkanäle blockieren (Amilorid) und Chloridkanäle stimulieren (chloridfreie Lösung, Isoproterenol (Betasympathomimetikium) und ATP). Dabei sollte der Kopf nach vorne gebeugt und ruhig gehalten werden, damit die Flüssigkeiten zur Nasenspitze hin ablaufen können und die Untersuchung gut zu beurteilen ist. In der Nase sind ein leichtes Kribbeln und ein ständiges Naselaufen durch die Flüssigkeiten zu spüren. Nach circa 15 min ist die Untersuchung beendet und es wird die andere Nasenseite untersucht. Die gesamte Untersuchung dauert 30 min.

Durch eine Urinanalyse bestimmen wir den Cotiningehaltes als wichtiger Metabolit des Nikotins. Dieser kann auch bei Passivrauchen erhöht sein. Es gibt wissenschaftliche Hinweis darauf, dass Zigarettenrauch einen Einfluss auf die o.g. Chloridkanalfunktion hat und somit bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Als letzte Untersuchung entnehmen wir kleine oberflächliche Gewebeproben aus dem Enddarm zur *Messung der Chloridkanalfunktion im Enddarm*. Hierzu müssen Sie sich auf den Rücken legen, die Hose etwas herunterziehen und die Beine anwinkeln. Wie beim Fiebermessen wird ein kleines stumpfes Instrument in der Größe eines Kugelschreibers 5 cm in den Enddarm eingeführt. Dabei spürt Ihr Kind einen leichten Druck. Danach werden über einen leichten Unterdruck ca. 5x5mm große Gewebsproben in seitliche Öffnungen des Instrumentes angesaugt und abgetrennt. Da im untersuchten Darmabschnitt keine Schmerzfasern angelegt sind, spüren Sie keinen Schmerz. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt, um 8 Biopsien zu untersuchen. Danach werden die Gewebsproben im Labor untersucht und für Sie ist die Untersuchung abgeschlossen.

Nach ca. 2 Tagen nach den Untersuchungen werden wir Sie telefonisch kontaktieren, um nach der Akzeptanz der Untersuchung zu fragen.

3. Möglicher Nutzen

Die Ergebnisse der Messungen an Mukoviszidosepatienten und Gesunden sind die Grundlage für die Erstellung von Referenzbereichen. Diese Referenzbereiche bilden die Grundlage für die Beurteilung der Befunde von Verdachtsfällen. Die gesammelten Erfahrungen helfen uns, die Beurteilung fortlaufend zu entwickeln und die Referenzbereiche auf eine breite Basis zu stellen.

4. Mögliche Risiken

Beim Schweißtest kann es zu einem Kribbeln und einer vorübergehenden Hautrötung kommen. In sehr seltenen Fällen (in weniger als einem von 50000 Untersuchten) kann es zu einer geringfügigen Hautverbrennung kommen, die innerhalb von 1-2 Wochen ohne oder mit lediglich geringfügiger Narbenbildung abheilt.

Bei der Messung der Choridkanalfunktion an der Nase wird eine subkutane Referenzelektrode über eine kleine Nadel am Arm angeschlossen. Dabei kann es in seltenen Fällen zu Blutungen, Gefäß- oder Nervenverletzungen kommen. Anschließend werden über einen weichen Schlauch an der Nasenschleimhaut die Potentialdifferenzen gemessen und Ionenkanäle durch verschiedene Substanzen und Lösungen beeinflusst. Dabei kann es in seltenen Fällen zu Verletzungen, leichten Reizungen und leichten Blutungen der Nasenschleimhaut kommen. Schwerwiegendere Komplikationen sind aus der bisherigen Literatur nicht bekannt. Die Testsubstanzen enthalten Medikamente (Amilorid, Isoprenalin, Adenosintriphosphat) in sehr geringen Konzentrationen, so dass keine Nebenwirkungen zu erwarten sind, auch für den Fall, dass ein Teil der Flüssigkeit verschluckt werden sollte.

Für die *Messung der Chloridkanalfunktion im Enddarm* sind 6-8 oberflächliche Gewebsproben notwendig. Bei der Entnahme kann es sehr selten zu Verletzungen der Darmwand und stärkeren Blutungen kommen, die besondere Maßnahmen (z.B. Blutstillung) erfordern.

5. Datenschutz

Wie üblich unterliegen alle Mitarbeiter des Behandlungsteams und die Mitarbeiter aller anderen beteiligten Institutionen der ärztlichen Schweigepflicht. Bei wissenschaftlichen Studien werden personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde erhoben. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach den gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzgesetzes und setzt vor der Teilnahme an der

Studie folgende freiwillige Einwilligungen voraus: Sie erklären sich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten und Krankheitsdaten in Papierform und auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) an den Studienleiter, Dr. Nährlich (Gießen) oder eine von diesem beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung weitergeben werden.

Falls Sie Ihre Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufen, müssen alle Stellen, die personenbezogene Daten gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die Pflicht zur Vorlage vollständiger Unterlagen noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Die Veröffentlichung der Studienergebnisse erfolgt selbstverständlich in anonymisierter und zusammengefasster Form.

6. Freiwilligkeit der Teilnahme

Ihre Teilnahme ist absolut freiwillig. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit, auch während der Studie ohne Angaben von Gründen zurücknehmen. Ihnen entstehen daraus für die weitere Behandlung keine Konsequenzen. Sollten Sie nicht länger an der Studie teilnehmen wollen, setzten Sie sich bitte mit uns Verbindung.

