

**Einflüsse auf die Sputum-Deoxyribonucleinsäure bei Mukoviszidose
(Zystische Fibrose)**

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

vorgelegt von
aus

Annette Bock
Marburg

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Leiter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. H. Lindemann

Gutachter: Prof. Dr. R. Schermuly

Tag der Disputation: 15.01.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines.....	1
1.2	Pathomechanismen der Entzündungsreaktionen in Atemwegen und Lunge bei Zystischer Fibrose.....	4
1.2.1	Rolle der Humanen Neutrophilen Elastase (HNE) im Rahmen der Entzündungsreaktion bei Mukoviszidose.....	6
1.3	Inhalative DNase-Therapie bei Mukoviszidose.....	7
1.3.1	Charakterisierung und Wirkungsweise von rekombinanter humaner DNase I....	8
1.3.2	Wirksamkeitsnachweis für rekombinante humane DNase I <i>in vitro</i>	8
1.3.3	Wirksamkeitsnachweis für eine Inhalationstherapie mit rekombinanter humaner DNase I <i>in vivo</i>	9
1.3.4	Fragliche Erhöhung der Elastaseaktivität unter Inhalationstherapie mit DNase....	10
1.4	Rationale für eine Surfactanttherapie bzw. für eine Kombinationstherapie von DNase und Surfactant bei Mukoviszidose.....	11
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	12
2.	Materialien und Methoden.....	14
2.1	Materialien.....	14
2.1.1	Geräte.....	14
2.1.2	Verwendete Medikamente.....	14
2.1.3	Chemikalien.....	15
2.1.3.1	Zusammensetzung der DNA-Marker in Basenpaaren (bp).....	16
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Überprüfung der DNase-Aktivität in Gegenwart von Surfactant.....	17
2.2.1.1	Agarose-Gel-Elektrophoresen.....	17

2.2.1.1.1.	Vorbereitung der Proben.....	17
2.2.1.1.2.	Vorbereitung der Gelkammer und des Agarosegels.....	18
2.2.1.1.3.	Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese und Fotografieren des Geles.....	19
2.2.1.2	Kompressibilität.....	20
2.2.2	Charakterisierung der Oberflächenaktivität.....	21
2.2.3	Semiquantitative Bestimmung der Leukozyten und Erreger im Sputum von CF-Patienten und Kulturen.....	24
2.2.4	Quantitative Leukozytenbestimmung im Sputum von CF-Patienten.....	25
2.2.4.1	Suspendieren der Sputumproben.....	25
2.2.4.2	Prinzip der Isolierung von Zellen mittels eines Percoll®-Dichtegradienten.....	25
2.2.4.3	Durchführung der Dichtgradientenzentrifugation.....	27
2.2.4.4	Vitalfärbung und Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	27
2.2.4.5	Prinzip der Zellquantifizierung mit dem Cell Counter CASY®1DT.....	28
2.2.4.6	Auszählung mittels Cell Counter CASY®1DT.....	29
2.2.5	Messung von DNA und HNE im Sputum.....	30
2.2.6	Statistische Methoden.....	30
3.	Ergebnisse.....	31
3.1	Beziehung zwischen DNA – Konzentration im Sputum und bakterieller Besiedlung.....	31
3.2	Abhängigkeit der Neutrophilen Elastase im Sputum von bakterieller Besiedlung.....	34
3.3	Zusammenhang zwischen DNA und Humaner Neutrophilenelastase (HNE) im Sputum von CF-Patienten.....	36
3.3.1	Verlauf von DNA und HNE im Sputum bei einzelnen CF-Patienten.....	41
3.4	Leukozytenquantifizierung im Sputum von CF-Patienten und Vergleich der Leukozytenzahl mit DNA bzw. HNE.....	44

3.4.1	Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen und Vergleich mit DNA-Konzentration bzw. HNE-Aktivität im Sputum.....	46
3.5	Untersuchungen zum Einfluß von Pulmozyme® auf die oberflächenaktiven Eigenschaften von Alveofact®.....	48
3.5.1	Ergebnis der Adsorptionsmessungen.....	48
3.5.2	Ergebnis der dynamischen Messungen.....	50
3.6	Ergebnisse der Kompressibilitätsversuche.....	51
3.7	Ergebnisse der Agarose-Gel-Elektrophoresen.....	52
4.	Diskussion.....	55
4.1	DNA-Konzentration und Elastaseaktivität im Sputum von CF-Patienten: mögliche diagnostische und therapeutische Konsequenzen.....	55
4.2	Einfluß von DNase-Inhalation auf Elastase.....	58
4.3	Pulmozyme® und Alveofact®.....	60
4.3.1	Untersuchungen zur Interaktion von Pulmozyme® und Alveofact®.....	60
4.3.2	Schlußfolgerungen für eine inhalative Kombinationstherapie von Pulmozyme® und Alveofact®.....	61
5.	Zusammenfassung.....	64
6.	Summary.....	67
7.	Anhang.....	69
7.1	Glossar.....	69
7.2	Einzelwerte der Sputumuntersuchungen.....	71
8.	Literaturverzeichnis.....	75
9.	Danksagung.....	87
10.	Lebenslauf.....	88

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt ist, eingehalten.

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Mukoviszidose, auch als Zystische Fibrose (kurz: CF) bezeichnet, ist die häufigste angeborene Stoffwechselkrankheit der weißen Rasse. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt [1]. *Wainwright et al.* schätzten die Häufigkeit der heterozygoten, symptomlosen Merkmalsträger auf 5 % [2]. Übereinstimmend wird auch aktuell für die weiße Rasse eine Genfrequenz von etwa 1 : 20 bis 1 : 30 angenommen [1, 3].

Daraus ergibt sich eine Inzidenz von 1: 2000 - 2500 aller weißen Lebendgeborenen in Mitteleuropa [1, 3]. Bezogen auf die gesamte weiße Bevölkerung ist mit einem Erkrankungsfall auf 2500 bis 3500 Lebendgeborene zu rechnen [4, 5].

Wainwright et al. sowie *Knowlton et al.* stellten 1985 fest, dass das Mukoviszidose-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 7 lokalisiert ist [2, 6]. Die Lage des CF-Gens konnte 1989 weiter präzisiert werden [7, 8]. Bei der in Mitteleuropa und den U.S.A. häufigsten Mutation handelt es sich um eine Deletion in Position 508 des Genproduktes, die für Phenylalanin kodiert. Diese Mutation, $\Delta F508$, liegt in Mittel- und Nordeuropa in 70-75 % [1] der Fälle vor. Inzwischen sind allerdings über 1300 verschiedene Mutationen bekannt, und mit zahlreichen weiteren, zur Zeit noch nicht bekannten Varianten ist zu rechnen [1].

Defektes Gen	Veränderter Proteinkomplex	Chloridsekretion blockiert, Natriumabsorption gesteigert	Zähes Bronchialsekret
---------------------	-----------------------------------	---	------------------------------

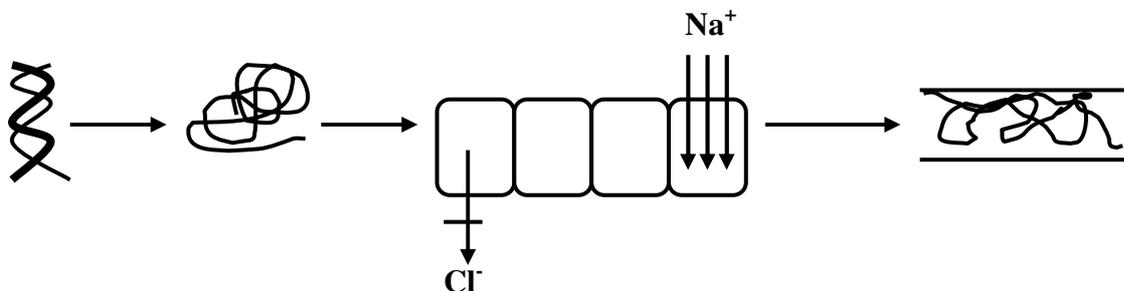


Abb. 1.1: Basisdefekt bei Zystischer Fibrose

Der Gendefekt führt zur Produktion eines defekten Membrantransportproteins, das als Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) bezeichnet wird. Das Protein dient beim Gesunden als Chloridkanal an der apikalen Membran, durch den Chlorid aus der Zelle ins Lumen geschleust wird (Abb. 1.1). Dieser Weg ist beim Mukoviszidosepatienten gestört, so dass sich intrazellulär Cl^- ansammelt. Gleichzeitig ist die Aufnahme von Na^+ aus dem Lumen in das Interstitium gesteigert. Den Natriumionen folgt passiv Wasser, das somit dem Lumen entzogen wird. Dies führt zur Eindickung des Mukus im Lumen, was wiederum die Sekretelimination erheblich erschwert und die klinische Manifestation der CF bedingt [9]:

- Im *Respirationstrakt* kommt es zu gehäuften Infekten, Bronchitiden, Bronchopneumonien und im weiteren Verlauf zur chronischen bakteriellen Besiedlung. Typische Erreger sind dabei vor allem Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa [4, 5, 10-13], für die das zähe Bronchialsekret einen idealen Nährboden darstellt. Die Lungen werden schließlich irreversibel geschädigt; Bronchiektasen, Atelektasen, Lungenfibrose und emphysematische Veränderungen können als Komplikation auftreten. Diese Veränderungen bedingen wiederum eine Hypoxie, pulmonale Hypertonie und Rechtsherzbelastung.
- Im *Pankreas* kann es zur Obstruktion der Ausführungsgänge mit nachfolgender Pankreasinsuffizienz und/oder Pankreatitis kommen. Außerdem kann sich ein sogenannter CF-Diabetes entwickeln.
- Im *Darmtrakt* kann die Obstruktion bis zum kompletten Ileus gehen. Der *Mekoniumileus* des Neugeborenen ist die früheste Manifestationsform der Mukoviszidose. Das Mekoniumileusäquivalent bei Kindern oder Erwachsenen wird auch als Distales Intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS) bezeichnet.
- In der apikalen Zellmembran der Gallengangsepithelzellen führt die gestörte Expression von CFTR zu abnorm viskösen Gallensekreten. Zu den *hepatobiliären Manifestationsformen* der Mukoviszidose gehören eine cholestatische „Cholangitis“ des Säuglings, transiente Hepatomegalie mit Fettleber, Mikrogallenblase, Cholezysto- und Cholangiolithiasis, periportale Fibrose, fokale und multilobuläre biliäre Zirrhose mit den entsprechenden Folgeerscheinungen.
- Durch Obstruktion des *Ductus deferens* sind die meisten männlichen Mukoviszidosepatienten infertil.

- An den *Schweißdrüsen* führt der Chloridkanaldefekt dazu, dass aus dem Primärschweiß kaum NaCl rückresorbiert werden kann, was zu einem im Vergleich mit Gesunden deutlich erhöhten Verlust von Natriumionen und Chlorid über den Schweiß führt. Dieses Phänomen wird bei der Diagnostik der Mukoviszidose im Rahmen des Schweißtestes genutzt, bei dem nach Pilocarpinstimulation der Haut eine deutlich erhöhte Na⁺- beziehungsweise Cl⁻-Konzentration im Schweiß gemessen werden kann [14].

Abb. 1.2 fasst die wichtigsten Manifestationsformen der Mukoviszidose zusammen.

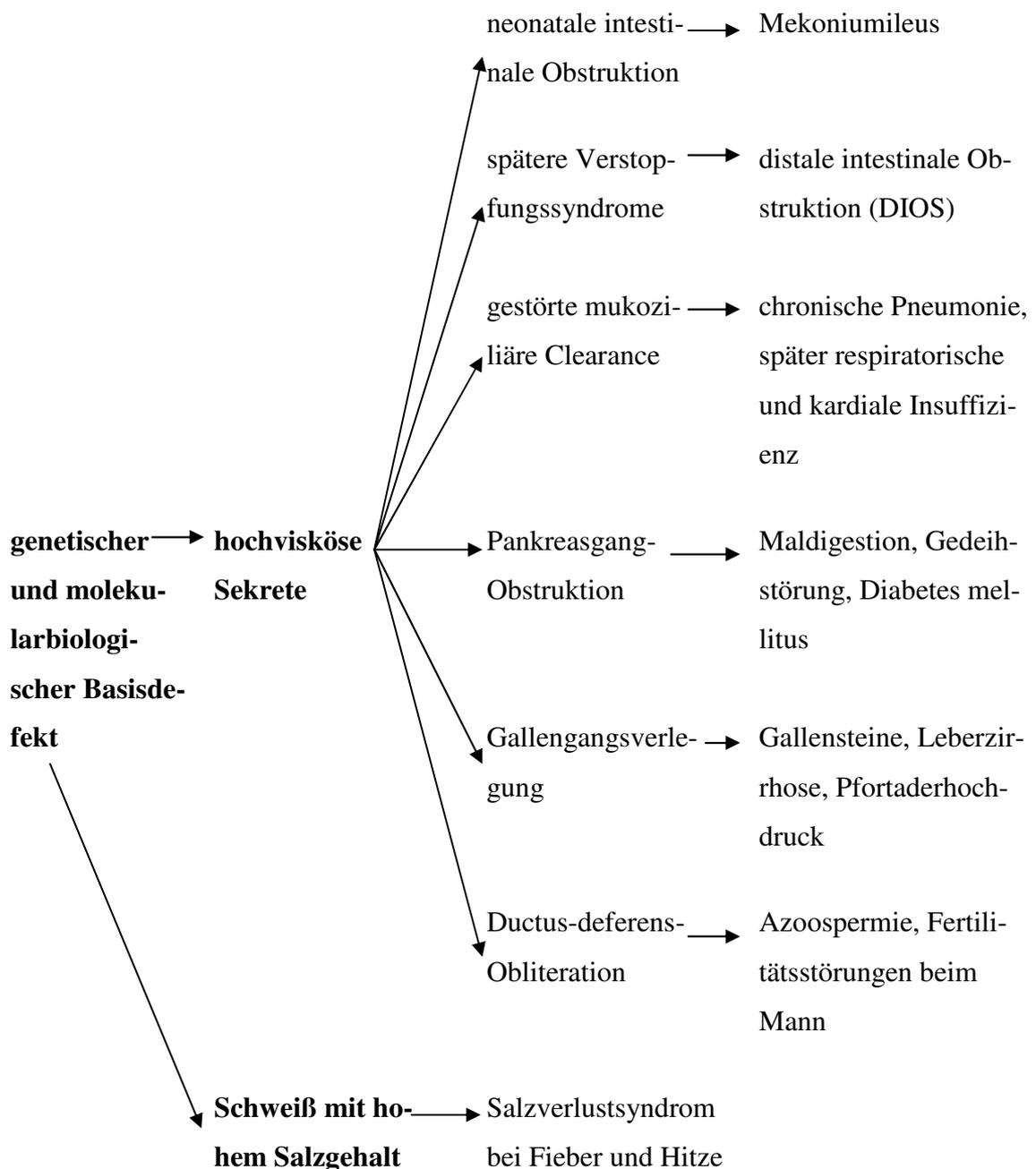


Abb. 1.2: Wichtige Manifestationsformen bei Zystischer Fibrose [1].

- Ferner können Organbeteiligungen von Knochen, Bindegewebe, Gelenken, Nieren und Harnwegen sowie im HNO-Bereich auftreten.

Vorrangiges Ziel einer adäquaten Therapie ist es, die Progredienz der pulmonalen Beteiligung aufzuhalten. Dazu dienen Maßnahmen zur Sekretelimination wie konsequente Physiotherapie und Gabe von Mukolytika wie DNase. Außerdem ist anzustreben, die Häufigkeit bakterieller Infektionen möglichst gering zu halten, beziehungsweise diese bei ihrem Auftreten konsequent antibiotisch zu bekämpfen. Ferner gehören die Gabe von bronchospasmolytischen und antientzündlichen Medikamenten zur Standardtherapie [1,15]. Ultima ratio ist die Lungen- oder gegebenenfalls Herz-Lungentransplantation.

Aufgrund des erhöhten Energiebedarfes ist eine hochkalorische Kost erforderlich. Bei bestehender Pankreasinsuffizienz müssen außerdem Pankreasenzyme und Vitamine substituiert werden.

Ein Großteil der betroffenen Kinder starb noch bis Ende der sechziger Jahre im Vorschulalter [1]. Für heute geborene CF-Patienten kalkuliert man zwar eine mittlere Lebenserwartung von ca. 42 Jahren [1]. Trotz bedeutender Therapiefortschritte vor allem durch eine bessere antibiotische Therapie und konsequente Inhalations- und Physiotherapie bleibt die Prognose jedoch insgesamt weiterhin ernst.

Im Folgenden werden die Entzündungsmechanismen im Respirationstrakt ausführlicher dargestellt, da sich die vorliegende Arbeit darauf konzentriert.

1.2 Pathomechanismen der Entzündungsreaktionen in Atemwegen und Lunge bei Zystischer Fibrose

Aufgrund des defekten CFTR kommt es - wie oben beschrieben - an der apikalen Membran des respiratorischen Epithels zu einer verminderten Chloridsekretion und einer exzessiv gesteigerten Natriumabsorption. Passiv folgt Wasser den Natriumionen in die Zelle. Zusätzliche Transportwege für Chlorid, nämlich kalziumabhängige Chlorkanäle und parazelluläre Mechanismen, sind nicht in der Lage, den durch CFTR bedingten Defekt zu kompensieren [1].

Folge der Störungen sind eine erhebliche Viskositätserhöhung des Bronchialsekrets und eine Sekretretention. Dies führt wiederum zu chronischer Bronchialobstruktion und rezidivierenden Infektionen. Die komplexen Entzündungsmechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind

Gegenstand intensiver Forschung. Von entscheidender Bedeutung ist vor allem eine Störung des Proteasen/Antiproteasen-Gleichgewichts, insbesondere durch Freisetzung von Elastase aus neutrophilen Granulozyten. Neutrophile treten im Sputum von CF-Patienten in einer Konzentration von bis zu 10^9 Zellen/ml auf [16, 17]. Außerdem fallen durch zugrundegehende Leukozyten und Epithelzellen, vor allem wiederum durch neutrophile Granulozyten, große Mengen an DNA im Bronchiallumen an [1,18]. *Amin et al.* geben diesbezüglich Werte von bis zu 3 – 12 mg DNA/ml Sputum an [19]; ähnlich hohe Werte (bis zu 15 mg DNA/ml Sekret) geben *Dasgupta et al.* [20] und *Aitken et al.* an (3 – 14 mg DNA/g Bronchialsekret) [21]. Da es sich bei längererkettigen DNA-Fragmenten um eine hochvisköse Substanz handelt, führt dies zu einer weiteren Eindickung des Bronchialsekrets. Dieser Circulus vitiosus ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt.

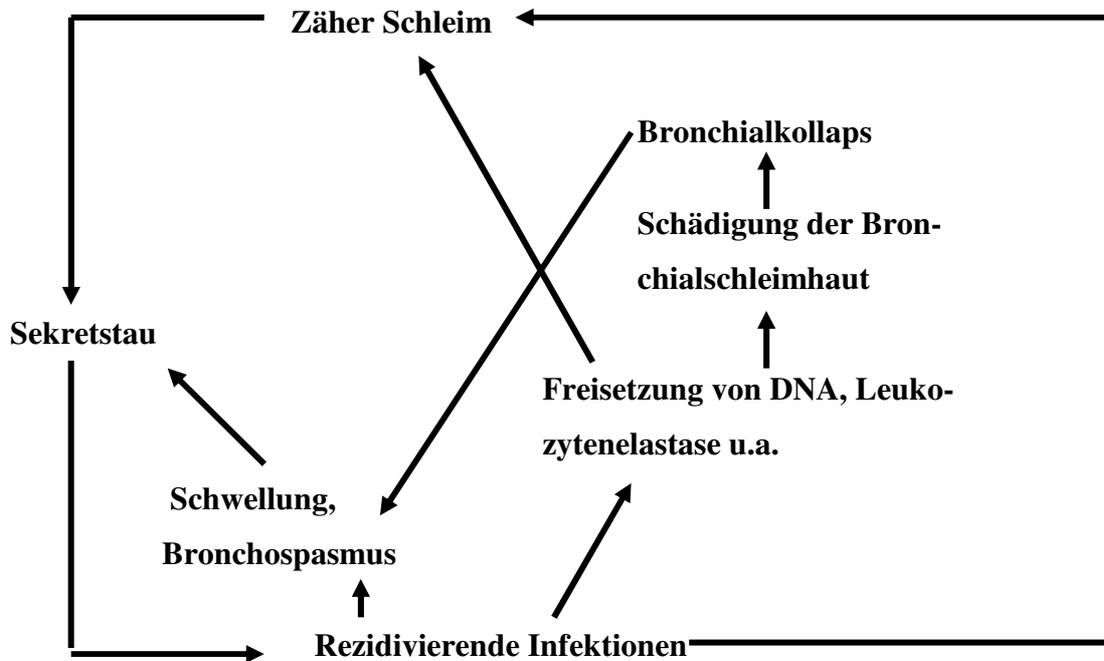


Abb. 1.3: *Circulus vitiosus zwischen viskösem Sekret, Sekretretention und rezidivierenden Infektionen im Respirationstrakt bei Zystischer Fibrose, modifiziert nach [1].*

Im folgenden Kapitel sollen die Auswirkungen der massiven Elastasefreisetzung genauer erläutert werden.

1.2.1 Rolle der Humanen Neutrophilen Elastase (HNE) im Rahmen der Entzündungsreaktion bei Mukoviszidose

Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten (PMN) setzen im Rahmen der erfolgreichen oder frustranen Phagozytose große Mengen lysosomaler Enzyme frei. *Goldstein* vermutete 1976, dass diese Enzyme entscheidend zur Gewebsschädigung bei Entzündungsvorgängen beitragen [22]. *Folds et al.* [23] sowie *Baici et al.* [24] wiesen nach, dass PMN-Proteasen in der Lage sind, *in vitro* humane Immunglobuline zu spalten. *Davis et al.* [25] konnten zeigen, dass die Anzahl von Neutrophilen in der bronchoalveolären Lavage von CF-Patienten ebenso wie Enzyme der Neutrophilen, unter anderem Elastase, deutlich erhöht ist.

Speziell für CF-Patienten mit *Pseudomonas*-Infektionen fanden *Döring et al.* [26] folgende Zusammenhänge:

- *In vivo* besteht eine negative Korrelation zwischen IgG-Immunkomplex-Werten und der HNE-Aktivität. Als mögliche Erklärung geben die Autoren eine eventuelle Spaltung der Immunkomplexe durch PMN-Proteasen an.
- Inkubiert man gereinigte HNE über drei Stunden mit CF-Sputum mit hohen Immunkomplexwerten, so führt dies zu einer deutlichen Reduktion der Immunkomplexwerte um 90%, unabhängig davon, ob es sich um IgG- oder IgA-Immunkomplexe handelt. *In vivo* treten offenbar ausreichend hohe Konzentrationen von HNE auf, um diese Reaktion in Gang zu setzen, denn es konnten Spaltprodukte von leichten und schweren IgG-Ketten in einem CF-Sputum nachgewiesen werden.
- Während die intakten Immunkomplexe *in vitro* neutrophile Granulozyten aktivieren und einen oxidativen burst triggern, geht diese Eigenschaft fast vollständig verloren, wenn die Immunkomplexe zuvor mit gereinigter PMN-Elastase behandelt wurden.