Für Ihre Fragen steht Ihnen Ihr behandelnder Arzt jederzeit zur Verfügung. Schon jetzt vielen Dank für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme.

Ansprechpartner:

Dr. Lutz Nährlich

Universitätsklinikum Gießen Marburg GmbH

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Feulgenstr. 12

35385 Gießen

Anamnesebogen nach SOP ICM_EU001, Version 2.7
Fragebogen für Studienteilnehmer

Untersuchungdatum:		
Name:		Geschlecht:
Geburtsdatum:		Weiblich / männlich
Herkunft:		
	Tel:	Welche Uhrzeit:
Haben Sie....	... Husten? Chronisch/akut	Ja / Nein
	In den letzten 2 Wochen einen Infekt?	Ja / Nein
	..jemals Atemnot gehabt?	Ja / Nein
	... Nasenpolypen ?	Ja / Nein
	Wenn, ja, wurden Sie schon mal operiert?	Ja / Nein
	.... Nasenbluten	Ja / Nein
	... Asthma:	Ja / Nein
	.... COPD:	Ja / Nein
	.... Bronchiektasen ?	Ja / Nein
	.... Allergien:	Ja / Nein

	… Heuschnupfen ?	Ja / Nein
	.... Chronischer Schnupfen?	Ja / Nein
	.... chron. Sinusitis ?	Ja / Nein
	...Gerinnungsstörung ?	Ja / Nein
	...Hämorrhoiden	Ja / Nein
	.... eine Lebererkrankung ?	Ja / Nein
Wenn ja, auch	.... Laborwerte erhöht ?	Ja / Nein
	... Fettleber?	Ja / Nein
	... Pfortaderhochdruck ?	Ja / Nein
	.... Leberzirrhose ?	Ja / Nein
Haben Sie....	.... Leibliche Kinder?	Ja / Nein
	.... unerfüllten Kinderwunsch?	Ja / Nein
Gibt es in Ihrer Familie Mitglieder mit...	... Mukoviszidose/Zystische Fibrose ?	Ja / Nein
	... ungeklärten Todesfällen im Kindesalter?	

Medikamente:		
Nehmen Sie regelmäßig/aktuell…	... Schleimlöser wie ACC, Ambroxol?	Ja / Nein
	....Asthma-Sprays?	Ja / Nein
	Wenn ja, welche?	
	...Antibiotika?	Ja / Nein
	Wenn ja, welche?	
	..Azithromycin/Zithromax?	Ja / Nein
	Blutverdünnende Mittel wie Macumar, ASS, Heparin?	Ja / Nein
Corticosteroids:	... Cortisontabletten ?	Ja / Nein
	Wenn ja, welche?	
	... Cortisonspray?	Ja / Nein
	Wenn ja, welches?	
	...Nasenspray?	Ja / Nein
	Wenn ja, welches?	
Sind Sie in pneum. Betreuung?	Ja / Nein	

Ernährungsstatus:		
Gewicht:	Länge:	
Bin Nichtraucher:	Schon immer	Seit: _____ Jahren
Bei Rauchern:		
Wieviele Zigaretten rauchen Sie täglich? (7d)		Wann zuletzt?
Seit wievielen Jahren rauchen Sie?		
Wieviel Passivrauch sind Sie tgl. ausgesetzt? (7d)	In Stunden:	Wann zuletzt?

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!

Selbstverständlich werden Ihre Angaben streng vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben.

SWEAT TESTS		
Method: Gibson and Cooke / Coulometry Uhrzeit:	Mmol/l (1. Messung)	Mmol/l (2. Messung)
NPD-Messung:	Beginn:	Ende:
GENOTYPE		

Genotype known:		Ja / Nein
Allele1:	Allele 2:	
Lungfunction:		
FEV1 (L):	FEV1 (%pred):	
FVC (L):	FVC (%pred):	
FEF25-75 (L):	FEF25-75 (%pred):	
CT scan scoring:		
NUTRITIONAL STATUS		BMI:
Biopsieproben:	Beginn:	Ende:
Anzahl:		
Beginn ICM-Messung:		Ende:
PANCREATIC FUNCTION		
PS / PI		
Fecal elastase:		
Fecal fat (72 hrs):		
OTHER COMPLICATING CONDITIONS		

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen und meine Fortschritte mit großem Interesse begleitet hat.

Herrn Dr. med. Lutz Nährlich danke ich herzlich für die Themenstellung, die Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Bei Frau Claudia Rückes-Nilges und Herrn Kai Haus bedanke ich mich für die Durchführung des Schweißtestes, der nasalen Potentialdifferenzmessung sowie die Kurzschlussstrommessung in der Ussing-Kammer.

Bei Herrn Helge Hudel aus dem Institut für Medizinische Informatik bedanke ich mich für die sehr freundliche Unterstützung bei der Auswertung der Statistik.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. med. Sandra Barth, Frau Annette Simon und Herrn Volker Potthoff für die Arbeit des Korrekturlesens und ihre unermüdliche moralische Unterstützung.

Bei meinen Eltern möchte ich mich in tiefster Hochachtung bedanken, dass sie ihr geliebtes Heimatland verlassen haben, damit ihre Kinder in Freiheit und Demokratie ein selbstbestimmtes Leben führen und ihren Berufungen nachgehen können.