Insbesondere bei IgG handelt es sich um ein „Schlüsselopsonin“ [27, 28]. Auch Komplementfaktoren, z.B. C3bi, ein weiteres wichtiges Opsonin, und Opsoninrezeptoren an der Oberfläche von Phagozyten, wie zum Beispiel CR1, werden durch Neutrophilenelastase zerstört [27-30].

Indem Elastase die Expression von Interleukin-8 (IL-8) induziert, stimuliert das Enzym auf diese Weise außerdem auch die Chemotaxis von Neutrophilen [32-34]. Des Weiteren führt die Freisetzung von Elastase zur Hypertrophie und Hyperplasie der schleimbildenden Zellen, verstärkt die Sekretion von Makromolekülen durch Epithelzellen und schädigt die anatomi-

sche Struktur der Atemwege [34-37], insbesondere durch Spalten von Fibronectin (38), und beeinträchtigt die Zilienfunktion [39, 40]. Ferner gibt es Hinweise, dass Elastase sowohl *in vitro* [41] als auch *in vivo* [42] die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* fördert.

Die Konzentration von HNE im Sputum von CF-Patienten beträgt über 100 µg/ml [37].

Alle diese Faktoren erklären die Persistenz der Entzündungsreaktion und bakterieller Infektionen, wie sie bei CF-Patienten oftmals schon kurz nach der Geburt beobachtet werden [27].

Zusätzlich ist bei Mukoviszidosepatienten die Konzentration des antiinflammatorischen Interleukin-10 (IL-10) erniedrigt, vermutlich weil die Epithelzellen der CF-Lunge nur in eingeschränktem Maße in der Lage sind, dieses zu produzieren [27, 43].

Allgemein lassen diese Beobachtungen eine Dysregulation der Entzündungsreaktion bei Cystischer Fibrose vermuten.

1.3 Inhalative DNase-Therapie bei Mukoviszidose

Wie in Kapitel 1.2 und Abb. 1.3 beschrieben, findet man im Sputum von CF-Patienten große Mengen an DNA, die vor allem von abgestorbenen neutrophilen Granulozyten stammt. Dadurch wird die Viskosität des Sputums weiter erhöht, so dass der in Abb. 1.3 dargestellte Circulus vitiosus aufrechterhalten wird. Um diesen zu durchbrechen, versuchte man schon in den 50er Jahren inhalativ bovine Pankreas-DNase zu verabreichen, mit dem Ziel, die anfallende DNA auf diese Weise enzymatisch zu spalten. *Armstrong et al.* [44] hatten 1950 nachgewiesen, dass diese DNase die Viskosität von purulentem Sputum verringerte. Dies konnte durch verschiedene klinische Studien bestätigt werden [45-49]. Man beobachtete jedoch vermehrt Sensibilisierungen, die u.a. zu Bronchospasmus führen konnten [50]. Daher wurde dieser Therapieansatz zunächst wieder verlassen.

Erst durch die Entwicklung rekombinanter humaner DNase wurde das Problem dieser allergischen Reaktionen gelöst, so dass die inhalative Gabe von DNase mittlerweile ein verbreiteter, bei vielen Patienten bewährter Bestandteil der CF-Therapie ist [1]. Uneinigkeit besteht jedoch noch darüber, ab welchem Stadium der Erkrankung das Medikament eingesetzt werden soll.

In den folgenden Kapiteln werden Eigenschaften und Wirkungsweise von DNase dargestellt; außerdem wird beschrieben, welche Wirksamkeitsnachweise vorliegen.

1.3.1 Charakterisierung und Wirkungsweise von rekombinanter humaner DNase I

Humane DNase I ist nachweisbar in menschlichem Speichel, Urin, Pankreassekret und Blut. Sie ist verantwortlich für die Aufspaltung extrazellulärer DNA durch Hydrolyse [5, 51, 52, 53].

1990 konnten *Shak et al.* humane DNase I klonen und sequenzieren [10, 53]. Dabei wurde ein Klon von 1039 bp isoliert, der für ein Polypeptid aus 260 Aminosäuren kodiert, entsprechend einem Molekulargewicht von ungefähr 33000 bis 38000 Dalton. Außerdem ist bekannt, dass die Aktivität der humanen DNase ein pH-Optimum von 5,5-7,5 aufweist [53, 54] und abhängig ist von der Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} in Konzentrationen von jeweils 4 mmol [53]. Durch Hitze (10 Minuten bei 100°C) wird das Enzym inaktiviert [53]. Aktin stellt einen spezifischen Inhibitor für humane DNase dar.

Der Anteil der DNA an den festen Bestandteilen von CF-Sputum liegt bei ca. 3-4 % [55-57]. Durch hydrolytische Spaltung der anfallenden DNA reduziert humane DNase I in signifikanter Weise die Viskosität von purulentem CF-Sputum.

1.3.2 Wirksamkeitsnachweis für rekombinante humane DNase I *in vitro*

1990 konnten *Shak et al.* [53] nachweisen, dass die Viskosität des Sputums von CF-Patienten nach Inkubation mit rekombinanter humaner DNase I konzentrationsabhängig sinkt. Es fand sich eine Reduzierung der Größe der DNA-Fragmente im Sputum. Entsprechend dem Wirkmechanismus des Medikamentes war keinerlei Effekt zu beobachten, wenn das untersuchte Sputum von CF-Patienten stammte, die zum Zeitpunkt der Untersuchung an keinem pulmonalen Infekt litten.

Rubin et al. zeigten 1993, dass rekombinante humane DNase I *in vitro* die Viskoelastizität von CF-Sputum verringert und den mukoziliären Transport, gemessen als ziliäre Transportrate an einem Froschmodell, erleichtert [58, 59]. Diese Ergebnisse konnten von *Zahm et al.* [60] weitgehend bestätigt werden, mit der Einschränkung, dass eine Verbesserung des mukoziliären Transportes hier nur bei den Sputumproben zu beobachten war, die initial durch eine niedrige Transportrate charakterisiert waren. Verschiedene Arbeitsgruppen führten weitere Untersuchungen durch, die nachwiesen, dass DNase die rheologischen Eigenschaften von CF-Sputum verbessert [61, 62].

Die Eigenschaft des CF-Sputums (bzw. analog anderer Substanzen), unter elastischer Deformation lange Fäden zu bilden, wird als Spinnbarkeit bezeichnet. Nach Inkubation mit 5 µg DNase/g Sputum über 15 Minuten kommt es zu einer signifikanten Reduktion dieses Parameters, wie *Dasgupta et al.* 1995 zeigten [63]. *Shah et al.* wiesen 1996 nach, dass noch weitere Parameter, unter anderem die Hustenclearance, unter einer Inhalationstherapie mit DNase verbessert werden [64].

1.3.3 Wirksamkeitsnachweis für eine Inhalationstherapie mit rekombinanter humaner DNase I *in vivo*

In Europa liegt rekombinante humane DNase I unter dem Namen Pulmozyme® als Inhalationslösung vor. Verschiedene klinische Studien erbrachten eindeutige Wirksamkeitsnachweise für das Medikament. Dies soll im Folgenden näher erläutert werden.

Eine Studie von *Aitken et al.* untersuchte 1992 die Verträglichkeit einer inhalativen DNase-Therapie [21]. Dabei konnten keine ernstesten Nebenwirkungen des Medikamentes festgestellt werden. Ohne dass dies das eigentliche Ziel der Studie gewesen wäre, ergaben die Untersuchungen aber auch bereits Hinweise, dass es unter DNase-Therapie zu einer Verbesserung der Lungenfunktion, gemessen anhand der FVC und des FEV₁, kommen könnte: Beide Parameter stiegen zu Beginn einer DNase-Therapie, blieben dann unter Fortführung der Therapie praktisch unverändert, um nach Absetzen des Medikamentes schließlich wieder zum Ausgangswert zurückzukehren. Parallel dazu kam es gemäß der subjektiven Einschätzung durch die Patienten anhand eines Dyspnoe-Scores zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik, nach Absetzen des Medikamentes jedoch wieder zu einer Verschlechterung.

Untersuchungen von *Hubbard et al.* sowie *Shah et al.* [59, 65, 66] zeigten, dass der positive Effekt von DNase nach Absetzen des Medikamentes jedes Mal rasch wieder verschwand, so dass offensichtlich eine Dauertherapie anzustreben ist.

1993 wurden von *Ramsey et al.* [59, 67] und *Ranasinha et al.* [59, 68] jeweils doppelblinde plazebokontrollierte Phase 2-Studien durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei Mukoviszidosepatienten unter Dauertherapie mit inhalativer DNase eine Verbesserung von FVC und FEV₁ zu erreichen ist. Dabei ergaben *Ramseys* Untersuchungen eine statistisch signifikante Erhöhung sowohl der FVC als auch des FEV₁ im Vergleich zu Patienten mit Plazebo. Unterschiedliche DNase-Dosierungen (2 x 0,6 mg, 2 x 2,5 mg bzw. 2 x 10,0 mg) zeigten keine weitere signifikante Verbesserung. Auffällig war auch, dass die beobachteten Verbesserungen bei Pa-

tienten mit schwererer pulmonaler Beeinträchtigung zwei- bis dreimal größer waren als bei leichter Betroffenen. Subjektiv gaben die Patienten der Therapiegruppen an, dass es zu einer Verringerung der Dyspnoe und der Hustensymptomatik kam, dass das Sputum leichter abgehustet werden konnte und dass die körperliche Belastbarkeit sowie der Appetit zunahmen.

Ebenso zeigte *Ranasinha*, dass es unter DNase-Therapie mit 2 x 2,5 mg im Vergleich zur Placebogruppe zu einer signifikanten Verbesserung des FEV₁ kam. Tendenziell war auch hier ein positiver Effekt auf die FVC erkennbar, wobei deren Steigerung jedoch statistisch nicht signifikant war.

1994 folgte eine plazebokontrollierte Doppelblind-Phase 3-Studie von *Fuchs et al.* [51, 59, 69]. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Verbesserung der Lungenfunktion, gemessen anhand des FEV₁, kam. Außerdem traten unter einer Therapie mit 2 x 2,5 mg DNase (weniger ausgeprägt bei einer Dosis von 1 x 2,5 mg) signifikant weniger Exazerbationen pulmonaler Infekte auf. Entsprechende Ergebnisse lieferten eine ähnliche multizentrische Studie von *Harms et al.* [5] sowie eine Studie von *Shah et al.* [70], wobei allerdings bei der zuletzt genannten die Auswirkungen auf die Häufigkeit pulmonaler Infekte / Exazerbationen nicht mit untersucht wurden.

Die Verbesserung der Lungenfunktion unter DNase-Therapie führte wiederum zu einer Abnahme des Grundumsatzes, wie *Amin et al.* zeigten [19].

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration und Größe der extrazellulären DNA-Fragmente im Sputum von CF-Patienten unter DNase-Therapie auch *in vivo* reduziert werden [71].

2001 veröffentlichten *Shah et al.* eine Fallkontrollstudie, die Hinweise ergab, dass nach vierjähriger Inhalation von DNase I bei Mukoviszidosepatienten die Progression der Erkrankung aufgehalten werden kann [72].

1.3.4 Fragliche Erhöhung der Elastaseaktivität unter Inhalationstherapie mit DNase

In den Atemwegen werden Proteasen wie Cathepsin G und humane Leukozytenelastase (HLE, synonym: HNE für humane Neutrophilenelelastase) nicht nur durch die Antiproteasen Alpha₁-Antitrypsin (α_1 -AT) und Sekretorischen Leukoproteaseninhibitor (SLPI), sondern zum Teil auch durch Komplexbildung mit extrazellulärer DNA inaktiviert [73-75]. Wird Sputum *in vitro* mit DNase behandelt, so steigt die proteolytische Aktivität sowohl von Cathepsin

G als auch von HLE in der Probe signifikant an [76], vermutlich, weil die Proteasen aufgrund der DNA-Spaltung aus der beschriebenen Komplexbildung freigesetzt werden. *Rochat et al.* untersuchten diesen Zusammenhang *in vivo* und fanden unter DNase-Therapie einen Anstieg der Cathepsin G- und der HLE-Aktivität im Bronchialsekret von CF-Patienten, wobei jedoch nur die Cathepsin G-Erhöhung statistisch signifikant war [33]. Nach Beendigung der Therapie kehrten beide Parameter wieder zu ihren Ausgangswerten zurück.

Eine Studie von *Shah et al.* erbrachte dagegen ein anderes Ergebnis [77]. *In vitro* fiel zwar auch hier nach Inkubation mit DNase ein Anstieg der Elastaseaktivität im Sputum von Mukoviszidosepatienten auf. *In vivo* konnte jedoch für keinen der untersuchten Parameter, hier Leukozytenelastase und Interleukin-8, ein dauerhafter signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Vielmehr war bei längerer Therapie über 6 Monate jeweils eine Tendenz zu niedrigeren Werten festzustellen, die jedoch ebenfalls nicht signifikant war.

Costello et al. [78] ließen CF-Patienten über 52 Wochen mit DNase inhalieren und bestimmten verschiedene Entzündungsparameter vor Beginn der Therapie, nach 12 Wochen und nach 52 Wochen. Unter anderem wurden dabei die Werte für Elastaseaktivität im Sputum und für IL-8 im Sputum ermittelt. Auswirkungen auf die IL-8-Werte konnten dabei nicht festgestellt werden, aber die Elastaseaktivität im Sputum war nach 12 Wochen Therapie signifikant niedriger als vor Beginn der Therapie, eine Beobachtung, die auch nach 52 Wochen Therapie nachweisbar war.

Die genannten Studien liefern daher bezüglich der HLE insgesamt entgegengesetzte Ergebnisse. Da eine Erhöhung der proteolytischen Aktivität im Sputum infolge von DNase-Inhalationen problematisch, eventuell sogar gefährlich sein könnte, ist es wichtig herauszufinden, ob eine solche Nebenwirkung tatsächlich in klinisch relevanter Weise auftritt.

1.4 Rationale für eine Surfactanttherapie bzw. für eine Kombinationstherapie von DNase und Surfactant bei Mukoviszidose

Pumonaler Surfactant senkt die Oberflächenspannung in den distalen Atemwegen und Alveolen, wodurch wiederum der Öffnungsdruck derselben erniedrigt und ein Wiedereröffnen der distalen Atemwege erleichtert wird [79]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Surfactant sich positiv auf die mukoziliäre Clearance auswirkt [80-82], indem es zu einer Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz kommt [81].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die pulmonalen Abwehrreaktionen durch Surfactant beeinflusst werden [82-86]. So weiß man von den Surfactantproteinen A und D (SP-A bzw. SP-D), dass sie Opsoninfunktion ausüben [82-85], insbesondere auch bei der Abwehrreaktion gegen *Pseudomonas aeruginosa* [83, 84], und die Keimaggregation von Klebsiellen fördern [85]. Ob auch die Aggregation der für CF typischen Erreger (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus* und *Haem. influenzae*) beeinflusst wird, ist noch unklar.

Man weiß außerdem, dass bei CF-Patienten die Zusammensetzung des körpereigenen Surfactants alteriert ist [87-93], vermutlich jedoch nicht primär, sondern sekundär im Gefolge der chronischen Entzündungsreaktion [87].

Die angeführten Gründe sprechen dafür, dass CF-Patienten von einer Surfactanttherapie profitieren könnten. Eine weitere Überlegung spricht für den Einsatz dieses Medikamentes als Kombinationstherapie z.B. mit DNase und beruht zum einen auf den spreitenden Eigenschaften pulmonalen Surfactants. Demnach könnte Surfactant als Carrier für andere Medikamente dienen [94, 95]. Zum anderen könnten andere Medikamente auch aufgrund der Wiedereröffnung distaler Atemwege durch Surfactant besser an ihren Wirkort gelangen.

1.5 Ziele dieser Arbeit

- Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welcher Zusammenhang zwischen einer bakteriellen Besiedlung des Sputums durch verschiedene Erreger und DNA- beziehungsweise HNE-Konzentration im Sputum besteht. Zur Klärung der Frage, ob eine DNase-Therapie über eine eventuelle Erhöhung der Leukozyten-Elastase-Aktivität (HNE-Aktivität) gravierende negative Folgen haben könnte (vgl. Kap 1.3.4), wurden Messungen von DNA-Konzentration und HNE-Aktivität im Sputum von CF-Patienten unter bzw. ohne DNase-Therapie durchgeführt. Auf diese Weise sollte einerseits überprüft werden, ob es unter längerfristiger DNase-Therapie zu einer Erhöhung der Elastaseaktivität kommt, andererseits, ob ein Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und Elastaseaktivität besteht.
- Anhand der Quantifizierung der Leukozyten im Sputum von CF-Patienten sollte der Versuch unternommen werden, die Indikationsstellung für die Einleitung einer DNase-Therapie zu verbessern.

- Aus den oben angeführten Gründen (Kap. 1.4) erscheint eine Kombinationstherapie von DNase und Surfactant bei Mukoviszidose sinnvoll. Zuvor war zu klären, ob es zu einer Interaktion dieser Medikamente kommt. Zum einen sollte überprüft werden, ob die oberflächenaktive Wirkung von pulmonalem Surfactant bei Zugabe steigender DNase-Konzentrationen unverändert bestehen bleibt. Zum anderen sollte überprüft werden, ob die DNase-Aktivität in Anwesenheit steigender Surfactant-Konzentrationen inhibiert wird. Sollte es *nicht* zu einer Interaktion der Medikamente kommen, so wären durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die theoretischen Voraussetzungen gegeben, um im Rahmen weiterer Studien bedenkenlos eine Kombinationstherapie von DNase und Surfactant bei Mukoviszidosepatienten zu erproben.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte kamen zum Einsatz:

- Casy® 1, Cell Counter und Analyser System, Modell DT Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Pulsating Bubble Surfactometer Electronetics, New York, U.S.A.
- Trio-Thermoblock Biometra, Göttingen
- Elektrophorese-Apparatur
- UV-Kamera (Wellenlänge = 254 nm) Polaroid Corporation, Cambridge, U.S.A.
- Polaroid Gel Cam Film Typ 667 Polaroid Corporation, Cambridge, U.S.A.
- Mikroskop, Typ Dialux Leitz, Wetzlar

2.1.2 Verwendete Medikamente

Als Surfactant wurde Alveofact® (Firma Thomae, Biberach/Riß), ein Surfactantextrakt aus Kälberlunge, verwendet.

Als DNase stand Pulmozyme® (Firma Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen) zur Verfügung. Dabei handelt es sich um rekombinante humane DNase I.

2.1.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden eingesetzt:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| - Agarose | Amresco, Solon, Ohio, U.S.A. |
| - DNA molecular weight marker II | Boehringer Mannheim |
| - DNA molecular weight marker VI | Boehringer Mannheim |
| - Ethidiumbromid | Boehringer Ingelheim |
| - Kälberthymus-DNA (Natriumsalz) | Sigma biochemicals, St. Louis, U.S.A. |
| - Sputasol SR 089A | Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, U.K. |
| - Trypanblau (Lösung 0,4 %) | Sigma biochemicals, St. Louis, U.S.A. |
| - Percoll® | Pharmacia, Freiburg |
| - Methanol | Merck Diagnostika, Darmstadt |
| - Micro BCA Protein Assay Kit No. 23235 | Pierce, Rockford, U.S.A. |

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Bei Sputasol handelt es sich um eine gefriergetrocknete Chemikalienmischung, die sich zusammensetzt, wie in Tab. 2.1 beschrieben.

Tab. 2.1 *Zusammensetzung von Sputasol*

0,100 g Dithiothreitol
0,780 g Natriumchlorid
0,020 g Kaliumchlorid
0,112 g Dinatriumhydrogenphosphat
0,020 g Kaliumhydrogenphosphat

2.1.3.1 Zusammensetzung der DNA-Marker in Basenpaaren (bp)

Die verwendeten DNA-Marker geben jeweils die folgenden Basenpaarlängen an:

1. DNA molecular weight marker II

Bande 1	23 130 bp
Bande 2	9 416 bp
Bande 3	6 557 bp
Bande 4	4 361 bp
Bande 5	2 322 bp
Bande 6	2 027 bp
Bande 7	564 bp
Bande 8	125 bp

2. DNA molecular weight marker VI

Bande 1	2 176 bp
Bande 2	1 766 bp
Bande 3	1 230 bp
Bande 4	1 033 bp
Bande 5	653 bp
Bande 6	517 bp
Bande 7	453 bp
Bande 8	394 bp
Bande 9	298 bp
Bande 10	234 bp
Bande 11	220 bp
Bande 12	154 bp

2.2 Methoden

2.2.1 Überprüfung der DNase-Aktivität in Gegenwart von Surfactant

Zur Überprüfung der DNase-Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Surfactantkonzentrationen wurden 5 Agarose-Gel-Elektrophoresen und an 6 Sputumproben von CF-Patienten Kompressibilitätsmessungen durchgeführt.

2.2.1.1 Agarose-Gel-Elektrophoresen

Bei diesen Untersuchungen erfolgten sämtliche Pipettiervorgänge mit autoklavierten Pipettenspitzen, um Kontaminationen mit unerwünschten DNasen zu vermeiden.

2.2.1.1.1 Vorbereitung der Proben

Kälberthymus-DNA wurde in 10 mM TrisHCl pH 7,40 aufgelöst. DNase in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml und Surfactant in einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml wurden in 1M TrisHCl / 1 mM Ca⁺⁺ / 10 mM Mg⁺⁺ pH 7,40 vorverdünnt. Die Zugabe von Kalzium und Magnesium erfolgte dabei, weil die Aktivität der DNase von der Anwesenheit dieser beiden Ionen abhängig ist.

1 mg/ml DNA wurde mit 0,1 ; 0,5 ; 1 µg/ml DNase und 0 ; 10 ; 100 ; 1000 µg/ml Surfactant versetzt. Als Kontrollen dienten Proben von 1 mg/ml DNA ausschließlich (ohne DNase und ohne Surfactant) und von 1 mg/ml DNA plus 1000 µg/ml Surfactant (ohne DNase). Alle Proben wurden über 2 Stunden bei 37 °C in einem Thermoblock (Trio-Thermoblock, Firma Biometra) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 100 °C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren und somit die enzymatische Spaltung der DNA zu beenden.

Von den Proben wurden nun jeweils 20 µl-Aliquots entnommen. Diesen wurde jeweils 5µl Auftragspuffer (Zusammensetzung: siehe Tabelle 2.2) zugegeben.

Tab. 2.2: Zusammensetzung Auftragspuffer

Ansatz für 500 µl Auftragspuffer
100 µl Glycerin 50 %
100 µl Bromphenolblau 0,4 %
10 µl TAE 50fach konzentriert
290 µl Aqua dest.

Um zu überprüfen, ob Pulmozyme® bei dem beschriebenen Vorgehen tatsächlich vor dem Auftragen der Proben auf das Gel vollständig inaktiviert ist, wurde außerdem als Kontrolle Pulmozyme® unverdünnt *vor* Durchführen der Elektrophorese in der gleichen Weise inaktiviert, d. h. 15 Minuten bei 100°C inkubiert.

Anschließend wurden Gel-Elektrophoresen durchgeführt, bei denen 0,1µg/ml dieser vorbehandelten DNase im Vergleich zu nicht vorbehandelter DNase der gleichen Konzentration eingesetzt wurden.

2.2.1.1.2 Vorbereitung der Gelkammer und des Agarosegels

Um eine eventuelle Kontamination zu vermeiden, wurde die Gelkammer vor jeder Elektrophorese komplett mit 0,1 N NaOH gefüllt, in dieser Weise 30 min lang bei Raumtemperatur belassen und anschließend gründlich mit Aqua dest. gespült.

Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (Zusammensetzung: siehe Tabelle 2.3) aufgekocht. Dabei wurden auf 100 ml 1 x TAE je 2 g Agarose gegeben, d.h. es wurde ein 2 %iges Agarosegel vorbereitet.

Tab. 2.3: Zusammensetzung TAE-Puffer

Ansatz für 1000 ml 50 x TAE (= 50fach konzentriert)
242 g TrisHCl
57,1 ml Eisessig (= Essigsäure 99%)
100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA
Aqua dest. ad 1000 ml
davon 20 ml + Aqua dest. ad 1000ml für 1 x TAE

Die abgekühlte Agaroselösung wurde mit Ethidiumbromidlösung versetzt. Dabei wurden auf 100 ml Agaroselösung je 10 µl Ethidiumbromid 2mg/ml gegeben. Anschließend wurde die Lösung in den dafür vorgesehenen Teil der Gelkammer gefüllt. Ein Kamm wurde in das noch weiche Agarosegel eingesetzt. Dieser wurde nach Erhärten des Geles entfernt, so dass anstelle der Zinken „Taschen“ entstanden, die je nach Art des verwendeten Kammes ein Probenvolumen von ca. 10-15 µl fassten. Die Gelkammer wurde nun mit dem Laufpuffer in der Weise aufgefüllt, dass das Agarosegel komplett mit Pufferlösung bedeckt war. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1 x TAE.

2.2.1.1.3 Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese und Fotografieren des Geles

Aliquots der zu untersuchenden Proben wurden mit einer Eppendorfpipette in je eine Tasche des Agarosegels gegeben. Das Volumen der Aliquots betrug dabei je nach Größe der Taschen 5-10 µl. Die Gelkammer wurde daraufhin an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen und die Elektrophorese bei einer Spannung von $U = 90-100 \text{ V}$ durchgeführt. Aufgrund der Phosphatgruppen im Molekül ist DNA bei neutralem pH negativ geladen und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist die Länge der zurückgelegten Strecke umgekehrt proportional zum \log_{10} der Basenpaare der (hier verwendeten) Doppelstrang-DNA. Größere Moleküle, die entsprechend mehr Basenpaare enthalten, wandern folglich langsamer im elektrischen Feld. Daher kann eine Mischung aus verschiedenen DNA-Fragmenten mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese in ihre Bestandteile aufgetrennt werden. Die Fragmente bilden je nach zurückgelegter Wegstrecke unterschiedliche Banden im Gel. Um zu bestimmen, wie viel Basenpaare die einzelnen DNA-Fragmente ungefähr enthalten, verwendet man als Kontrolle Marker-DNA mit DNA-Fragmenten von bekannter Basenpaaranzahl. Wir benutzten zwei Marker: DNA molecular weight marker II (Boehringer Mannheim) und DNA molecular weight marker VI (Boehringer Mannheim).

Die Lauffront ist während der gesamten Elektrophorese durch das im Auftragspuffer enthaltene Bromphenolblau zu beobachten, so dass auf diese Weise kontrolliert werden kann, wann die Elektrophorese gestoppt werden muss. Je nach Gelgröße und angelegter Spannung ergaben sich bei uns Laufzeiten von 45 min bis 3 h.

Das zuvor dem Gel zugegebene Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff, färbt DNA an, indem es zwischen den Basenpaaren interkaliert. Unter UV-Licht kann die Anfärbung sichtbar gemacht und das Gel fotografiert werden. Wir fotografierten die Gele unter UV-Licht von 254

nm Wellenlänge bei einer Blende von 8-11 und einer Belichtungszeit von $t = \frac{1}{2}$ sec (vgl. Abb. 3.17).

2.2.1.2 Kompressibilität

Zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der Sputen von CF-Patienten in Gegenwart von Surfactant und DNase wurde ein Kompressibilitätsassay nach Mrsny [96] verwendet.

Sputen von CF-Patienten wurden gesammelt, innerhalb von einer Stunde eingefroren und bis zur Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Am Tag der Untersuchung wurde jedes Sputum in 4 Aliquots von jeweils 450-550 μl aufgeteilt und in Eppendorf-Röhrchen mit bekanntem Eigengewicht (Tara) gefüllt. Danach wurden die Probengefäße erneut gewogen, um das Sputumgewicht in mg zu ermitteln.

Es wurden vier Lösungen mit verschiedenen DNase- und Surfactant-Konzentrationen in NaCl 0,9% angesetzt. Die DNase- und Surfactant-Konzentrationen betragen dabei:

Lösung 1:	0 mg/ml Surfactant	0 $\mu\text{g/ml}$ DNase (Kontrolllösung),
Lösung 2:	0 mg/ml Surfactant	100 $\mu\text{g/ml}$ DNase,
Lösung 3:	10 mg/ml Surfactant	0 $\mu\text{g/ml}$ DNase,
Lösung 4:	10 mg/ml Surfactant	100 $\mu\text{g/ml}$ DNase.

Pro 1 mg Sputum wurde jeweils 1 μl Lösung zugegeben. Von jedem Patientensputum wurde je eine Portion mit Lösung 1 - 4 angesetzt. Darauf wurden alle Röhrchen erneut gewogen, um das Gewicht der zugegebenen Lösung zu bestimmen.

Anschließend wurden die Proben 60 Sekunden gevortext, 2 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert und darauf 15 Minuten bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit Insulinspritzen aspiriert und in vorgewogene Eppendorf-Röhrchen gefüllt. Diese wurden nun erneut gewogen, um das Gewicht des Überstandes zu erhalten. Von diesem wurde das Gewicht der jeweils zugegebenen Lösung 1 – 4 abgezogen, so dass man das Gewicht des

Flüssiganteils der Sputen erhielt. Es wurden nun die jeweiligen Quotienten Gewicht Flüssiganteil / Gewicht Gesamtsputum gebildet. Anhand dieses Quotienten wurde ermittelt, wie hoch der relative Flüssiganteil nach Inkubation mit DNase, Surfactant, DNase und Surfactant im Vergleich zu den Kontrollen mit NaCl 0,9% war.

2.2.2 Charakterisierung der Oberflächenaktivität

Zur Überprüfung, ob die oberflächenaktive Wirkung von Surfactant durch DNase beeinflusst wird, wurden Adsorptions- und dynamische Messungen der Surfactantaktivität in Anwesenheit unterschiedlicher DNase-Konzentrationen an einem Pulsating Bubble Surfactometer (PBS, Firma Electronetics, New York, USA) durchgeführt, wie sie *Enhoring* 1977 beschrieb [97]. Dabei wird in einer mit der jeweiligen Surfactantpräparation gefüllten Messkammer bei 37 °C eine Luftblase erzeugt. Das Volumen dieser Blase kann durch einen mit einem Elektromotor betriebenen Kolben zyklisch verändert werden (Pendelvolumen 0,43 µl). Die Registrierung der Druckveränderungen erfolgt über einen Druckaufnehmer. Bei Kenntnis des Blasenradius r und der Druckveränderung Δp kann die an der Grenze zwischen wässriger Lösung und Luftblase bestehende Oberflächenspannung γ nach dem Gesetz von Young/Laplace errechnet werden. Danach gilt:

$$\Delta p = 2 \gamma / r.$$

5 mg/ml Surfactant wurden mit verschiedenen Konzentrationen an DNase (0; 1; 2 und 5 mg/ml DNase) 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Pulmozyme® ist in einer Konzentration von 1 mg/ml erhältlich. Die erforderliche Konzentrierung der DNase führten dankenswerterweise Herr Prof. Dr. A. Günther und Mitarbeiter (Surfactantlabor der Klinik für Innere Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) durch. Dazu wurde Pulmozyme® zunächst gefriergetrocknet und anschließend eine Verdünnungsreihe mit NaCl 0,9% angelegt. Jeweils 50 µl der so erhaltenen Proben wurden mit 200 µl einer Reagenzmischung (Micro BCA Protein Assa Kit No. 23235, Firma Pierce, Rockford, U.S.A.) versetzt. Als Kontrolle diente Standardproteinlösung (50 µl Standard + 200 µl Reagenzmischung) mit bekannter Proteinkonzentration. Die Konzentration der DNase wurde daraufhin photometrisch bei 550 nm bestimmt. Anschließend wurde die DNase bis zur gewünschten Konzentration in NaCl 0,9% / 3mM Ca⁺⁺ verdünnt.

Unmittelbar vor jeder Messung im Pulsating Bubble Surfactometer wurde die entsprechende Probe 1 min gevortext. Danach wurde ein Aliquot in eine Probenkammer gefüllt.

Mit jeder Probe wurden zwei Arten von Messungen durchgeführt:

1. Adsorptionsmessung (Ermittlung von γ_{ads} in mN/m):

Durch die Kapillare der mit der Probe blasenfrei gefüllten Messkammer wird eine Luftblase in die Lösung gesaugt. Diese Blase wird manuell unter Kontrolle durch ein Okular auf einen minimalen Blasenradius von 0,4 mm eingestellt. Daraufhin wird die Blase automatisch mit hoher Geschwindigkeit in die Kapillare zurückgedrängt, sofort reaspiriert und verbleibt dann 10 Sekunden bei minimalem Blasenradius. Während dieser 10 Sekunden wurden kontinuierlich die Oberflächenspannungswerte registriert. Dabei kann bei oberflächenaktiven Lösungen ein zeitabhängiger Abfall der Oberflächenspannung als Folge der Adsorption der Moleküle an die Grenzfläche beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit sind die Werte der Adsorptionsoberflächenspannung nach 1, 2 und 10 sec gegeben.

1. Dynamische Messung (Ermittlung von γ_{min} und γ_{max} in mN/m):

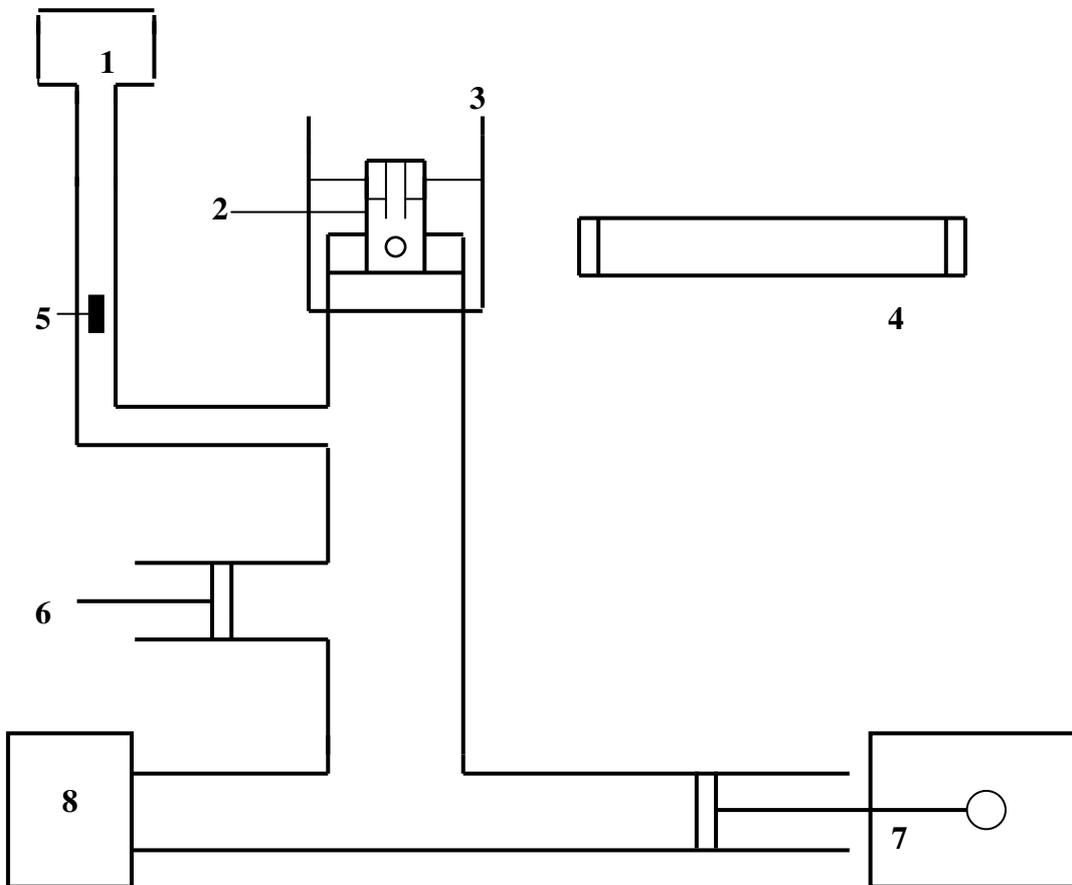
Diese Messung wurde jeweils direkt im Anschluss an die Adsorptionsmessung durchgeführt. Dazu wird die Luftblase über einen Zeitraum von 5 min zwischen einem Blasenradius von 0,4 und 0,55 mm oszilliert. Die Pulsationsfrequenz beträgt dabei 20/min .

Dynamische Messungen wurden über 5 min alle 60 sec durchgeführt, wobei in der vorliegenden Arbeit jeweils die Werte von γ_{min} und γ_{max} nach 5 min zugrunde liegen.

Bezüglich der Fallzahlen bei unterschiedlichen DNase-Konzentrationen verweisen wir hinsichtlich der Adsorptionsmessungen auf die Angaben in Kap. 3.5.1, hinsichtlich der dynamischen Messungen auf die Angaben in Kap 3.5.2.

Das Pulsating Bubble Surfactometer wurde regelmäßig mit Standardlösungen kalibriert. Nach jeder Messung erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser. Jeder Messung ging ein Druckausgleich an den Umgebungsdruck voraus. Die Probengefäße wurden nach jeder Verwendung 15 min im Ultraschallbad behandelt, mit 10 % Methanol und Aqua dest. gespült und anschließend im Luftstrom getrocknet.

Abb. 2.1 zeigt schematisch den Aufbau des PBS.



**1: Wasserreservoir; 2: Probengefäß; 3: Wasserbad; 4: Okular; 5: Spülventil;
6: Servo; 7: Elektromotor mit Getriebe; 8: Druckaufnehmer.**

Abb. 2.1: Aufbau des Pulsating Bubble Surfactometers

2.2.3 Semiquantitative Bestimmung der Leukozyten und Erreger im Sputum von CF-Patienten und Kulturen

Zur ersten Orientierung wurde eine *semiquantitative Bestimmung von Leukozyten* im Sputum vorgenommen. Sputumproben von 47 CF-Patienten wurden gesammelt, gegebenenfalls kurz bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Stunde dem Verarbeitungsprozess zugeführt.

Eine Sputasollösung wurde vorbereitet wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben. Die Sputumproben wurden 1:1 mit dieser Lösung verdünnt und geschüttelt, bis sie weitestgehend suspendiert waren. Eine vollständige Suspension war bei diesem Verfahren oftmals nicht zu erreichen.

Anschließend wurde das Material mit einer 10µl-Öse auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Der Ausstrich wurde daraufhin 10 min mit Methanol fixiert, mit Aqua dest. gespült und mit einer 1:4 mit Aqua dest. verdünnten Giemsalösung 10 min gefärbt.

Die Ausstriche wurden bei 400facher Vergrößerung mit Öl mikroskopiert. Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten, mononukleäre Zellen und Plattenepithelzellen wurden auf diese Weise semiquantitativ bestimmt. Dabei galt folgende Einteilung:

- 0 – 10 Zellen / Gesichtsfeld: Bezeichnung „vereinzelt“ bzw. „+“
- 10 – 20 Zellen / Gesichtsfeld: Bezeichnung „viel“ oder „vermehrt“ bzw. „++“
- 20 – 30 Zellen / Gesichtsfeld: Bezeichnung „massenhaft“ bzw. „+++“

Die *semiquantitative Bestimmung der Keime* erfolgte folgendermaßen:

Je 0,1 ml der in Sputasol gelösten Sputumproben wurden auf folgende feste Nährmedien ausgestrichen: Blut, Kochblut, Mac Conkey, Bromthymolblau-Laktose, Sandy-Agar sowie Sabouraud-Pilzagar (Firma Oxoid, Wesel, Firma Merck, Darmstadt). Anreicherungsmedium und Platten wurden für 48 h bei 37°C inkubiert.

Danach wurden erneut 0,1 ml der Anreicherungsbouillon auf den genannten festen Nährböden subkultiviert. Die Identifizierung der isolierten Erreger erfolgte nach Standardmethoden [98].

Quantifizierung der Erreger

- < 1.000 Keime/ml Sputum: Bezeichnung „vereinzelt“
- < 10.000 Keime/ml Sputum: Bezeichnung „viel“ oder „vermehrt“
- > 100.000 Keime/ml Sputum: Bezeichnung „massenhaft“

2.2.4 Quantitative Leukozytenbestimmung im Sputum von CF-Patienten

2.2.4.1 Suspendieren der Sputumproben

Sputen von 9 CF-Patienten wurden gesammelt, gegebenenfalls kurz bei 4 °C gelagert und innerhalb von einer Stunde dem Verarbeitungsprozess zugeführt. Dabei verwendeten wir eine Methode, wie sie zuvor von *Popov et al.* (99, 100) beschrieben wurde. Das Untersuchungsmaterial wurde in Probengefäße mit bekanntem Eigengewicht (Tara) gefüllt. Danach wurden die Probengefäße erneut gewogen, um das Sputumgewicht in mg zu ermitteln. 1 Röhrchen Sputasol wurde in 100 ml sterilem Aqua dest. aufgelöst, sofort verwendet oder maximal 48 Stunden bei 4 °C gelagert. Pro 1 mg Sputum wurden 1,5 µl Sputasol zugesetzt und die Proben anschließend durch wiederholtes Aspirieren mit einer Eppendorfpipette gründlich gemischt. Danach wurde die Suspension 1:1 mit PBS (phosphate buffered saline) verdünnt, erneut mit einer Pipette gemischt und darauf durch eine Mullkompressen filtriert. Das Volumen des Filtrates wurde bestimmt und anschließend bei 1500 Upm und Raumtemperatur 30 min lang zentrifugiert. Aufgrund der beschriebenen Aufarbeitung setzte sich das Filtratvolumen zu 50% aus dem zugegebenen PBS-Anteil und zu 50 % aus dem Volumen von Sputum plus Sputasol zusammen. Nach dem Filtrieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert. Beim Resuspendieren entsprach das verwendete Volumen PBS jeweils der Hälfte des Filtratvolumens und war somit gleich dem im Filtrat anteilig vorhandenen Volumen aus Sputum plus Sputasol.

Zum Teil ließen sich die Sputumproben nicht vollständig suspendieren. In diesen Fällen wurde die Verarbeitung vor dem Filtrieren abgebrochen, und das Material musste für diese Versuchsreihe verworfen werden. Alle erhobenen Daten beruhen daher auf Sputen, die sich problemlos suspendieren ließen (vgl. Abschnitt 3.4).

2.2.4.2 Prinzip der Isolierung von Zellen mittels eines Percoll®-Dichtegradienten

Percoll® besteht aus kolloidalen Silikatpartikeln mit einem Durchmesser von 15-30 nm, die mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) überzogen sind.

Wird eine Suspension von Partikeln zentrifugiert, so ist die Sedimentationsrate bei vorgegebener Zentrifugalkraft und Viskosität der Suspension proportional zur Größe der Partikel und zur Differenz aus der Dichte der Partikel und der Dichte der Suspension. Für sphärische Partikel gilt:

$$v = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_l)}{18\eta} \times g$$

mit v = Sedimentationsrate,

d = Partikeldurchmesser,

ρ_p = Partikeldichte,

ρ_l = Flüssigkeitsdichte,

η = Viskosität des Mediums,

g = Zentrifugalkraft.

Durch Zentrifugation bilden die Silikatpartikel der Percoll®-Lösung einen Dichtegradienten zwischen 1,0 und 1,3 g/ml entlang des Zentrifugenröhrchens. Wird vor Beginn der Zentrifugation das Medium mit einer Zellsuspension überschichtet, so sammeln sich die einzelnen Zelltypen in jeweils der Position, an der ihre Partikeldichte ρ_p und die Dichte des Gradienten ρ_l übereinstimmen. Auf diese Weise können unterschiedliche Zellen aufgrund ihrer Dichte voneinander getrennt werden, unabhängig von der Partikelgröße, da in der beschriebenen Position ja die Differenz $\rho_p - \rho_l$ gleich Null ist. Somit gilt dann auch für die Sedimentationsrate $v = 0$, wie aus der oben angeführten Gleichung ersichtlich ist.

Die Percoll®-Lösung ist nicht toxisch für Zellen und ermöglicht, diese lebend, morphologisch intakt und voll funktionsfähig zu gewinnen.

2.2.4.3 Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation

Für die Dichtegradientenzentrifugation verwendeten wir ein Medium, das sich zusammensetzte wie in Tab 2.4 beschrieben. Der pH-Wert des Mediums lag in dieser Zusammensetzung bei 7,4.

Tab. 2.4 Zusammensetzung des Mediums für die Dichtegradientenzentrifugation

Ansatz für 20 ml
0,75 ml 4 M NaCl
11,1 ml Percoll®
Aqua dest. ad 20 ml

4 ml dieses Percollansatzes wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde das Medium dann vorsichtig mit dem gesamten aufbereiteten Probenmaterial überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde bei Raumtemperatur mit 1500 Upm über 20 min durchgeführt. Der entstandene „Zellring“ wurde ebenfalls mittels einer Pasteurpipette abgeerntet, in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation mit 1350 Upm über 10 min). Nach dem 2. Waschvorgang wurde das Pellet in einem definierten Volumen PBS (je nach Bedarf zwischen 500 µl bis 5 ml) vollständig resuspendiert.

2.2.4.4 Vitalfärbung und Auszählung mittels Neubauer-Zählkammer

Trypanblaulösung 0,4% wurde 1:3 mit PBS verdünnt. Diese Lösung wurde 1:1 mit der aufbereiteten Sputumsuspension (vgl. Abschnitte 2.2.4.1 und 2.2.4.3) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Mit Hilfe einer Kapillare wurde eine Neubauer-Zählkammer mit der Suspension gefüllt. Die Leukozyten wurden unter dem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurde auch der prozentuale Anteil von gefärbten und ungefärbten Zellen bestimmt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsschritte konnte aus der ausgezählten Anzahl die Leukozytenanzahl pro ml Sputum errechnet werden.

Bei Trypanblau handelt es sich um einen Vitalfarbstoff, d.h. lebende Zellen mit intakter Zellmembran verhindern aktiv das Penetrieren der Substanz. Vitale Zellen werden daher *nicht* angefärbt, während die Zellmembran toter Zellen passiert werden kann, so dass diese blau gefärbt erscheinen.

2.2.4.5 Prinzip der Zellquantifizierung mit dem Cell Counter CASY®1 DT

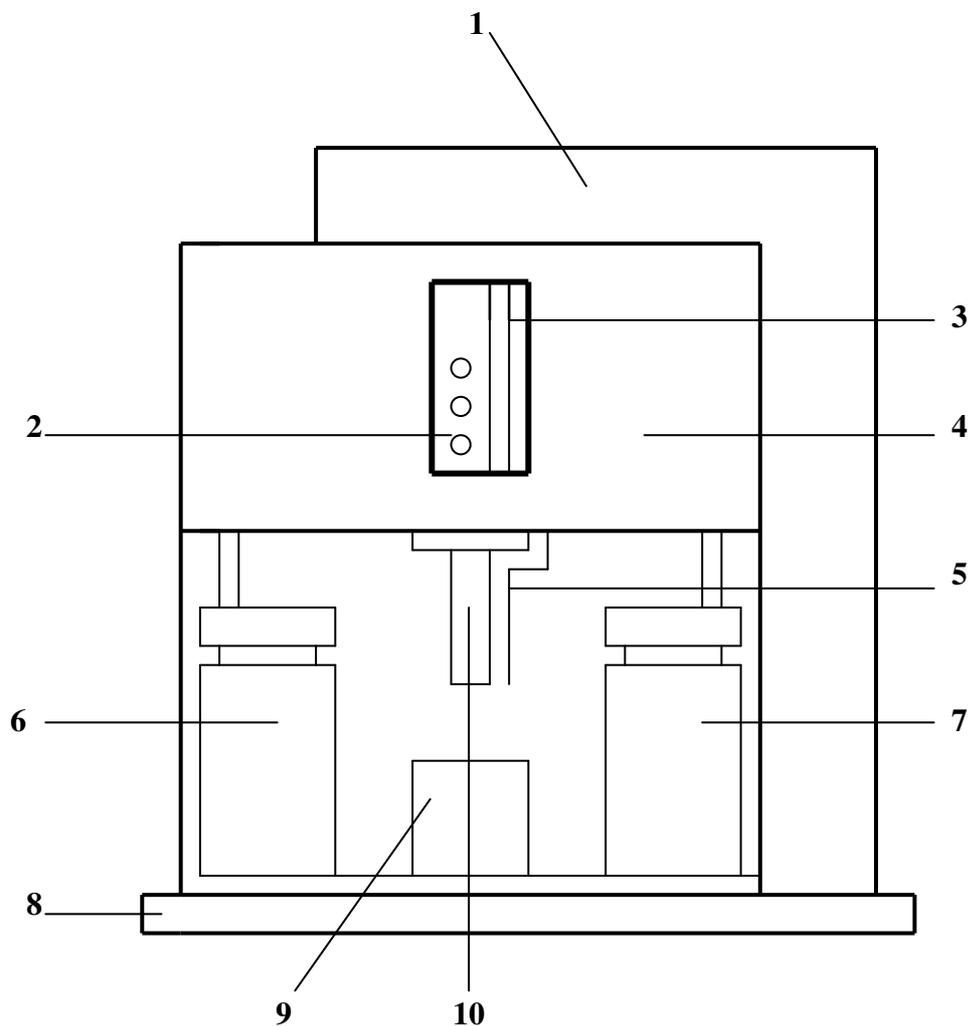
Zur maschinellen Quantifizierung der Leukozyten benutzen wir den Cell Counter CASY® 1 DT (Abb.2.2).

Als Messvolumen können bei diesem Gerät 200 oder 400 µl gewählt werden. Außerdem können Ober- und Untergrenze des Messbereiches als Zelldurchmesser in µm festgelegt werden. Das Gerät wird mit einer speziellen Lösung des Herstellers („CASYclean“) gereinigt und mit einer isotonen Standardelektrolytlösung („CASYton“) geeicht. Bei der Eichung soll der Background im gewählten Messbereich unter 100 Counts / ml liegen.

Zur Messung wird die Probe in einem schwachen Elektrolyten („CASYton“) suspendiert, in einen dafür vorgesehenen Behälter gegeben und auf dem Probensockel so plziert, dass die Messkapillare und eine Außenelektrode in die Zellsuspension eintauchen. Mittels einer Vakuumpumpe wird ein konstanter Unterdruck erzeugt und die zu untersuchende Probe so mit gleichbleibender Fließgeschwindigkeit in die Messkapillare gesaugt. Am Ende der Kapillare befindet sich eine Präzisionsmesspore.

Die Messkapillare ist vor der Messung mit der isotonen Elektrolytlösung „CASYton“ gefüllt. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt, wobei die elektrolytgefüllte Kapillare einen definierten Widerstand darstellt. Intakte Zellen sind näherungsweise als Isolatoren zu betrachten. Beim Ansaugen einer Zellsuspension in die Messkapillare kommt es daher zu einer Widerstandserhöhung, deren Betrag ein Maß für das Volumen der Zellen darstellt. Voraussetzung für dieses Messprinzip ist, dass die Zellen die Messpore einzeln passieren. Sicher erfasst werden außerdem nur intakte, vitale Zellen. Der gewünschte Messbereich kann in Form des Zelldurchmessers eingegeben werden.

Das Gerät tastet das Messsignal mit einer Frequenz von 1 MHz ab und berechnet aus den Einzelmessungen das Integral des Signals, ein Verfahren, das als Pulsflächenanalyse bezeichnet wird. Insgesamt beruht die Messung daher auf zwei miteinander kombinierten Prinzipien, nämlich auf dem Widerstandsmessprinzip und der erwähnten Pulsflächenanalyse.



1: Drucksystem und Netzspannungsversorgung; 2: LED-Leuchtkontrollen; 3: Steigrohr; 4: Messeinheit; 5: Außenelektrode; 6: Abfallflasche; 7: Vorratsflasche; 8: Grundplatte; 9: Probensockel; 10: Präzisionsmesskapillare.

Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Messstandes CASY® 1 DT

2.2.4.6 Auszählung mittels Cell Counter CASY® 1 DT

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Abschnitt 2.2.4.3.) gewonnene Zellsuspension wurde 1 : 100 mit CASYton verdünnt. Zum Teil war auch eine Verdünnung von 1 : 1000 erforderlich, da andernfalls die Zellzahl/ml so hoch war, dass das Gerät Störungen anzeigte.

Vor jeder Probenmessung wurde das System gründlich mindestens dreimal mit CASYton gespült und überprüft, dass der Background unter 100 Counts/ml lag.

Als Messbereich wurde ein Zelldurchmesser von 10 – 20 μm gewählt. Das Messvolumen betrug jeweils 400 μl . Es wurden von jeder Probe 10 Messungen durchgeführt und der Mittelwert errechnet.

2.2.5 Messung von DNA und HNE im Sputum

Die Messung der DNA-Konzentration und der HNE-Aktivität im Sputum von 51 Proben führten freundlicherweise Herr Prof. Dr. E. M. App und Mitarbeiter (GSF-Forschungsinstitut für Gesundheit, München) für uns durch.

Dabei wurde die DNA-Konzentration nach enzymatischer Spaltung mit RNase A photometrisch bei 260 nm ermittelt. Die Aktivität der Humanen Neutrophilenelelastase wurde unter Verwendung von Suc-L-alanyl-L-valyl-4nitroanilid als spezifischem chromogenen Substrat gemessen.

2.2.6 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm WinsStat 3.1. für Windows ausgeführt. Dabei erfolgten die erforderlichen Überprüfungen auf Normalverteilung anhand des Kolmogoroff-Smirnoff-Testes. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden Korrelationsanalysen nach Pearson oder Regressionsanalysen durchgeführt.

Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Stichproben erfolgten mit Hilfe des U-Testes nach Wilcoxon, Mann und Whitney. Bei mehr als zwei Stichproben wurde entsprechend der H-Test nach Kruskal und Wallis angewandt.

Als Signifikanzniveau wurde bei allen Testverfahren eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ festgelegt [101].

3. ERGEBNISSE

3.1 Beziehung zwischen DNA-Konzentration im Sputum und bakterieller Besiedlung

Bei 43 Patienten wurde der Zusammenhang zwischen Erregernachweis und DNA-Menge im Sputum untersucht.

Bei 4 Patienten konnte keine Kolonisation pathologischer Keime nachgewiesen werden, d.h. in der Sputumkultur konnten keine Bakterien oder lediglich Keime der physiologischen Mundflora angezüchtet werden. Der Median der DNA-Konzentration im Sputum betrug bei diesen Patienten 3,55 mg DNA / g Sputum mit einer Spannweite von 0,47 bis 10,50 mg DNA / g Sputum (vgl. Tab. 3.1).

Bei 39 Patienten fand sich ein positiver Erregernachweis. Bei diesen Patienten betrug der Median der DNA-Menge im Sputum 6,40 mg DNA / g Sputum mit einer Spannweite von 0,10 bis 42,50 mg DNA / g Sputum (vgl. Tab. 3.1, Abb. 3.1).

Tab. 3.1: DNA im Sputum bei negativer (Bakt. -) bzw. positiver (Bakt. +) bakterieller Sputumkultur.

	mg DNA / g Sputum	
	Bakt. -	Bakt. +
n	4	39
Median	3,55	6,4
Spannweite	0,47 - 10,50	0,10 - 42,50

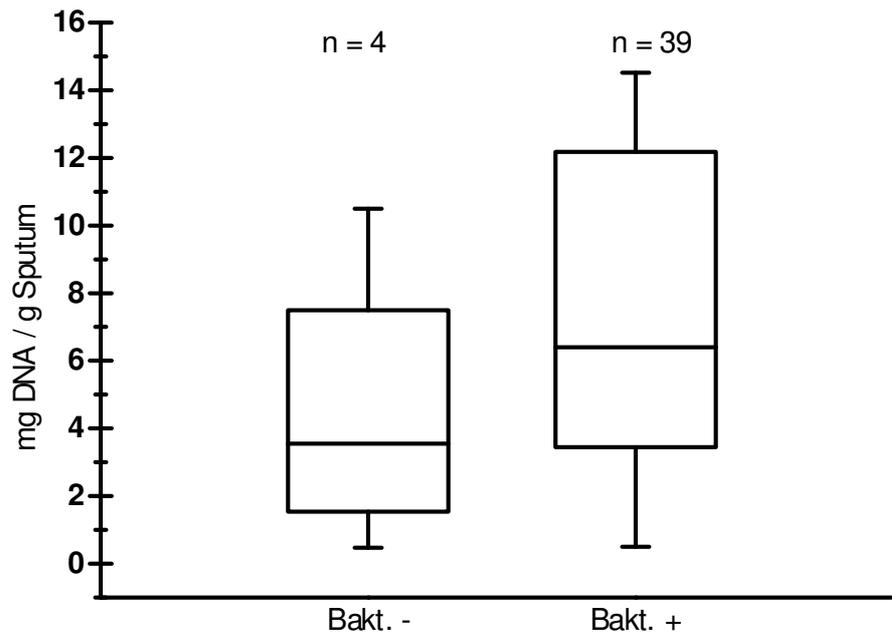


Abb. 3.1: Darstellung der DNA-Menge im Sputum von CF-Patienten bei negativer (Bakt. -) bzw. positiver (Bakt. +) bakterieller Sputumkultur.

Boxplot, jeweils Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile.

Die Ergebnisse legen nahe, dass trotz der Überlappung der DNA-Konzentrationen ein Zusammenhang besteht zwischen bakterieller Besiedlung und verstärkter DNA-Freisetzung. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der bakterienfreien Sputumproben ließ sich dies jedoch nicht statistisch absichern ($p = 0,10$).

In der Differenzierung wurden bei den erwähnten 39 Patienten mit pathologischer bakterieller Besiedlung in 27 Fällen ausschließlich *Pseudomonas aeruginosa* (PSA), in 6 Fällen ausschließlich *Staphylococcus aureus* (STA), in 5 Fällen gleichzeitig PSA und STA und in einem Fall gleichzeitig PSA und Koagulase-negative Staphylokokken (im Folgenden als „sonstige“ bezeichnet), nachgewiesen. Der jeweilige Median und die Spannweite für die gemessenen DNA-Konzentrationen sind in Tab. 3.2 aufgeführt. In Abb. 3.2 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt.

Tab. 3.2: DNA im Sputum bei positiver Sputumkultur (vgl. Tab 3.1 und Abb. 3.1: „Bakt +“) in Abhängigkeit von der Art der bakteriellen Besiedlung.

PSA: Pseudomonas aeruginosa; STA: Staphylococcus aureus.

	mg DNA / g Sputum			
	PSA	STA	PSA u. STA	PSA u. sonstige
n	27	6	5	1
Median	6,30	3,50	12,30	9,30
Spannweite	0,73 - 42,50	0,10 - 13,00	4,50 - 14,70	nicht durchführbar

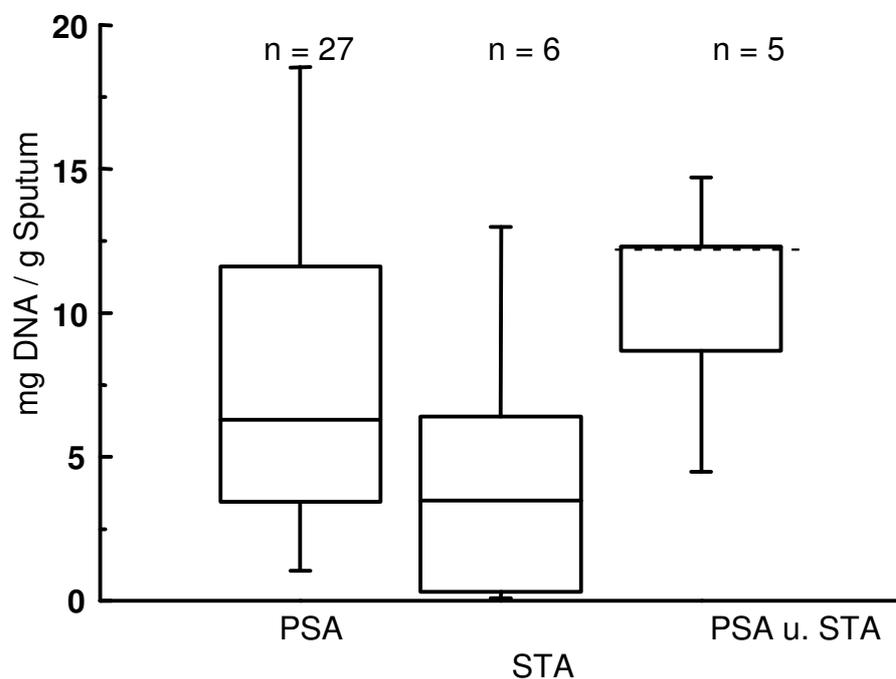


Abb. 3.2: Darstellung der DNA-Konzentration im Sputum von CF-Patienten in Abhängigkeit von der Art der bakteriellen Besiedlung. Abkürzungen: siehe Legende Tab. 3.2.

Boxplot, Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile (Boxplot zu PSA u. STA: hier liegen der Median mit 12,30 mg/g und die 75. Perzentile mit 13,50 mg/g sehr nah beieinander, so dass die Darstellung des Medians nur gestrichelt angedeutet ist und nicht maßstabsgerecht ist).

Auch hier ist aufgrund des geringen Stichprobenumfangs (mit Ausnahme der ausschließlich mit PSA besiedelten Sputumproben) die Interpretation der Ergebnisse schwierig. PSA scheint im Vergleich zu Staph. aureus eine stärkere Freisetzung von DNA zu bewirken. Eine statistisch signifikant erhöhte DNA-Freisetzung war jedoch bei allen Gruppen nicht nachweisbar (p jeweils > 0,1).

3.2 Abhängigkeit der Neutrophilen Elastase im Sputum von bakterieller Besiedlung

Bei allen unter 3.1 erwähnten 43 Sputumproben wurde zusätzlich die Aktivität der Humanen Neutrophilen Elastase (HNE) im Sputum bestimmt. Anhand dieser Daten wurde der Zusammenhang zwischen Erregernachweis und Elastaseaktivität untersucht.

Zunächst wurde wiederum die Gruppe der 4 Patienten ohne pathologische bakterielle Besiedlung mit der Gruppe der 39 Patienten mit pathologischem mikrobiologischen Sputumbefund verglichen. Dabei ergab sich für die Gruppe mit unauffälliger mikrobiologischer Sputumkultur ein Median der Elastaseaktivität von 844 Units / g Sputum. Bei den 39 Patienten mit pathologischer Sputumkultur betrug die mediane Elastaseaktivität 2197 Units / g Sputum (vgl. Tab. 3.3). Diese Zusammenhänge sind in Abb. 3.3 wiederum als Boxplot dargestellt.

Tab. 3.3: *HNE im Sputum bei negativer (Bakt. -) bzw. positiver (Bakt. +) bakterieller Sputumkultur.*

	Units HNE / g Sputum	
	Bakt. -	Bakt. +
n	4	39
Median	844	2197
Spannweite	0 - 5012	0 - 7817

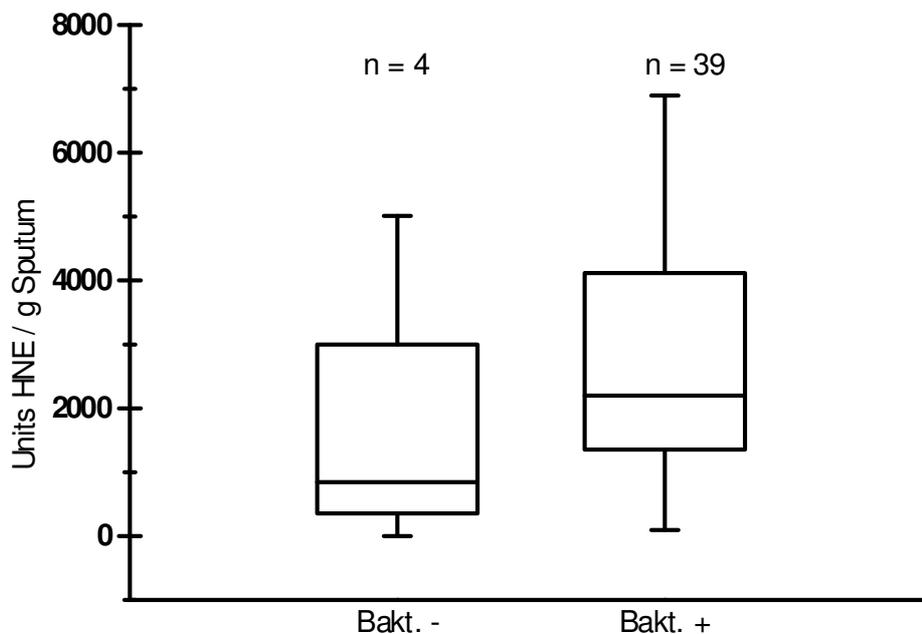


Abb. 3.3: *Darstellung der HNE-Aktivität im Sputum von CF-Patienten bei negativer (Bakt. -) bzw. positiver (Bakt. +) bakterieller Sputumkultur.*

Boxplot, jeweils Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile.

Demnach scheint eine bakterielle Besiedlung des Respirationstraktes zu höheren Konzentrationen von HNE im Sputum zu führen. Allerdings ist der beobachtete Zusammenhang aufgrund des geringen Stichprobenumfanges, insbesondere bei der Gruppe mit negativer Sputumkultur (n = 4), statistisch nicht signifikant (p = 0,09).

Je nach Art der nachgewiesenen bakteriellen Besiedlung ergaben sich die in Tab. 3.4 aufgeführten und in Abb. 3.4 graphisch dargestellten Werte für die Elastaseaktivität im Sputum.

Tab. 3.4: *HNE im Sputum bei positiver Sputumkultur (vgl. Tab. 3.3: „Bakt. +“) in Abhängigkeit von der Art der bakteriellen Besiedlung.*

Abkürzungen: siehe Legende Tab. 3.2.

	Units HNE / g Sputum			
	PSA	STA	PSA u. STA	PSA u. sonst.
n	27	6	5	1
Median	2696	1015	2197	1978
Spannweite	142 - 7817	0 - 4162	1528 - 3343	nicht durchführbar

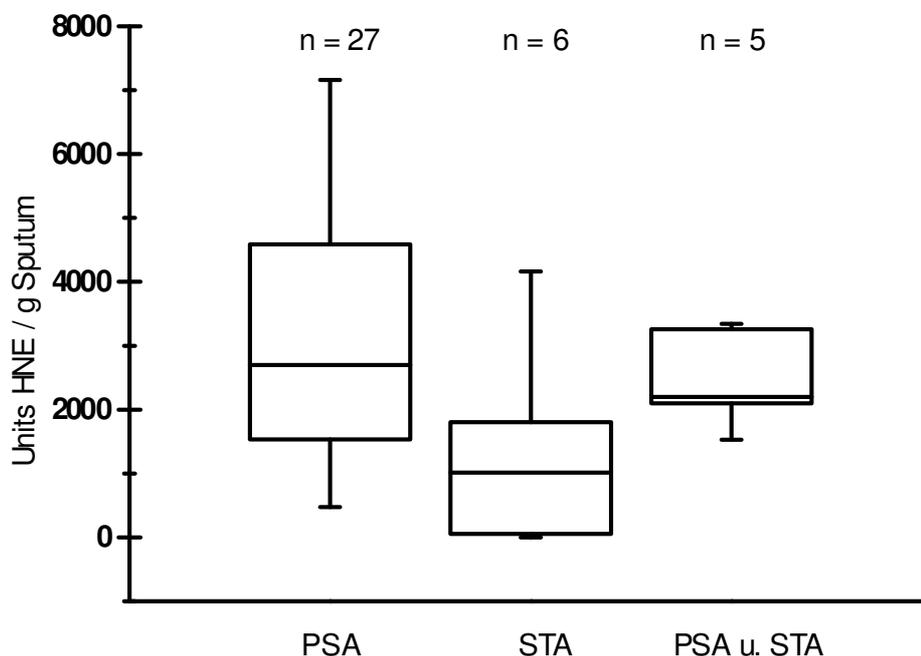


Abb. 3.4: *Darstellung der HNE-Aktivität im Sputum von CF-Patienten in Abhängigkeit von der Art der bakteriellen Besiedlung. Abkürzungen: siehe Legende Tab. 3.2.*

Boxplot, Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile.

Auch hier scheint eine Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* zu deutlich höheren Werten zu führen, ähnlich, wie dies schon bezüglich der DNA-Freisetzung beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 3.1, Tab. 3.2 und Abb. 3.2). Abermals gilt jedoch, dass dieser Zusammenhang bei allen Gruppen statistisch nicht signifikant ist (p jeweils $> 0,1$).

3.3 Zusammenhang zwischen DNA und Humaner Neutrophilenelastase (HNE) im Sputum von CF-Patienten

Bei 51 Mukoviszidosepatienten zwischen 7 und 35 Jahren wurden Sputumproben gesammelt und die DNA-Konzentration sowie HNE-Aktivität untersucht. Der Mittelwert der DNA-Konzentration betrug 7,58 mg/g Sputum (SEM = 0,94 mg/g). Bezüglich der Elastaseaktivität ergab sich ein Mittelwert von 2743 Units/g Sputum (SEM = 301 Units/g). Die Regressionsanalyse ergab eine statistisch signifikante Korrelation von DNA- und Elastasewerten mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,62$ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$ (vgl. Abb. 3.5).

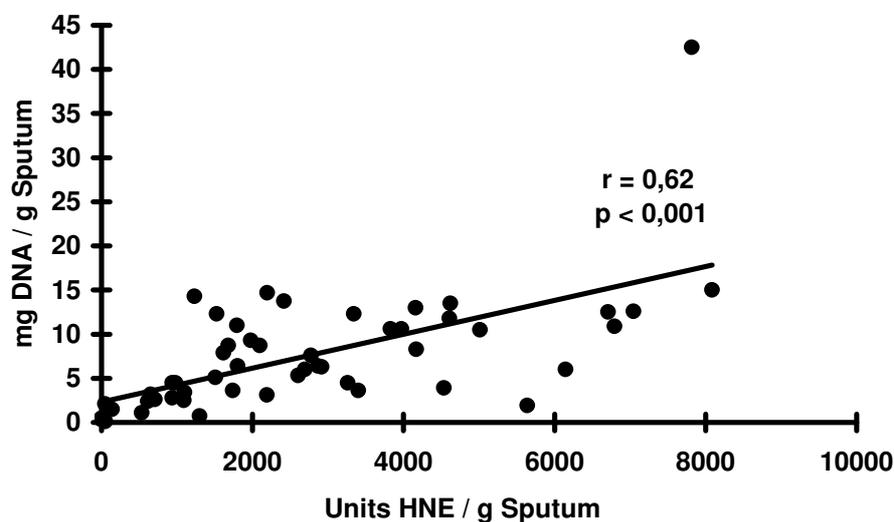


Abb. 3.5 Zusammenhang zwischen Humaner Neutrophilenelastase (HNE) und DNA im Sputum von 51 CF-Patienten (ohne und mit DNase-Therapie).

Von den untersuchten 51 Patienten inhalierten 15 jeweils einmal täglich mit 1 Ampulle Pulmozyme®, entsprechend 2,5 ml rekombinanter humaner DNase I (Konzentration 1 mg/ml, 1000 Units/ml).

Regelmäßige Inhalation von DNase in dieser Dosis kann möglicherweise zu einer Erhöhung der Aktivität der HNE im Sputum führen. Es wurde daher in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, ob bei den 15 Patienten unter DNase-Therapie die Elastaseaktivität im Sputum signifikant erhöht war.

Bei den 36 Patienten, die *nicht* mit DNase inhalierten, ergaben sich ein Median von 5,2 mg DNA / g Sputum und 1892 Units HNE / g Sputum. Die entsprechenden Werte lagen bei den 15 Patienten unter DNase-Therapie mit 11,0 mg DNA / g Sputum und 2197 Units HNE / g Sputum höher (vgl. Tab.3.5). Allerdings ist der beobachtete Unterschied nur bezüglich der DNA-Konzentration statistisch signifikant ($p < 0,02$), nicht jedoch hinsichtlich der HNE-Aktivität.

Tab. 3.5: *DNA und HNE im Sputum von CF-Patienten unter bzw. ohne DNase-Therapie.*

	Pat. ohne DNase	Pat. unter DNase
n	36	15
Alter (Spannweite)	7 - 35 J.	10 - 35 J.
DNA (Median)	5,2 mg/g	11,0 mg/g
DNA (Spannweite)	0,10 - 42,50 mg/g	0,73 - 15,00 mg/g
HNE (Median)	1892 U/g	2197 U/g
HNE (Spannweite)	0 - 7817 U/g	1230 - 8087 U/g

Die Regressionsanalyse ergab bei getrennter Berechnung für die 36 Patienten, die nicht mit DNase inhalierten, eine im Vergleich zu Abb. 3.5 etwas bessere statistisch signifikante Korrelation ($r = 0,67$) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$ (vgl. Abb. 3.6).

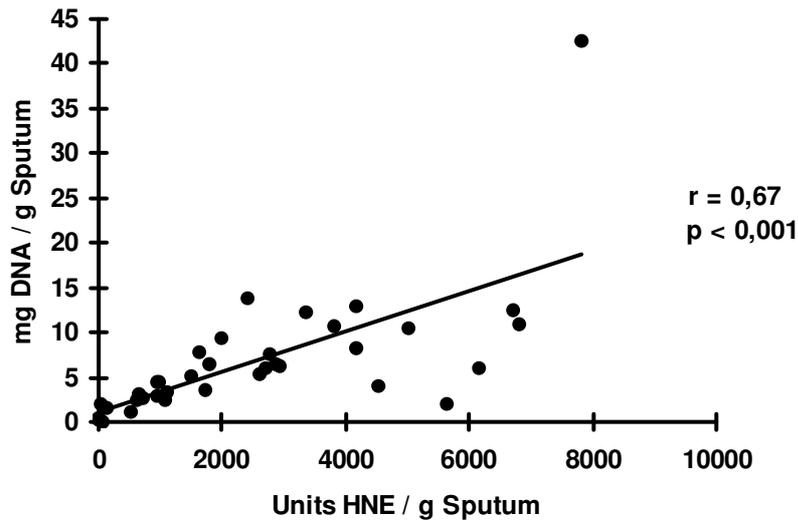


Abb. 3.6: *Zusammenhang zwischen Humaner Neutrophilenelastase (HNE) und DNA im Sputum von 36 CF-Patienten ohne DNase-Therapie.*

Bei der Gruppe der 15 Patienten unter DNase-Therapie ergab eine entsprechende Regressionsanalyse eine wesentlich schlechtere Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,37$ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0,1$ und war somit statistisch nicht signifikant.

Das Kollektiv aller 51 Patienten wurde außerdem entsprechend der nachgewiesenen DNA-Menge im Sputum in 3 Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1 mit < 5 mg DNA / g Sputum,
- Gruppe 2 mit 5-10 mg DNA / g Sputum,
- Gruppe 3 mit > 10 mg DNA / g Sputum.

Für diese Gruppen sind jeweils Median und Spannweite der HNE-Aktivität in Tabelle 3.6 aufgeführt. Abb 3.7 stellt die beschriebenen Zusammenhänge grafisch dar.

Tab. 3.6: HNE im Sputum von CF-Patienten bei unterschiedlicher DNA-Menge im Sputum.

	mg DNA / g Sputum		
	< 5	5 bis 10	>10
n	21	13	17
Units HNE / g Sputum (Median)	939	2605	4162
Units HNE / g Sputum (Spannweite)	0 - 5641	1508 - 6147	1230 - 8087

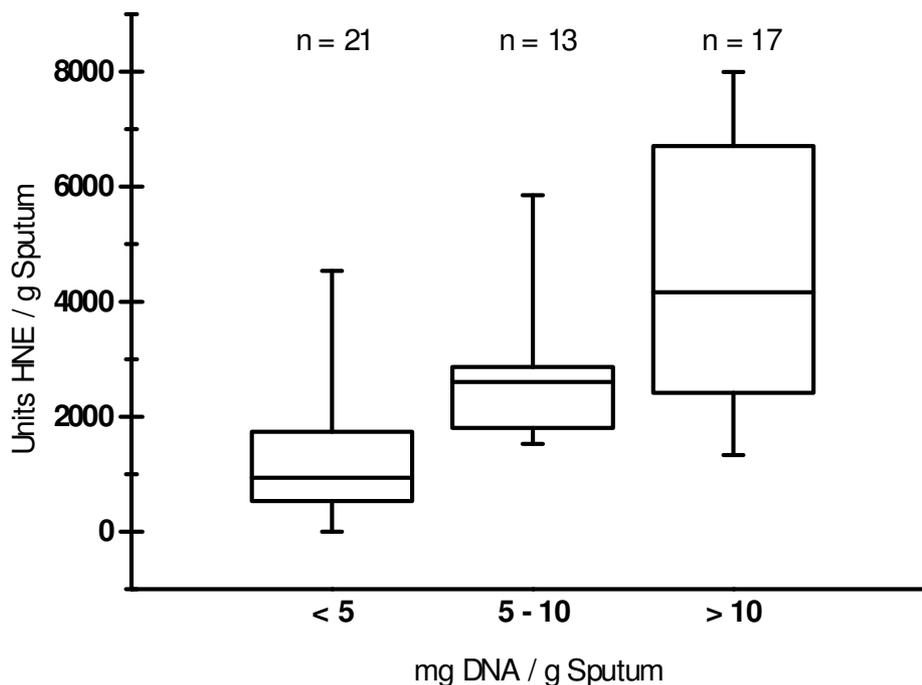


Abb. 3.7: HNE im Sputum von 51 CF-Patienten bei unterschiedlicher DNA-Menge im Sputum, Boxplot (jeweils Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile).

Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen sind dabei statistisch signifikant ($p < 0,05$), insofern dass sie nach dem Kruskal-Wallis-Test nicht der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Vergleicht man die einzelnen Gruppen untereinander anhand des Wilcoxon-Testes, so ergeben sich jedoch wiederum zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,1$).

Unterscheidet man innerhalb dieser drei Gruppen zusätzlich zwischen Patienten mit und ohne DNase-Therapie, so ergeben sich die in Tab.3.7 aufgeführten HNE-Werte.

Tab. 3.7: *HNE im Sputum von CF-Patienten bei unterschiedlicher DNA-Menge, Unterscheidung zwischen Patienten mit (n = 15) bzw. ohne (n = 36) inhalativer DNase-Therapie.*

	Patienten ohne DNase-Therapie mg DNA / g Sputum		
	< 5	5 bis 10	> 10
n	17	11	8
Units HNE / g Sputum (Median)	707	2696	4587
Units HNE / g Sputum (Spannweite)	0 - 5641	1508 - 6147	2417 - 7871

	Patienten unter DNase-Therapie mg DNA / g Sputum		
	< 5	5 bis 10	> 10
n	4	2	9
Units HNE / g Sputum (Median)	2725	1888	3973
Units HNE / g Sputum (Spannweite)	1301 - 3401	1678 - 2098	1230 - 8087

In Abb. 3.8 und 3.9 werden beide Zusammenhänge grafisch veranschaulicht.

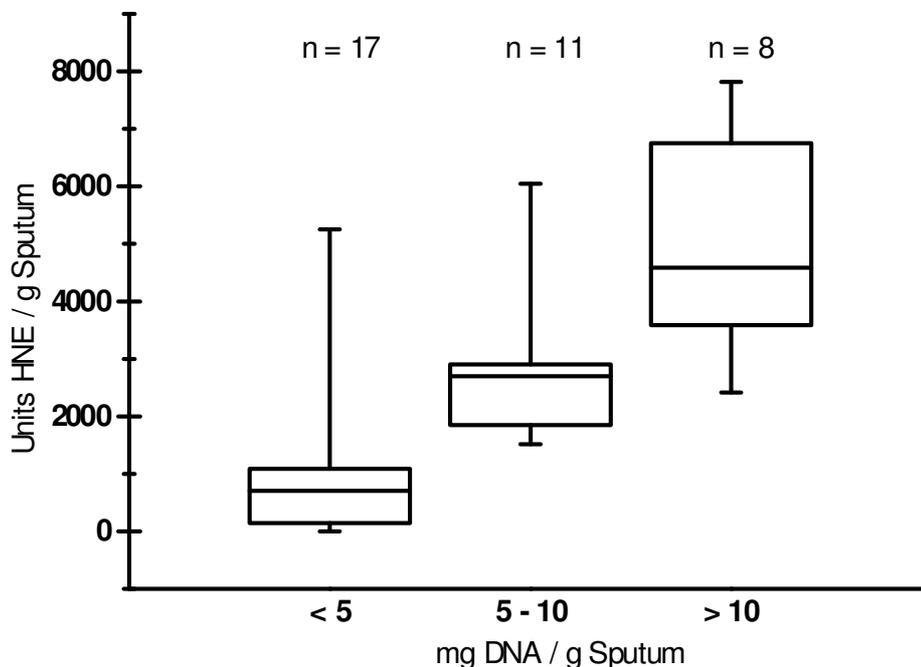


Abb. 3.8: *HNE im Sputum von CF-Patienten bei unterschiedlicher DNA-Menge im Sputum; Patienten ohne inhalative DNase-Therapie. Boxplot, jeweils Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile.*

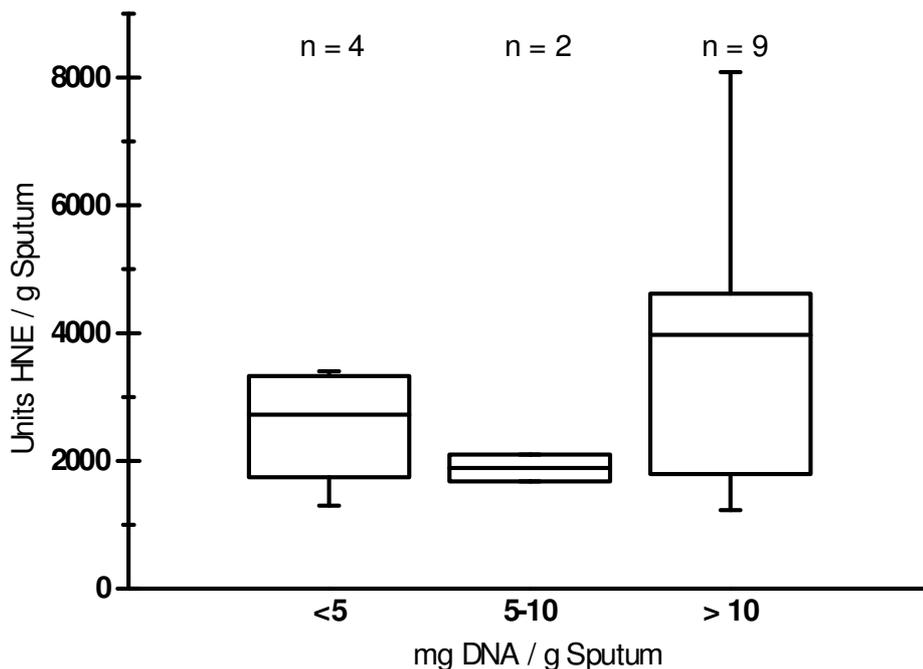


Abb. 3.9: *HNE im Sputum von CF-Patienten bei unterschiedlicher DNA-Menge im Sputum; Patienten unter inhalativer DNase-Therapie (n = 15). Boxplot, jeweils Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile.*

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass bei Patienten ohne DNase-Therapie eine relativ enge Beziehung zwischen DNA-Konzentration und HNE-Aktivität besteht. Diese wird durch die DNase-Therapie möglicherweise beeinträchtigt. Entsprechend ist der Unterschied zwischen den Gruppen bei den Patienten ohne DNase-Therapie abermals anhand des Kruskal-Wallis-Testes statistisch signifikant ($p < 0,05$, d.h. die Gruppen entstammen nicht der gleichen Grundgesamtheit), wobei wiederum der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander anhand des Wilcoxon-Testes keine signifikanten Unterschiede erbrachte ($p > 0,1$). Bei den Patienten unter DNase-Therapie ist von vornherein ein solcher Zusammenhang auch anhand des Kruskal-Wallis-Testes nicht zu beweisen ($p = 0,43$).

3.3.1 Verlauf von DNA und HNE im Sputum bei einzelnen CF-Patienten

Bei 7 Patienten wurden DNA und HNE im Sputum jeweils mehrfach bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8: DNA und HNE im Sputum von CF-Patienten, Mehrfachbestimmungen.
DNase + : Patient unter DNase-Therapie,
DNase - : Patient ohne DNase-Therapie
zum Zeitpunkt der Sputumgewinnung.

Name, Alter	DNase	mg DNA/g Sputum	Units HNE/g Sputum
M.G., 24 J.	-	4,50	980
M.G., 24 J.	-	1,50	428
M.G., 25 J.	+	8,70	2098
S.H., 19 J.	-	13,75	2417
S.H., 19 J.	-	8,10	2459
S.H., 19 J.	-	13,80	2009
S.H., 19 J.	-	12,00	1508
M.H., 25 J.	-	6,30	2918
M.H., 26 J.	+	14,30	1230
M.H., 26 J.	+	14,70	2197
M.H., 26 J.	+	12,30	1528
M.K., 10 J.	+	15,00	8087
M.K., 10 J.	-	10,60	3827
M.K., 10 J.	-	6,90	1865
M.K., 10 J.	-	9,00	4630
N.U., 15 J.	-	3,40	1100
N.U., 15 J.	-	4,00	1143
N.U., 15 J.	+	10,60	3973
N.U., 15 J.	-	9,40	1115
N.U., 15 J.	-	9,60	2386
N.U., 15 J.	-	6,40	1821
N.U., 15 J.	-	17,00	4540
B.W., 35 J.	+	4,5	3259
B.W., 35 J.	-	9,3	1978
B.W., 35 J.	-	16,5	421
B.W., 35 J.	-	17,8	100
S.Z., 25 J.	-	0,47	0
S.Z., 25 J.	-	8,8	4010
S.Z., 25 J.	-	11,8	2703

Bei den Mehrfachbestimmungen ergaben sich große individuelle Unterschiede bezüglich der Regressionsanalysen. Abb. 3.10 und 3.11 zeigen exemplarisch zwei gegensätzliche Regressionen. Den Regressionsanalysen liegen unabhängig von der medikamentösen Therapie lediglich diejenigen Messreihen zugrunde, die sich aus einer größeren Anzahl von Daten zusammensetzen. Im Falle der Patientinnen B.W. (Abb. 3.10) und N.U. (Abb. 3.11) sind dies jeweils die Messergebnisse, die gewonnen wurden, als die Patientinnen *nicht* mit DNase inhalierten.

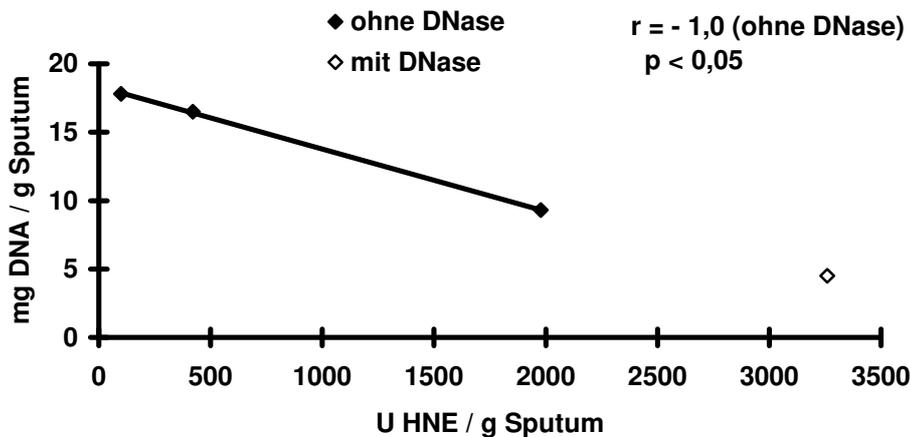


Abb. 3.10: Zusammenhang zwischen HNE und DNA im Sputum von Patientin B.W., 35 Jahre. Die Angaben von Regressionsgerade und Korrelationskoeffizientem beziehen sich lediglich auf Werte aus Sputen, die gewonnen wurden, als die Patientin nicht unter DNase-Therapie stand. Zusätzlich ist ein Wert der Patientin eingetragen, der unter DNase-Therapie erhoben wurde.

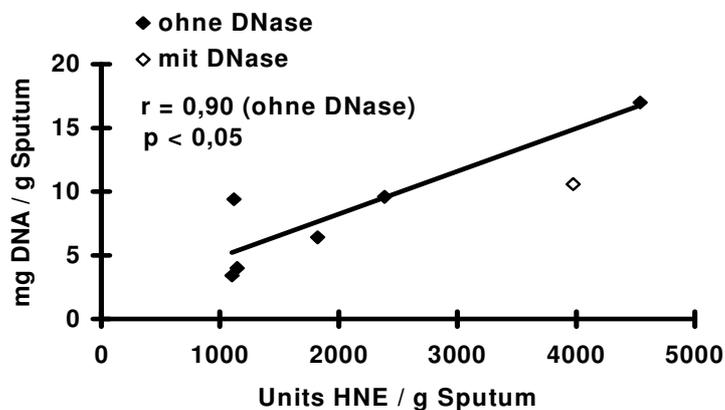


Abb. 3.11: Zusammenhang zwischen HNE und DNA im Sputum von Patientin N.U., 14 Jahre. Die Angaben von Regressionsgerade und Korrelationskoeffizientem beziehen sich lediglich auf Werte aus Sputen, die gewonnen wurden, als die Patientin nicht unter DNase-Therapie stand. Zusätzlich ist ein Wert der Patientin eingetragen, der unter DNase-Therapie erhoben wurde.

Bei der Patientin B.W. ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = -1,0$, wobei eine höhere HNE-Aktivität mit einer niedrigeren DNA-Konzentration einhergeht. Dagegen verhält sich

die Beziehung zwischen HNE und DNA bei der Patientin N.U. genau entgegengesetzt: Hier korrelieren höhere HNE-Werte mit einer höheren DNA-Konzentration ($r = 0,90$). In beiden Fällen ist der beobachtete Zusammenhang statistisch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von jeweils $p < 0,05$. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass beim einzelnen Patienten die Freisetzung von DNA und die Elastase-Produktion sehr unterschiedlich geregelt werden.

3.4 Leukozytenquantifizierung im Sputum von CF-Patienten und Vergleich der Leukozytenzahl mit DNA bzw. HNE

Bei der Aufbereitung des Sputums (vgl. Abschnitte 2.2.4.1 bis 2.2.4.3) ergab sich das Problem, dass manche Sputumproben sich nicht vollständig verflüssigen ließen, so dass das Verfahren nicht routinemäßig bei jeder Probe angewandt werden kann. Die folgenden Daten beruhen ausschließlich auf Messungen an vollständig verflüssigten Sputen.

Bei 9 aufbereiteten Sputumproben wurden die Leukozyten bei 40facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurde jeweils die Anzahl an Leukozyten / ml Sputum errechnet sowie der relative Anteil an vitalen Leukozyten bestimmt.

Zusätzlich zur lichtmikroskopischen Bestimmung der Leukozytenzahl wurde diese bei 4 Proben mit Hilfe des Cell Counters Casy® 1 DT (vgl. Abschnitt 2.2.4.5) ermittelt.

Tab. 3.9 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen.

Tab. 3.9: *Leukozytenzahl im Sputum von CF-Patienten.*

Name, Alter	Datum	Zellzahl / ml	
		Zählkammer	Casy 1 DT
N.K., 18 J.	24.07.95	$8,33 \times 10^8$	$4,89 \times 10^8$
A.K., 16 J.	25.07.95	$2,26 \times 10^8$	nicht durchgeführt
N.U., 15 J.	03.08.95	$1,15 \times 10^7$	nicht durchgeführt
M.K., 10 J.	23.08.95	$2,25 \times 10^7$	nicht durchgeführt
M.K., 10 J.	28.08.95	$5,63 \times 10^6$	nicht durchgeführt
M.S., 16 J.	30.08.95	$1,38 \times 10^7$	nicht durchgeführt
S.H., 19 J.	12.09.95	$8,14 \times 10^7$	$2,97 \times 10^7$
M.B., 24 J.	19.09.95	$1,92 \times 10^6$	$2,07 \times 10^6$
M.K., 10 J.	19.09.95	$7,62 \times 10^6$	$3,98 \times 10^6$

Für die 9 Sputen, die unter der Zählkammer ausgewertet wurden, ergab sich ein Median von $1,38 \times 10^7$ Leukozyten / ml Sputum bei einer Spannweite von $1,92 \times 10^6 - 8,33 \times 10^8$ Leukozyten / ml Sputum. Bei den 4 Proben, die außerdem mittels des Cell Counters ausgezählt wurden, betrug der Median für diese Messungen $1,68 \times 10^7$ Leukozyten / ml bei einer Spannweite von $2,07 \times 10^6 - 4,89 \times 10^8$ Leukozyten / ml.

Vergleicht man die absoluten Zahlen der beiden Auszählungsmethoden, so divergieren diese allerdings für jeweils dieselbe Sputumprobe erheblich, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass der Cell Counter nur vitale Zellen erfasst.

Bei den Doppelbestimmungen (Auszählung unter dem Lichtmikroskop *und* mittels Cell Counter) korrelierten die jeweiligen Ergebnisse sehr gut miteinander ($r = 0,99$). Trotz der niedrigen Fallzahl ist diese Korrelation statistisch signifikant ($p < 0,001$, vgl. Abb. 3.12).

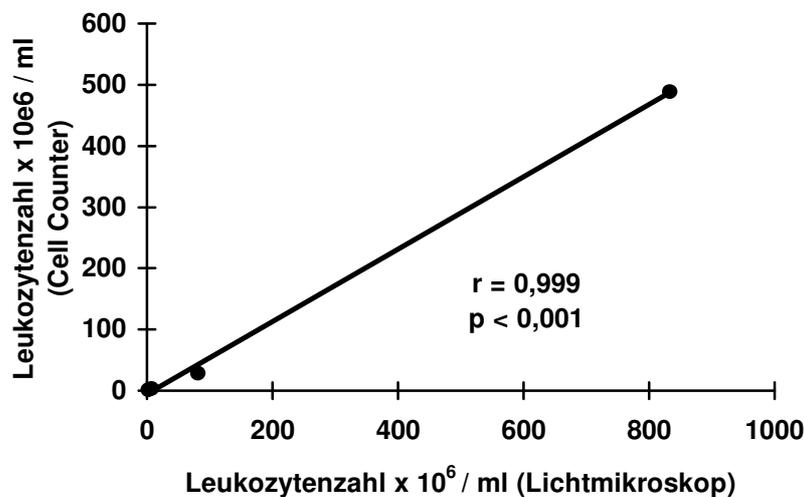


Abb. 3.12: Vergleich der Leukozytenauszählung im Sputum von 4 CF-Patienten mittels Lichtmikroskop und mittels Cell Counter.
r: Korrelationskoeffizient; *p*: Irrtumswahrscheinlichkeit

Bei vier Proben wurden die mittels Zählkammer erhobene Zellzahl mit der Menge an DNA bzw. HNE im Sputum verglichen. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 3.10 aufgeführt.

Tab. 3.10: Leukozytenzahl, DNA und HNE im Sputum von vier CF-Patienten.

Name, Alter	Datum	Zellzahl / ml (Zählkammer)	mg DNA / g Sputum	Units HNE / g Sputum
N.U., 15 J.	03.08.95	$1,15 \times 10^7$	6,40	1821
M.K., 10 J.	23.08.95	$2,25 \times 10^7$	6,90	1865
S.H., 19 J.	12.09.95	$8,14 \times 10^7$	13,80	2009
M.K., 10 J.	19.09.95	$7,62 \times 10^6$	9,00	4630

Die Regressionsanalyse von Zellzahl und DNA im Sputum ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,89 (vgl. Abb. 3.13). Dieser Zusammenhang ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,1$).

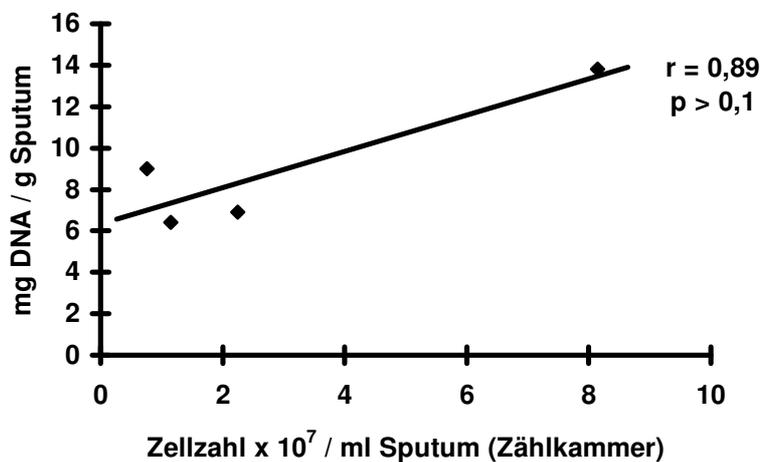


Abb. 3.13: Vergleich der Leukozytenzahl und der DNA-Konzentration im Sputum von 4 CF-Patienten ;
r: Korrelationskoeffizient; *p*: Irrtumswahrscheinlichkeit.

Ein entsprechender Vergleich der Leukozytenzahl mit der HNE-Aktivität ergab ebenfalls keinen statistischen Zusammenhang ($r = - 0,40$; $p > 0,1$).

3.4.1 Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen und Vergleich mit DNA-Konzentration bzw. HNE-Aktivität im Sputum

Die wie in Abschnitt 2.2.4.4 mit Trypanblau inkubierten Leukozyten wurden außerdem differenziert in vitale (d.h. nicht angefärbte) und avitale (d.h. angefärbte) Zellen. Der relative Anteil vitaler bzw. avitaler Leukozyten ist in Tab. 3.11 dargestellt.

Der Median lag bei diesen Untersuchungen bei 77,17 % für den Anteil vitaler Zellen, bzw. bei 22,83 % für den Anteil avitaler Zellen. Die Spannweiten betragen 54,24 % - 88,65 % für den Anteil vitaler Leukozyten und 11,4 % - 45,8 % für den Anteil avitaler Leukozyten.

Tab. 3.11: Relativer Anteil vitaler und avitaler Leukozyten im Sputum von 9 CF-Patienten

Nr.	Name, Alter	Anteil vitaler Leukozyten	Anteil avitaler Leukozyten
1	N.K., 18 J.	88,7%	11,4%
2	A.K., 16 J.	77,1%	22,9%
3	N.U., 15 J.	80,9%	19,1%
4	M.K., 10 J.	88,3%	11,7%
5	M.K., 10 J.	58,9%	41,2%
6	M.S., 16 J.	54,2%	45,8%
7	S.H., 19 J.	68,7%	31,3%
8	M.B., 24 J.	77,2%	22,8%
9	M.K., 10 J.	80,9%	19,2%

Bei den Messungen Nr. 4 und 5 handelt es sich um denselben Patienten, wobei das Sputum für Messung Nr. 5 fünf Tage nach dem für Nr. 4 gewonnen wurde. Der Patient stand zu diesem Zeitpunkt unter intravenöser Antibiose. Der deutlich geringere Anteil an vitalen Leukozyten bei Messung Nr. 5 erklärt sich möglicherweise durch die infolge der Antibiose allmählich abklingende Entzündungsreaktion.

Bei denselben vier Proben wie in Tab. 3.10 und Abb. 3.13 wurde der jeweilige Anteil an avitalen Leukozyten mit der Menge an DNA bzw. HNE im Sputum verglichen. Die entsprechenden Werte sind in Tab. 3.12 aufgeführt.

Tab. 3.12: Anteil avitaler Leukozyten, DNA und HNE im Sputum von vier CF-Patienten.

Name, Alter	Datum	avitale Leukozyten (%)	mg DNA / g Sputum	Units HNE / g Sputum
N.U., 15 J.	03.08.95	19,1	6,40	1821
M.K., 10 J.	23.08.95	11,7	6,9	1865
S.H., 19 J.	12.09.95	31,3	13,8	2009
M.K., 10 J.	19.09.95	19,3	9,0	4630

Ein höherer prozentualer Anteil an abgestorbenen Leukozyten im Sputum scheint demnach mit einer höheren Konzentration von DNA im Sputum einherzugehen. Eine entsprechende

Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,90 (vgl. Abb. 3.14). Dieser Zusammenhang ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,1$).

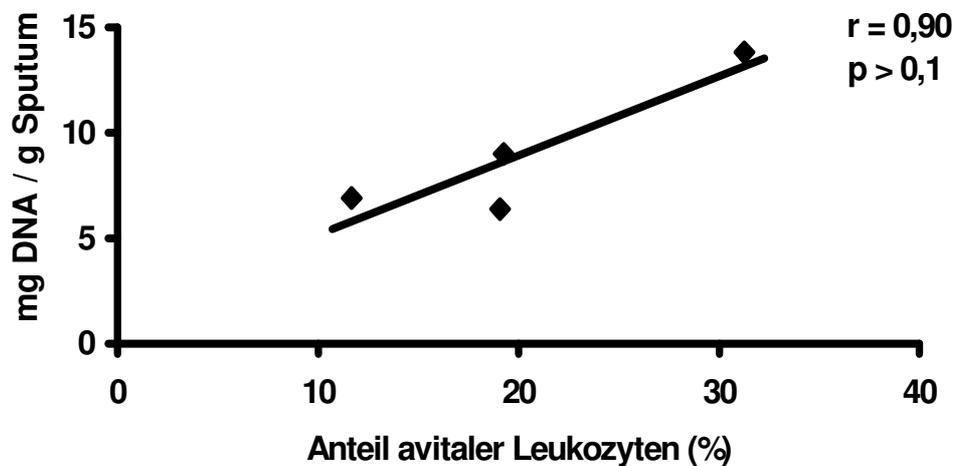


Abb. 3.14: Vergleich des relativen Anteils avitaler Leukozyten und der DNA-Konzentration im Sputum von 4 CF-Patienten ;

r: Korrelationskoeffizient; *p*: Irrtumswahrscheinlichkeit.

Ein entsprechender Vergleich des relativen Anteils avitaler Leukozyten mit der HNE-Aktivität ergab keinen statistischen Zusammenhang ($r = - 0,47$; $p > 0,1$).

3.5 Untersuchungen zum Einfluss von Pulmozyme® auf die oberflächenaktiven Eigenschaften von Alveofact®

Um zu überprüfen, ob die oberflächenaktiven Eigenschaften von pulmonalem Surfactant durch DNase beeinträchtigt werden, wurden Adsorptions- und dynamische Messungen an einer im Pulsating Bubble Surfactometer erzeugten Luftblase durchgeführt.

3.5.1 Ergebnis der Adsorptionsmessungen

Bei allen DNase-Konzentrationen kam es innerhalb von 10 Sekunden zu einer Adsorption von Alveofact® an der Oberfläche der im PBS erzeugten Blase, wobei die Oberflächenspannung im Mittel auf 22,29 bis 23,10 mN/m herabgesetzt wurde (vgl. Abb. 3.15 und Tab. 3.13). Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,82$) gegenüber den Kontrollproben ohne Pulmo-

zyme® bestand nicht, so dass man davon ausgehen kann, dass die Adsorption von Alveofact® an Oberflächen durch Pulmozyme® nicht beeinflusst, bzw. nicht beeinträchtigt wird.

Tab 3.13: Oberflächenspannung bei Zugabe von 5 mg Surfactant / ml und unterschiedlichen DNase-Konzentrationen.

Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung (SD) nach 10 sec Filmadsorption.

DNase-Konzentration (mg/ml)	Oberflächenspannung Mean + SD (mN/m)	n
0	22,78 ± 0,95	13
1	22,29 ± 0,75	7
2	22,55 ± 0,98	8
5	23,10 ± 1,05	5

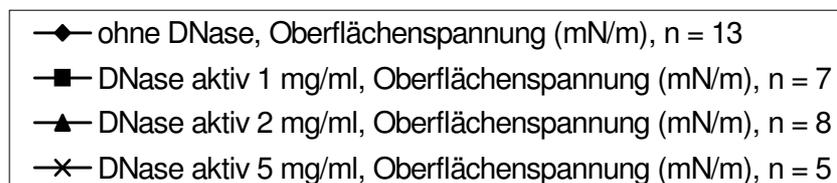
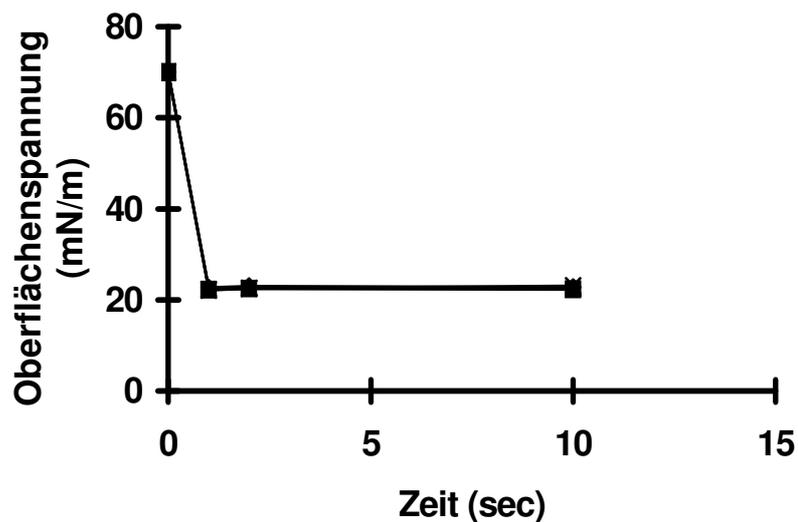


Abb. 3.15: Zeitlicher Verlauf der Reduktion der Oberflächenspannung durch Alveofact® (Konzentration 5 mg/ml) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Pulmozyme®; Messung unter statischen Bedingungen.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen (vgl. Legende).

3.5.2 Ergebnis der dynamischen Messungen

Bei allen DNase-Konzentrationen kam es bei Oszillation innerhalb von 5 Minuten zu einer Reduktion der Oberflächenspannung, wobei die minimalen Werte (γ_{\min}) im Mittel 0,59 bis 5,28 mN/m betragen (Tab. 3.14 und Abb. 3.16). Trotz der relativ großen Spannweite ist dieser Unterschied der Proben untereinander, insbesondere auch im Vergleich zu den Kontrollproben *ohne* Pulmozyme®, *nicht* signifikant ($p > 0,1$). Die Ergebnisse zeigen daher, dass die oberflächenaktiven Eigenschaften des pulmonalen Surfactant nicht durch DNase inhibiert werden.

Tab 3.14: Oberflächenspannung bei Zugabe von 5 mg Surfactant/ml und unterschiedlichen DNase-Konzentrationen.

Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung (SD) der minimalen Oberflächenspannungen nach 5 min Oszillation.

DNase-Konzentration (mg/ml)	Oberflächenspannung, Mean \pm SD (mN/m)	n
0	2,03 \pm 1,28	13
1	0,59 \pm 0,47	7
2	1,91 \pm 1,74	8
5	5,28 \pm 8,12	5

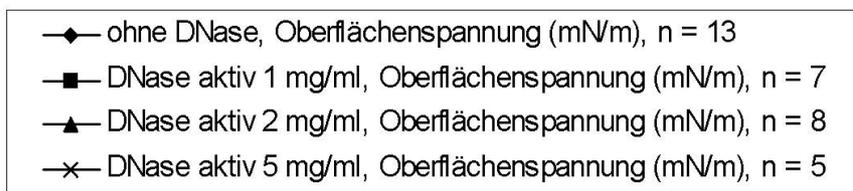
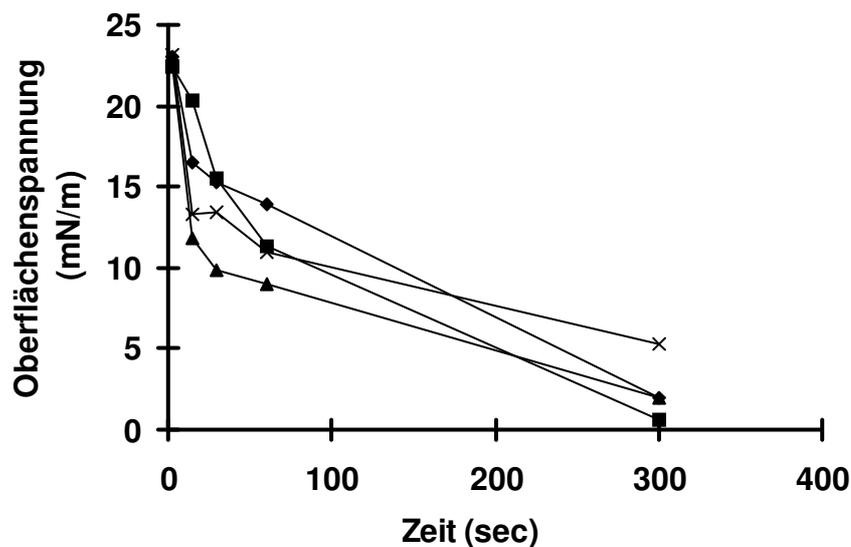


Abb. 3.16: Zeitlicher Verlauf der Reduktion der Oberflächenspannung durch Alveofact® (Konzentration 5 mg/ml) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Pulmozyme®; Messung unter dynamischen Bedingungen.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus mehreren Messungen (vgl. Legende).

3.6 Ergebnisse der Kompressibilitätsversuche

Bei diesen Messungen diente der relative Flüssiganteil der Sputen in g (bezogen auf das Gesamtgewicht des jeweiligen Sputumaliquots in g) als Maß für die Kompressibilität. Als Kontrolle dienten Aliquots von Sputum, die mit NaCl 0,9% behandelt worden waren. Verglichen wurden diese jeweils mit Aliquots derselben Sputen, die zuvor entweder mit Pulmozyme® oder mit Alveofact® oder mit Pulmozyme® und Alveofact® behandelt worden waren (vgl. Abschnitt 2.2.1.2).

Es wurden 7 Sputen untersucht, wobei bei einer Probe die Gesamtmenge zu gering war, um auch ein Aliquot mit Surfactant zu behandeln. Von dieser Messreihe liegen daher nur 6 Werte vor.

Tab. 3.15 *Kompressibilität von CF-Sputen nach Inkubation mit verschiedenen Lösungen. Angegeben ist jeweils der relative Flüssiganteil am Gesamtgewicht des jeweiligen Sputumaliquots.
n = 7; bzw. n = 6 für Messreihe mit Surfactanzusatz.
M: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardabweichung des Mittelwertes.*

	Relativer Flüssiganteil nach Inkubation mit:			
	Kontrolle (NaCl 0,9%)	DNase	Surfactant	DNase + Surfactant
M	0,401	0,664	0,316	0,548
SD	0,119	0,074	0,109	0,192
SEM	0,045	0,028	0,047	0,073

Bei Inkubation mit DNase ist der Flüssiganteil signifikant höher ($p < 0,05$) und liegt im Mittel bei 66,4 %, bei der Kontrolle mit NaCl 0,9% beträgt er im Mittel nur 40,1%.

Unter Zugabe von Surfactant ergibt sich keine bessere Verflüssigung. Vielmehr liegt der relative Flüssiganteil mit im Mittel 31,6 % sogar deutlich unter dem entsprechenden Kontrollwert, d.h. nach Inkubation mit Surfactant resultiert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ eine signifikant schlechtere Verflüssigung.

Bei Inkubation mit DNase und Surfactant ergibt sich mit 54,8 % Flüssiganteil zwar ein höherer Wert als bei der Kontrolle; dieses Ergebnis ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Allerdings ist die Verflüssigung bei Inkubation mit DNase *und* Surfactant auch nicht signifikant schlechter ($p > 0,05$) als bei Inkubation mit DNase alleine.

Insgesamt ergeben die vorliegenden Kompressibilitätsmessungen keine statistisch signifikanten Hinweise für eine Inhibition der DNase-Wirkung bei Zugabe von Surfactant.

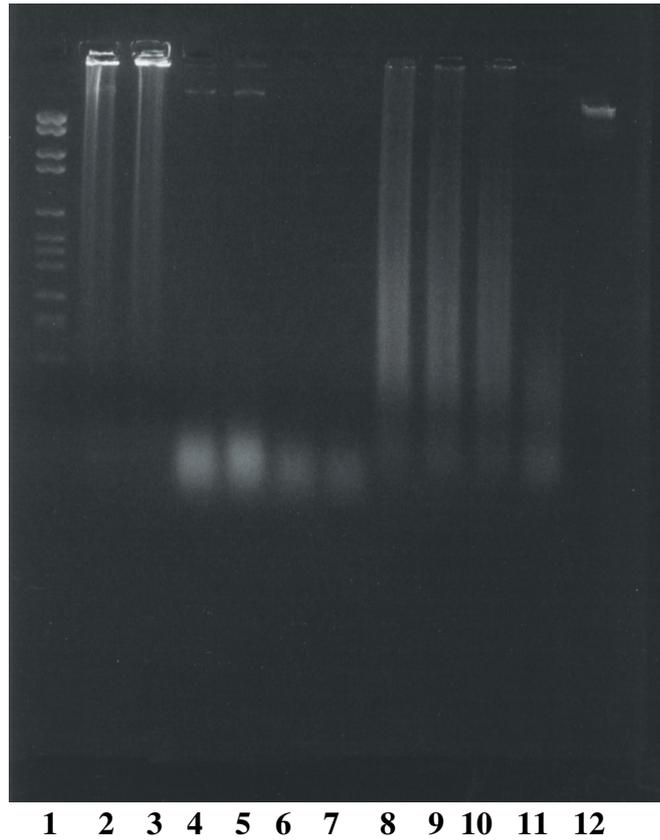
3.7 Ergebnisse der Agarose-Gel-Elektrophoresen

Auf den Gelen waren, mit Ausnahme der Marker-DNA, sozusagen „DNA-Schlieren“ zu sehen. Dies war zu erwarten, zum einen, weil die verwendete Kälberthymus-DNA ein Gemisch aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge ist, zum anderen, weil DNA von DNase I unspezifisch gespalten wird und somit beim enzymatischen Verdau ebenfalls DNA-Fragmente unterschiedlicher Basenpaarlänge entstehen. Somit konnten auch keine deutlichen Banden auf dem Gel erscheinen.

Entscheidend ist, dass bei Zugabe von DNase in steigender Konzentration zunehmend kleinere DNA-Fragmente entstanden, was auf dem Gel daran zu erkennen war, dass sich die Lokalisation der „Schlieren“ entsprechend in Richtung Lauffront verschob. Diese Wirkung von Pulmozyme® wurde durch Alveofact® in Konzentrationen von 10, 100 und 1000 µg/ml *nicht* beeinträchtigt. Vielmehr konnte man beobachten, dass bei Zugabe von Alveofact® in steigender Konzentration *noch* kleinere DNA-Fragmente entstanden. Der beobachtete Effekt war zwar sehr diskret und somit keineswegs beweisend; dennoch kann man spekulieren, dass pulmonaler Surfactant beim enzymatischen Verdau von DNA durch DNase I eventuell sogar synergistisch wirken könnte.

Inkubierte man Pulmozyme® unverdünnt 15 Minuten bei 100°C, so wurde das Enzym vollständig denaturiert. Entsprechende Gelelektrophoresen, bei denen diese zuvor inaktivierte DNase verwendet wurde, zeigten, dass *kein* Verdau der Kälberthymus-DNA mehr stattfand. Mit diesen Kontrollelektrophoresen wurde also nachgewiesen, dass bei den Vorbereitungen aller anderen Proben der enzymatische Verdau der DNA vor Durchführen der Elektrophorese mit Hilfe der in Abschnitt 2.2.1.1.1 beschriebenen Methode tatsächlich vollständig gestoppt wurde, wie dies ja auch beabsichtigt war.

Abb. 3.17 zeigt exemplarisch ein Agarosegel.



- 1 : DNA molecular weight standard VI
- 2 : 1 mg/ml DNA
- 3 : 1 mg/ml DNA + 1000 µg/ml Alveofact®
- 4 : 1 mg/ml DNA + 1 µg/ml Pulmozyme®
- 5 : 1 mg/ml DNA + 1 µg/ml Pulmozyme® + 10 µg/ml Alveofact®
- 6 : 1 mg/ml DNA + 1 µg/ml Pulmozyme® + 100 µg/ml Alveofact®
- 7 : 1 mg/ml DNA + 1 µg/ml Pulmozyme® + 1000 µg/ml Alveofact®
- 8 : 1 mg/ml DNA + 0,1 µg/ml Pulmozyme®
- 9 : 1 mg/ml DNA + 0,1 µg/ml Pulmozyme® + 10 µg/ml Alveofact®
- 10 : 1 mg/ml DNA + 0,1 µg/ml Pulmozyme® + 100 µg/ml Alveofact®
- 11 : 1 mg/ml DNA + 0,1 µg/ml Pulmozyme® + 1000 µg/ml Alveofact®
- 12 : DNA molecular weight standard II

Abb. 3.17: Agarose-Gel-Elektrophorese von Kälberthymus-DNA nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pulmozyme® und/oder Alveofact®.

4. DISKUSSION

4.1 DNA-Konzentration und Elastaseaktivität im Sputum von CF-Patienten: mögliche diagnostische und therapeutische Konsequenzen

Bei Mukoviszidose fallen im Rahmen von bronchopulmonalen Infektionen große Mengen an Leukozyten, vor allem an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) im Sputum an [16, 17]. Dementsprechend wäre zu erwarten, dass eine pulmonale Infektion mit einer erhöhten DNA-Konzentration und gesteigerten Elastaseaktivität im Sputum einhergeht [25, 53].

In der Mukoviszidose-Ambulanz des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Gießen wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine inhalative DNase-Therapie in der Regel dann eingeleitet, wenn Zeichen einer chronischen Entzündung vorliegen [1] und semi-quantitativ wiederholt „massenhaft“ Leukozyten im Sputum (d.h. 20-30 PMN/Gesichtsfeld) nachzuweisen sind. Die Inhalationen werden dann probatorisch über einen Zeitraum von ca. drei Monaten mit 1 x 2,5 ml Pulmozyme® durchgeführt. Anschließend wird je nach Klinik, Lungenfunktionsbefund und Patientencompliance über eine Fortsetzung der Therapie entschieden.

Die Patienten berichten dabei über sehr unterschiedliche Erfahrungen mit der Therapie: Die Schilderungen reichen von positiver Bewertung über unveränderte Beschwerden bis hin zu subjektiver Verschlechterung des Befindens. Unter der DNase-Therapie fallen zum Teil derart exzessive Mengen an Bronchialsekret an, dass die Elimination nicht mehr ausreichend gelingt. Die Lebensqualität kann dementsprechend aufgrund des ständigen Hustens zusätzlich verschlechtert sein. Übereinstimmende Angaben, denen zufolge eine hohe interindividuelle Variabilität hinsichtlich des Erfolges einer DNase-Therapie besteht, findet man auch in der Literatur [102-104].

Einheitliche Kriterien für die Indikation zur DNase-Therapie gibt es bislang nicht. Sicher ist, dass bereits bei einem Teil der Säuglinge mit CF in der bronchoalveolären Lavage (BAL)-Flüssigkeit erhöhte Interleukin 8-Spiegel, vermehrt neutrophile Granulozyten, erhöhte Konzentrationen freier Elastase und vermutlich auch deutlich erhöhte DNA zu messen sind [105], so dass bei ihnen der Einsatz von DNase gerechtfertigt wäre. Verlässliche nicht-invasive diagnostische Marker der lokalen Inflammation sind nicht verfügbar.

In der Literatur finden sich daher verschiedenste Angaben, z.B. dass eine DNase-Therapie erst bei fortgeschrittenerer Erkrankung zu empfehlen sei. Ebenso findet man aber auch Hin-

weise, dass bereits bei fehlender oder milder pulmonaler Symptomatik konsequent mit DNase inhaliert werden sollte [106, 107].

Insgesamt herrscht auf diesem Gebiet noch Unsicherheit, und eine medizinisch sinnvolle Vereinheitlichung der Therapie – basierend auf einer fundierten Rationale – erscheint wünschenswert, zumal bei einer DNase-Therapie erhebliche Kosten anfallen [102, 103, 108].

Die vorliegenden Untersuchungen zum Nachweis von PMN, DNA und Elastase im Sputum von CF-Patienten sollten zur einfacheren Indikationsstellung der DNase-Therapie beitragen. Als problematisch erwies sich jedoch, dass eine *nichtenzymatische* Isolation der Leukozyten aus dem überwiegend hochviskösen Sputum von CF-Patienten angestrebt wurde. Auf diese Weise sollte gewährleistet sein, dass keine Schädigung bzw. Alteration der Leukozyten bei der Aufbereitung erfolgte. Insbesondere sollte ein künstlicher Zellzerfall vermieden werden, der zu falsch hohen DNA- und Elastase-Werten geführt hätte. Daraus resultierte jedoch die Schwierigkeit, dass viele Sputen auf diese Weise nicht vollständig bzw. homogen suspendiert werden konnten. Dementsprechend konnte auch nur bei einem Teil der Proben, nämlich nur bei homogenen Suspensionen, eine weitere Verarbeitung mit Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgen. Ein weiteres Problem bestand darin, dass relativ große Sputumproben benötigt wurden, um eine ausreichende Zellausbeute zu erreichen. Dadurch waren häufig Parallelbestimmungen weiterer Parameter, beispielsweise von DNA oder HNE, die wünschenswert gewesen wären, mangels Untersuchungsmaterial nicht möglich. Lag eine homogene Suspension vor, so schien sowohl eine Auszählung mit dem Counter Casy®1DT als auch lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer zuverlässige Werte zu ergeben (Abb. 3.12). Der Counter erfasst dabei wegen des zugrundeliegenden Widerstandsmessprinzips (siehe Abschnitt 2.2.3.5) im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Auszählung nur *vitale* Zellen. Dies erklärt den Unterschied der absoluten Leukozytenzahl bei beiden Methoden (Tab. 3.9).

Bei neun Sputumproben führten wir eine Leukozytenfärbung mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau durch. Auf diese Weise war eine lichtmikroskopische Differenzierung von vitalen und avitalen PMN möglich. Dabei lag der Median für den Anteil vitaler Zellen mit 77,2 % relativ hoch (Tab. 3.11). Die Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass bei CF-Patienten infolge chronischer Entzündungen des Respirationstraktes permanent Leukozyten in großer Zahl aus dem Blut ins Gewebe auswandern, so dass in der Regel der Anteil an noch vitalen Zellen bei weitem überwiegt.

Als Routineaufbereitung scheint eine nichtenzymatische Verarbeitung der Sputen aufgrund der beschriebenen Problematik jedoch nicht geeignet. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen *Cai et al.* [109], die CF-Sputen unter anderem zwecks Zelldifferenzierung mit DTT aufbereiteten und Vergleichsuntersuchungen nach Aufbereitung mit einer Enzymmischung aus DNase, Hyaluronidase und Galaktosidase durchführten. Dabei fiel nach enzymatischer Aufbereitung eine wesentlich höhere Zellausbeute auf. Die Autoren empfehlen daher bei CF-Sputen eine Zellisolierung mit Hilfe der oben genannten Enzymmischung, da andernfalls eine exakte Quantifizierung der Zellen nicht möglich zu sein scheint. Folglich kann man aus dem von uns verwendeten Verfahren keine Indikation für den Beginn einer DNase-Therapie ableiten. Unsere ursprünglichen Erwartungen erfüllten sich daher nicht.

Interessant wäre es, der Fragestellung nachzugehen, ob sich nach einer Sputumaufbereitung, wie *Cai et al.* sie empfehlen, eine Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und DNA bzw. zwischen der Leukozytenzahl und Elastaseaktivität im Sputum ergibt. Möglicherweise wäre eine derartige Leukozytenquantifizierung in der Tat als Kriterium für das Einleiten einer inhalativen DNase-Therapie zu verwenden. Entsprechende Untersuchungen liegen nach unserem Wissen bisher nicht vor.

Die vorgelegten Untersuchungsergebnisse ergaben ferner Hinweise, dass die DNA-Konzentration im Sputum von CF-Patienten bei bakterieller Besiedlung deutlich höher ist, insbesondere bei Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (Abb.3.2), einem typischen Erreger bronchopulmonaler Infektionen bei Mukoviszidose [1]. Die Ergebnisse waren aufgrund der kleinen Fallzahl jedoch statistisch nicht signifikant, so dass diesbezüglich weitere Untersuchungen erforderlich wären.

Auch bezüglich der Elastaseaktivität stützten unsere Ergebnisse die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen Erregernachweis im Sputum und erhöhter HNE-Aktivität besteht, da hier ebenfalls eine Tendenz zu erhöhter Aktivität bei bakterieller Besiedlung auffiel. Allerdings war auch hier die Fallzahl nicht ausreichend, so dass ebenfalls weiterführende Untersuchungen sinnvoll erscheinen. In Übereinstimmung zu den Beobachtungen bezüglich der DNA-Konzentration gingen insbesondere *Pseudomonas*infektionen mit einer erhöhten Elastaseaktivität einher.

Interessant ist auch die Frage, ob insbesondere bei *Pseudomonas*infektionen im Vergleich zu anderen Infektionen signifikant mit höheren Leukozytenzahlen im Sputum zu rechnen ist. Da die anfallende DNA überwiegend, die von uns bestimmte Elastase vollständig von zerfallen-

den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten stammt, ist dies anzunehmen. Auch diesbezüglich wären weitere Untersuchungen sinnvoll.

Betrachtete man die Gesamtzahl der 51 CF-Sputen, bei denen DNA und HNE bestimmt wurden, so ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ($r = 0,62$ bei $p < 0,001$) zwischen beiden Parametern, d.h. eine höhere DNA-Konzentration ging auch mit einer gesteigerten Elastase-Aktivität einher (Abb. 3.5 und 3.11). Allerdings galt diese Beobachtung nicht für alle Patienten. Es gab auch Krankheitsverläufe einzelner Patienten mit negativer Korrelation, bei denen hohe DNA-Spiegel mit niedrigen HNE-Konzentrationen einhergingen (Abb. 3.10). Dies lässt auf weitere individuelle Regulationsmechanismen schließen.

4.2 Einfluss von DNase-Inhalation auf Elastase

Bei 15 Patienten, die mit inhalativer DNase behandelt wurden, lagen sowohl die DNA-Konzentration als auch die HNE-Aktivität höher als bei der Vergleichsgruppe ohne DNase-Therapie (Tab. 3.5). Statistisch signifikant war dieser Unterschied jedoch nur bezüglich der DNA-Konzentration. Dieses Ergebnis überrascht insofern nicht, als die Therapie nach dem üblichen Regime der Gießener Mukoviszidose-Ambulanz nur eingeleitet wurde, wenn semi-quantitativ wiederholt „massenhaft“ PMN im Sputum nachgewiesen worden waren. Folglich war auch zu erwarten, dass infolge Zellzerfalls der PMN große Mengen an DNA anfielen. Dass dennoch keine sichere Beziehung zwischen einer DNase-Therapie und der HNE-Aktivität nachzuweisen war, spricht ebenfalls für die Hypothese, dass weitere Mechanismen einen Einfluss auf die Elastaseaktivität haben. Vermutlich hängt die HNE-Aktivität eher vom aktuellen Status der Erkrankung bzw. der Entzündungsaktivität ab [110]. So wäre es beispielsweise vorstellbar, dass bei allmählich abklingender Entzündungsreaktion zwar noch große Mengen an Leukozyten-DNA nachweisbar sind, da deren Elimination und Expektoration als Folge erhöhter Viskosität und Sekretretention erschwert ist. Die Elastaseaktivität könnte zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits deutlich rückläufig sein. Sinnvoll erscheinen daher auch weitere Untersuchungen an Patienten unter bzw. ohne DNase-Therapie bei paralleler Bestimmung von Entzündungsparametern im Serum (CRP, IgM, IgG, IL-8 und Leukozytenelastase), im Sputum (Leukozyten, DNA, IL-1, IL-6, TNF α und Leukozytenelastase [111]) sowie von Lungenfunktionsparametern (FVC, FEV₁). Zum Teil ist dies bereits durch die Arbeitsgruppen von *Rochat et al.*, *Shah et al.* sowie *Costello et al.* erfolgt [33, 77, 78]. Aus pädiatrischer Sicht dürften künftig besonders IL-8-Messungen im Atemkondensat von Interesse sein, die zur Zeit Gegenstand erster wissenschaftlicher Studien sind [112].

Bei vier Sputen führten wir gleichzeitig Bestimmungen der PMN-Zahl (Auszählung mittels Neubauerzählkammer), der DNA-Konzentration und der HNE-Aktivität durch. Aufgrund der geschilderten Problematik der Sputumaufbereitung zur Leukozytenquantifizierung konnten nur bei derart wenigen Fällen gleichzeitig alle drei Parameter erhoben werden. Zwar ergab die Regressionsanalyse Hinweise, dass eine größere Leukozytenzahl auch mit einer höheren DNA-Konzentration einhergeht; das Ergebnis war aber statistisch nicht signifikant. Entsprechend scheint eine positive Korrelation zwischen relativem Anteil an avitalen PMN und nachweisbarer DNA zu bestehen. Auch hier war das Ergebnis jedoch nicht signifikant. Hinsichtlich PMN-Zahl und HNE-Aktivität bzw. bezüglich des relativen Anteils an avitalen PMN und Elastaseaktivität konnte jeweils kein Zusammenhang festgestellt werden. Die genannte Fallzahl war daher insgesamt in allen Fällen zu niedrig, um eine sichere Aussage treffen zu können (Abb. 3.14).

Armstrong et al. untersuchten die bronchoalveoläre Lavage (BAL) von CF-Patienten unter 6 Jahren hinsichtlich Zytologie der BAL, IL-8-Konzentration und Elastasekonzentration [105]. Dabei ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen der Anzahl von neutrophilen Granulozyten und der IL-8-Konzentration, der Anzahl der Neutrophilen und der Elastasekonzentration sowie zwischen der IL-8- und der Elastasekonzentration. Die höchste Anzahl an Neutrophilen, die höchsten IL-8- und die höchsten Elastasekonzentrationen wurden dabei jeweils in Lavagen von Patienten nachgewiesen, die alle mit *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt waren. Vergleichbare Untersuchungen im Sputum von CF-Patienten wären wünschenswert, da dieses Material ab einem Alter von ca. 6-7 Jahren vergleichsweise einfach zu gewinnen ist und die jeweiligen Entzündungsparameter als Kriterium für die Planung der weiteren Therapie herangezogen werden könnten, z.B. hinsichtlich der Frage, ob eine Inhalationstherapie mit DNase eingeleitet beziehungsweise fortgesetzt werden sollte.

Die Beobachtungen von *Rochat et al.* [33] schienen nahe zu legen, dass durch inhalative DNase-Therapie ein Anstieg der Elastaseaktivität induziert wird. Als Erklärung wurde vor allem geltend gemacht, dass DNA freie Elastase bindet und damit inaktiviert [75-77]. Bei Spaltung der langkettigen DNA in kürzere Fragmente gehe diese inhibierende Wirkung auf die Elastase verloren; es resultiere eine erhöhte Elastaseaktivität. Die von uns vorgelegten Ergebnisse sprechen eher gegen einen solchen einfachen Zusammenhang. Sie stehen vielmehr im Einklang mit der These von *Shah et al.*[77] und *Costello et al.*[78], dass ein solcher Einfluss *nicht* besteht. Eine Untersuchung von *Duranton et al.* zeigte außerdem, dass auch kürzere

DNA-Fragmente, wie sie unter Inhalationstherapie mit DNase entstehen, in unverändertem Ausmaß sowohl HNE als auch weitere Proteinase inhibieren [113].

4.3 Pulmozyme® und Alveofact®

4.3.1 Untersuchungen zur Interaktion von Pulmozyme® und Alveofact®

Neben einer DNase-Therapie wird seit längerer Zeit der potentielle Nutzen einer ergänzenden Surfactant-Therapie diskutiert [79-86, 95]. Daher war es wichtig, mögliche Interferenzen zwischen beiden Substanzen auszuschließen. Die von uns durchgeführten Adsorptions- und dynamischen Messungen zur Überprüfung einer eventuellen Beeinflussung der Surfactantaktivität durch DNase ergaben keine Hinweise, dass es hierbei zu einer Inhibition von Surfactant kommt.

Um andererseits eine Beeinträchtigung der DNase-Aktivität durch Surfactant auszuschließen, wurden Agarose-Gel-Elektrophoresen durchgeführt (Abschnitte 2.2.1.1.3 und 3.7). Dabei zeigte sich, dass die Aktivität von Pulmozyme® durch Alveofact® nicht reduziert wird. Es ergaben sich sogar Hinweise, dass die verwendete Kälberthymus-DNA bei Inkubation mit *beiden* Substanzen möglicherweise besser gespalten wird.

Auch bei den durchgeführten Kompressibilitätsmessungen (Abschnitt 3.6) war keine Beeinträchtigung der DNase-Wirkung bei Zugabe von Surfactant festzustellen. Hinweise für eine verbesserte Wirksamkeit der DNase unter Zugabe von Surfactant ergaben sich hier jedoch nicht.

Einschränkend muss gesagt werden, dass sämtliche in dieser Arbeit diskutierten Untersuchungen mit dem Surfactantpräparat Alveofact® und der bislang kommerziell verfügbaren DNase (Pulmozyme®) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse können daher nicht ohne weiteres auf andere Präparate übertragen werden. In Deutschland wird zwar im medizinischen Bereich überwiegend Alveofact® als pulmonaler Surfactant eingesetzt, es gibt jedoch inzwischen eine neuere, aktinresistente DNase [114, 115], über deren eventuelle Interaktionen mit Alveofact® aufgrund unserer Untersuchungen keine Aussagen getroffen werden können.

Bezüglich der Beobachtung, dass in der Agarose-Gel-Elektrophorese ein effizienterer DNA-Verdau nach Inkubation mit DNase *und* Surfactant nachweisbar zu sein scheint, muss die Einschränkung gemacht werden, dass diese Untersuchungen mit Kälberthymus-DNA als Substrat durchgeführt wurden. Entsprechende Untersuchungen mit humaner DNA liegen

nach unserer Kenntnis bisher nicht vor. Bei den Kompressibilitätsmessungen war eine derartige verbesserte Wirksamkeit der DNase in Gegenwart von Surfactant nicht festzustellen. Hier wurden die Untersuchungen an CF-Sputen durchgeführt, so dass in diesen Fällen humane DNA als Substrat diente und die Vergleichbarkeit zur Wirksamkeit *in vivo* eher gegeben ist.

4.3.2 Schlussfolgerungen für eine inhalative Kombinationstherapie von Pulmozyme® und Alveofact®

Zusammenfassend sprechen die im Abschnitt 4.3 diskutierten Untersuchungen dafür, dass Pulmozyme® und Alveofact® sich *nicht* inhibieren. Ferner besteht aus unserer Sicht auch keine Gefahr, dass es unter DNase-Therapie zu einer signifikanten Erhöhung der Elastaseaktivität kommen könnte.

Daraus ergeben sich als Schlussfolgerungen zum einen, dass eine inhalative DNase-Therapie sicher und unbedenklich erscheint. Ferner könnte eine gemeinsame inhalative Verabreichung beider Medikamente bei Mukoviszidosepatienten aus folgenden Gründen sinnvoll sein (vgl. Abschnitt 1.4):

- Pulmonaler Surfactant erleichtert das Wiedereröffnen distaler Atemwege [79].
- Aufgrund seiner spreitenden Eigenschaften könnte Surfactant dazu beitragen, dass andere Medikamente, z.B. DNase, besser an ihren Wirkort gelangen [94, 95].
- Surfactant verbessert die mukoziliäre Clearance [80, 81] durch Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz [81].
- Die Surfactantproteine A und D üben Opsoninfunktion aus und spielen somit eine Rolle bei der Abwehr pulmonaler Infektionen [83-85]. Einschränkend muss gesagt werden, dass Alveofact® zwar die Surfactantproteine B und C, nicht jedoch SP-A und SP-D enthält. Jedoch ist auch bekannt, dass andere Surfactantbestandteile eine immunologische Funktion haben: Phospholipide supprimieren die Proliferation, Immunglobulinproduktion und Zytotoxizität von Lymphozyten. Des Weiteren inhibieren Phospholipide das Freisetzen von Endotoxin-stimulierten Zytokinen (TNF, IL-1, IL-6) aus Makrophagen [82].

- Ferner sind bei CF-Patienten Alterationen des körpereigenen Sufactants beobachtet worden [87-89]. Insbesondere konnte eine erhebliche Erniedrigung von SP-A und SP-D nachgewiesen werden [116, 117]. Außerdem wiesen *Griese et al.* nach, dass wichtige oberflächenaktiven Bestandteile des Surfactants, nämlich Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol, bei CF-Patienten signifikant erniedrigt sind [89]. Bei Untersuchungen mit dem Pulsating Bubble Surfactometer durch dieselbe Arbeitsgruppe zeigte der pulmonale Surfactant von CF-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe daher erwartungsgemäß eine geringere Oberflächenaktivität [89].
- 2002 beobachteten *Tegtmeyer et al.*, dass Alveofact ® offensichtlich die lokale Aktivierung von PMN inhibiert [118]. Allerdings handelte es sich dabei um einen Fallbericht bei einem zweijährigen Mädchen mit ARDS im Rahmen einer Meningokokken-sepsis. Es ist unklar, inwieweit sich diese Beobachtung auf CF-Patienten übertragen lässt.
- Umgekehrt gibt es Hinweise, dass DNase sich positiv auf die Surfactantzusammensetzung beziehungsweise auf das Phospholipidprofil auswirkt: *Zahm et al.* [119] inkubierten Sputum von CF-Patienten mit rhDNase oder einer Kontrolllösung aus NaCl und CaCl₂ (analog zu der Lösung, in der die kommerziell erhältliche DNase aufgelöst ist). Bei den mit DNase inkubierten Sputen fielen anschließend signifikante Änderungen des Phospholipidprofiles auf, wobei nach Inkubation signifikant mehr Phospholipide, dabei wiederum signifikant mehr Phosphatidylglycerol nachweisbar waren. Die Autoren folgern, dass durch Spaltung der DNA unter dem Einfluss von DNase Interaktionen zwischen DNA und Glycoproteinen verändert werden und dadurch assoziierte Lipide quasi „demaskiert“ werden, so dass diese wiederum oberflächenaktiv wirksam werden können. Außerdem wurde von *Zahm et al.* bei den mit DNase inkubierten Sputen eine signifikante Verbesserung verschiedener rheologischer Parameter – sowohl der relativen mukoziliären Transportrate als auch der Hustenclearance – beobachtet.

1997 führten *Griese et al.* mit fünf jungen erwachsenen CF-Patienten eine doppelblinde, plazebokontrollierte Pilotstudie mit crossover design durch, um die Wirkung einer Inhalationstherapie von 120 mg Alveoact® an fünf aufeinanderfolgenden Tagen bei CF-Patienten zu überprüfen [120]. Zu Beginn der Studie, vor jeder sowie 30 und 90 Minuten nach jeder Inhalation wurden die FVC und FEV₁ gemessen. Bei dieser Studie ergab sich hinsichtlich der Lun-

genfunktionsparameter kein signifikanter Effekt. Die Autoren argumentierten, dass dies jedoch unter Umständen auf eine unzureichende Surfactantdosis, eine inhomogene Verteilung des Medikamentes in den Atemwegen oder auf eine Inhibition des Surfactants in der Lunge zurückzuführen sei. Dementsprechend erscheinen weiterführende Untersuchungen insbesondere mit höheren Dosen wünschenswert. Allerdings wurden für die Verabreichung von 120 mg Alveofact® über ein Pari-Inhaliergerät mit Pari IS-2-Kompressor, wie er in Deutschland bei CF-Patienten häufig eingesetzt wird, bereits 20 bis 25 Minuten benötigt. Bei höherer Dosis mit entsprechend längeren Inhalationszeiten könnten Compliance-Probleme seitens der Patienten resultieren, denen allerdings mit Hilfe moderner Inhalationsgeräte begegnet werden könnte [121, 122, 123].

Untersuchungen zur inhalativen Kombinationstherapie von Pulmozyme® und Alveofact® (oder anderer Surfactantpräparate) liegen unseres Wissens noch nicht vor. Entsprechende Studien erscheinen wünschenswert und sinnvoll, zumal nach den vorliegenden Untersuchungen keine gegenseitige Inhibition der beiden Medikamente zu erwarten ist. Ebenso konnte die Arbeitsgruppe um *Griese* keine Nebenwirkung der Surfactant-Inhalationstherapie beobachten. Ein entsprechender Therapieversuch im Rahmen klinischer Studien wäre also aller Voraussicht nach sicher und ethisch vertretbar, wenn auch kostenaufwendig.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Sputum von Mukoviszidose(cystic fibrosis, CF)-Patienten enthält ca. 3 – 15 mg DNA / ml Sputum, die erheblich zur Viskositätserhöhung des Sputums beiträgt und somit eine Expektion desselben erschwert. Überwiegend stammt die DNA aus zerfallenden polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Seit Anfang der 90er Jahre wird rekombinante humane (rh) DNase I (Pulmozyme®) bei CF-Patienten inhalativ verabreicht. Ziel ist dabei, die länger-kettigen DNA-Fragmente zu spalten, somit die Viskosität des Sputums herabzusetzen und die Expektion zu erleichtern. Die Erfolge dabei variieren jedoch von Patient zu Patient erheblich, so dass sich auch wegen der hohen Kosten des Medikamentes die Frage stellt, welche Kriterien für die Einleitung einer Inhalationstherapie mit DNase definiert werden sollten.

Es liegen außerdem Untersuchungen vor, denen zufolge die Inhalation von DNase I zu einer Erhöhung der Elastaseaktivität im Sputum führen soll. Dies wäre bedenklich, da humane Neutrophilenelastase (HNE) maßgeblich an der Destruktion des Lungengewebes beteiligt ist.

Eine weitere Überlegung ist, dass die Wirkung von rhDNase möglicherweise durch eine gleichzeitige inhalative Gabe von pulmonalem Surfactant verbessert werden könnte. Bevor entsprechende Untersuchungen *in vivo* erfolgen, war jedoch zu klären, ob beide Medikamente sich nicht eventuell gegenseitig inhibieren.

Methoden

Ziel war es, die PMN im Sputum durch eine nichtenzymatische Aufbereitung zu isolieren und zu quantifizieren. Bei 51 Sputumproben von Mukoviszidosepatienten wurden Messungen der DNA-Konzentration und der HNE-Aktivität durchgeführt. Dabei wurde die DNA-Konzentration nach enzymatischer Spaltung mit RNase A photometrisch bei 260 nm ermittelt. Die HNE-Aktivität wurde unter Verwendung von Suc-L-alanyl-L-valyl-4nitroanilid als spezifischem chromogenem Substrat gemessen.

Zur Überprüfung der DNase-Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Surfactantkonzentrationen wurden 5 Agarose-Gel-Elektrophoresen und an 6 Sputumproben von CF-Patienten Kompressibilitätsmessungen durchgeführt.

Um zu beurteilen, ob die oberflächenaktive Wirkung von Surfactant durch rhDNase beeinflusst wird, wurden Adsorptions- und dynamische Messungen der Surfactantaktivität in Anwesenheit unterschiedlicher DNase-Konzentrationen an einem Pulsating Bubble Surfactometer durchgeführt.

Ergebnisse

Mit dem methodischen Ansatz einer nichtenzymatischen Aufbereitung war es nicht in jedem Falle möglich, das Sputum von Mukoviszidosepatienten homogen zu suspendieren. Auf der Grundlage dieser Methode war deshalb eine zuverlässige Quantifizierung der PMN nicht zu erreichen.

Die Untersuchungen ließen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen DNase-Therapie und Höhe der Elastaseaktivität erkennen, insbesondere ergab sich auch kein Hinweis, dass eine DNase-Therapie zu einer (potentiell nachteiligen) Erhöhung der Elastaseaktivität führen würde.

Die Kompressibilitätsmessungen und die Messungen am Pulsating Bubble Surfactometer ergaben keine statistisch signifikanten Hinweise auf eine Inhibition der DNase-Wirkung bei Zugabe von Surfactant und umgekehrt. Eine gegenseitige Inhibition der Wirkung von DNase und Surfactant konnte durch unsere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit für Pulmozyme® und das in Deutschland sehr verbreitete Surfactantpräparat Alveofact® ausgeschlossen werden.

Schlussfolgerung

Eine nichtenzymatische Aufbereitung des Sputum von Mukoviszidosepatienten ermöglicht keine zuverlässige Quantifizierung der PMN, was wiederum bedeutet, dass auf diese Weise kein Kriterium für den Beginn einer Therapie mit Pulmozyme® etabliert werden konnte.

Die Ergebnisse unterstützen die These, dass die Inhalation von rekombinanter humaner DNase I *nicht* zu einer Erhöhung der HNE führt. Eine Pulmozyme®-Therapie erscheint daher diesbezüglich unbedenklich.

Eine gemeinsame inhalative Verabreichung von Pulmozyme® und Alveofact® ist problemlos möglich, da sich kein Hinweis für eine gegenseitige Inhibition der beiden Medikamente

find. Weiterführende klinische Studien zur Überprüfung einer eventuell verbesserten Wirkung von Pulmozyme® bei Kombination mit Alveofact® sind daher sinnvoll und wünschenswert.

6. SUMMARY

Background

The sputum of patients suffering from cystic fibrosis (CF) contains high concentrations of DNA (about 3 – 15 mg DNA / ml Sputum). It contributes considerably to the high viscosity of the CF sputum, thus, rendering expectoration more difficult. Most of the DNA is released by decaying polymorphonuclear neutrophile granulocytes (PMN). Recombinant human (rh) DNase I (German trade name Pulmozyme®) has been administered to CF patients via inhalation since the beginning of the 90s. The idea is that long chain DNA fragments may be cleaved, thereby reducing sputum viscosity and facilitating expectoration. However, the therapeutic effects show marked interindividual variations. Furthermore, the high costs of the therapy have to be considered. Thus, the question arises for the criteria according to which an inhalative DNase therapy is defined as adequate.

Several studies have indicated that inhalation of rhDNase I might result in elevated elastase activity in the CF sputum. This would point to a potentially harmful side effect of this therapy consisting in the enhanced release of human neutrophile elastase (HNE) which is known to contribute considerably to the destruction of pulmonary tissue in CF patients.

The therapeutic effects of rhDNase might be improved by inhalative co-administration of pulmonary surfactant. However, before starting to study the combined effects *in vivo* it should be clarified by *in vitro* studies, whether rhDNase and surfactant inhibit each other.

Methods

The aim was to isolate PMN in sputum by a non-enzymatic assay in order to quantify the presence of PMN.

In 51 sputum samples from CF patients DNA concentration and HNE activity were assessed. After enzymatic cleavage with RNase A, DNA concentration was measured photometrically at 260 nm. HNE activity was measured using Suc-L-alanyl-L-valyl-4nitroanilide as specific chromogenic substance.

In order to measure DNase activity in presence of different surfactant concentrations, agarose gel electrophoresis was performed in sputum samples from 5 CF patients and a compaction assay was done in 6 CF sputum samples.

Adsorption and dynamic measurements of surfactant activity in presence of different DNase concentrations were performed using a Pulsating Bubble Surfactometer in order to investigate whether surface active properties of surfactant are influenced by DNase.

Results

Using the non-enzymatic assay, it was not possible to obtain homogeneous suspensions of CF sputum for each sample. Thus, based on this method the PMN fraction could not be quantified reliably in the investigated group of patients.

Our investigations showed no clear relationship between DNase application and elastase activity levels in CF sputum. In particular, no evidence was obtained that DNase therapy might induce a (potentially harmful) elevation of elastase activity.

Mutually inhibitory effects of DNase and surfactant applications could be excluded under the treatment with Pulmozyme® and surfactant preparation Alveofact® commonly used in Germany.

Conclusions

Non-enzymatic processing of CF sputum with the assay used in the present study does not allow to quantify PMN reliably. Thus, this approach does not provide a reliable criterion for the decision whether or not to start a Pulmozyme® therapy.

The results support the hypothesis that inhalation of rhDNase I does *not* cause an elevation of HNE. Pulmozyme® therapy therefore appears to be safe in this respect.

There are no objections against the inhalative co-administration of rhDNase I and surfactant, since no indication for mutually inhibitory interactions between these two pharmaceuticals was found. Further clinical studies are necessary in order to investigate whether the effects of Pulmozyme® are improved by combination with Alveofact®.

7. ANHANG

7.1. Glossar

Folgende Abkürzungen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

ARDS	adult respiratory distress syndrome
α_1 -AT	α_1 - Antitrypsin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
CF	cystic fibrosis, Zystische Fibrose, Synonym für Mukoviszidose
DIOS	Distales intestinales Obstruktionssyndrom
DNA	deoxyribonucleic acid
(rh) DNase	(rekombinante humane) Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylen diamine tetraacetic acid
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
HLE	Humane Leukozytenelastase (Synonym: HNE)
HNE	Humane Neutrophilenelastase (Synonym: HLE)
IL	Interleukin
M	mean; arithmetisches Mittel
PBS	1. phosphate buffered saline 2. Pulsating Bubble Surfactometer

PMN	Polymorphkernige Neutrophile; Synonym für Neutrophile Granulozyten
PSA	Pseudomonas aeruginosa
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SD	standard deviation; Standardabweichung
SEM	standard error of the mean; Standardabweichung des Mittelwertes
SLPI	Sekretorischer Leukoproteaseninhibitor
SP-A bzw. SP-D	Surfactantprotein A bzw. D
STA	Staphylococcus aureus
TAE	Tris-Acetat
TNF α	Tumornekrosefaktor α
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute

Name, Vorname	Pat. Nr.	Geb.-Dat.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Probe (Dat.)	Sputum Nr.	DNase	mg DNA/g	U HNE/g
B., K.	21	21.11.85	9	w	04.04.95	47	-	2,50	1090
B., N.	24	16.07.80	15	w	11.04.95	54	-	2,60	707
B., M.	14	07.03.72	23	w	23.03.95	32	-	42,50	7817
C., H.	29	28.04.82	13	w	27.04.95	66	+	-	-
D., T.	10	17.04.72	23	w	09.03.95	20	+	3,10	2190
F., M.	44	12.02.88	8	m	28.09.95	147	-	6,00	2696
F., C.	32	17.01.73	23	w	28.09.95	143	-	7,60	2776
F., G.	9	25.02.67	28	m	08.03.95	18	-	10,90	6797
F., G.	9	25.02.67	29	m	04.09.95	126	+	12,60	7047
G., G.	8	16.11.84	10	m	07.03.95	16	-	5,30	2605
G., R.	35	28.03.88	7	w	27.07.95	92	-	3,60	1737
G., M.	2	03.02.71	24	w	16.02.95	4	-	4,50	980
G., M.	2	03.02.71	25	w	24.08.95	122	+	8,70	2098
G., J.	19	23.08.69	26	m	28.03.95	42	-	8,30	4171
G., J.	19	23.08.69	26	m	28.09.95	145	+	11,80	4607
H., H.	7	14.01.64	31	m	02.03.95	14	-	6,00	6147
H., M.	13	03.04.78	17	m	23.03.95	30	-	0,32	0
H., S.	18	01.06.76	19	w	28.03.95	40	-	13,75	2417
H., J.	40	05.07.75	20	m	03.08.95	103	-	6,40	2864
H., M.	15	26.01.70	25	m	23.03.95	34	-	6,30	2918
H., M.	15	26.01.70	26	m	04.10.95	153	+	14,30	1230
H., M.	15	26.01.70	26	m	12.10.95	155	+	14,70	2197
H., M.	15	26.01.70	26	m	12.10.95	157	+	12,30	1528
K., T.	26	10.01.76	19	m	19.04.95	58	-	1,10	534
K., A.	25	22.11.79	15	m	18.04.95	56	-	10,50	5012
K., A.	28	03.09.74	21	w	25.04.95	64	-	-	-
K., A.	28	03.09.74	21	w	12.09.95	129	-	5,10	1508
K., M.	22	30.09.85	10	m	05.04.95	50	+	15,00	8087
K., M.	22	30.09.85	10	m	11.07.95	84	-	10,60	3827

Name, Vorname	Pat. Nr.	Geb.-Dat.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Probe (Dat.)	Sputum Nr.	DNase	mg DNA/g	U HNE/g
K., N.	6	04.01.78	17	m	02.03.95	12	-	13,00	4162
L., S.	38	21.01.83	13	w	01.08.95	98	-	12,50	6709
L., K.	20	26.05.63	32	w	30.03.95	44	-	12,30	3343
L., A.	1	22.06.71	24	w	14.02.95	2	-	3,90	4535
L., K.	17	26.10.83	11	w	27.03.95	38	-	2,40	612
M., A.	39	14.11.88	7	w	01.08.95	100	-	2,10	46
M., C.	45	23.07.65	30	w	13.10.95	159	-	2,80	938
M., M.	30	10.02.74	21	m	04.05.95	68	+	-	-
M., M.	30	10.02.74	21	m	08.08.95	110	+	8,70	1678
M., U.	5	28.07.63	32	w	27.02.95	10	+	0,73	1301
P., D.	33	09.06.84	11	m	11.05.95	78	-	6,40	1805
P., D.	41	22.01.80	16	w	01.09.95	124	-	1,50	142
R., N.	12	23.01.68	27	w	21.03.95	28	+	13,50	4619
R., M.	36	31.07.74	11	m	27.07.95	94	-	4,50	939
S., M.	34	02.02.83	12	w	13.07.95	85	+	11,00	1793
S., M.	3	28.03.79	16	w	16.02.95	6	+	3,60	3401
T., K.	43	11.07.88	7	w	14.09.95	137	-	3,20	652
U., N.	4	08.08.80	15	w	16.02.95	8	-	3,40	1100
U., N.	4	08.08.80	15	w	30.03.95	46	+	10,60	3973
V., S.	42	19.07.84	11	w	14.09.95	135	-	7,90	1616
V., M.	23	27.02.80	15	w	11.04.95	52	-	1,90	5641
W., T.	27	30.07.74	21	m	20.04.95	62	-	-	-
W., W.	11	06.03.72	23	m	21.03.95	26	-	0,10	52
W., B.	16	06.04.60	35	w	23.03.95	36	+	4,50	3259
W., B.	16	06.04.60	35	w	20.07.95	87	-	9,30	1978
Z., S.	37	12.01.71	25	w	27.07.95	96	-	0,47	0
Z., S.	31	10.07.78	17	w	04.05.95	72	+	-	-

Name, Vorname	Pat. Nr.	Sputum Nr.	PMN	mononukl. Z.	Plattenep.	Pseud. aerug.	Staph. aur.	sonstige Bakt.
B., K.	21	47	keine	keine	viel	-	einzelne	physiolog. Mundflora
B., N.	24	54	vermehrt	vereinzelt	vereinzelt	-	-	physiolog. Mundflora
B., M.	14	32	vereinzelt	vereinzelt	kein	massenhaft	-	-
C., H.	29	66	massenhaft	vereinzelt	kein	-	-	physiolog. Mundflora
D., T.	10	20	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	-
F., M.	44	147	massenhaft	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	-
F., C.	32	143	-	-	-	-	-	-
F., G.	9	18	-	-	-	-	-	-
F., G.	9	126	keine	keine	vereinzelt	viel	-	physiolog. Mundflora
G., G.	8	16	keine	keine	vereinzelt	viel	-	physiolog. Mundflora
G., R.	35	92	-	-	-	-	-	-
G., M.	2	4	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	-	-	physiolog. Mundflora
G., M.	2	122	vereinzelt	keine	viel	viel	viel	physiolog. Mundflora
G., J.	19	42	massenhaft	keine	kein	massenhaft	-	-
G., J.	19	145	viel	vereinzelt	kein	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
H., H.	7	14	viel	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	-
H., M.	13	30	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt	-	wenig	physiolog. Mundflora
H., S.	18	40	viel	vereinzelt	kein	einzelne	-	physiolog. Mundflora
H., J.	40	103	viel	vereinzelt	viel	viel	-	physiolog. Mundflora
H., M.	15	34	vereinzelt	vereinzelt	viel	reichlich	-	Pseud. sp. reichl.
H., M.	15	153	viel	viel	vereinzelt	wenig	-	physiolog. Mundflora
H., M.	15	155	viel	vereinzelt	vereinzelt	wenig	massenhaft	physiolog. Mundflora
H., M.	15	157	viel	vereinzelt	vereinzelt	wenig	massenhaft	physiolog. Mundflora
K., T.	26	58	viel	keine	vereinzelt	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
K., A.	25	56	vereinzelt	keine	viel	-	-	physiolog. Mundflora
K., A.	28	64	vereinzelt	keine	vereinzelt	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
K., A.	28	129	vermehrt	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
K., M.	22	50	-	-	-	-	-	-
K., M.	22	84						

Name, Vorname	Pat. Nr.	Sputum Nr.	PMN	mononukl. Z.	Plattenep.	Pseud. aerug.	Staph. aur.	sonstige Bakt.
K., N.	6	12	viel	vereinzelt	kein	-	massenhaft	physiolog. Mundflora
L., S.	38	98	viel	viel	vereinzelt	viel	-	physiolog. Mundflora
L., K.	20	44	massenhaft	keine	vereinzelt	massenhaft	massenhaft	physiolog. Mundflora
L., A.	1	2	keine	keine	viel	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
L., K.	17	38	-	-	-	-	-	-
M., A.	39	100	-	-	-	-	-	-
M., C.	45	159	-	-	-	-	-	-
M., M.	30	68	viel	vereinzelt	vereinzelt	-	-	physiolog. Mundflora
M., M.	30	110	viel	vereinzelt	massenhaft	ganz vereinzelt	-	physiolog. Mundflora
M., U.	5	10	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
P., D.	33	78	massenhaft	vereinzelt	vereinzelt	-	massenhaft	-
P., D.	41	124	vereinzelt	keine	massenhaft	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
R., N.	12	28	massenhaft	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	-
R., M.	36	94	viel	vereinzelt	kein	-	viel	physiolog. Mundflora
S., M.	34	85	keine	keine	massenhaft	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
S., M.	3	6	viel	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	-
T., K.	43	137	viel	keine	vereinzelt	viel	-	physiolog. Mundflora
U., N.	4	8	massenhaft	vereinzelt	kein	massenhaft	-	-
U., N.	4	46	viel	keine	vereinzelt	viel	-	physiolog. Mundflora
V., S.	42	135	viel	vereinzelt	vereinzelt	viel	-	physiolog. Mundflora
V., M.	23	52	vereinzelt	keine	kein	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
W., T.	27	62	massenhaft	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	physiolog. Mundflora
W., W.	11	26	viel	vereinzelt	vereinzelt	-	massenhaft	physiolog. Mundflora
W., B.	16	36	massenhaft	vereinzelt	kein	massenhaft	massenhaft	-
W., B.	16	87	massenhaft	vereinzelt	vereinzelt	massenhaft	-	viel koag.-neg. Staph, phys. Flora
Z., S.	37	96	keine	keine	kein	-	-	physiolog. Mundflora
Z., S.	31	72	-	-	-	-	-	-

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lindemann H, Tümmler B, Dockter G: Mukoviszidose - Zystische Fibrose. 4. Auflage Thieme, Stuttgart New York, 2004.
2. Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law Hai-Yang, Farral M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R: Localisation of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 1985 (318); 384-385.
3. Döring G: Serine proteinase inhibitor therapy in 1-antitrypsin deficiency and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999 (28); 363-375.
4. Allen ED: Opportunities for the use of aerosolized α 1-antitrypsin for the treatment of cystic fibrosis. *Chest* 1996 (110); 256S-260S.
5. Harms HK, Matouk E, Tournier G, von der Hardt H, Weller PH, Romano L, Heijerman HGM, FitzGerald MX, Richard D, Strandvik B, Kolbe J, Kraemer R, Michalsen H: Multicenter, open-label study of recombinant human DNase in cystic fibrosis patients with moderate lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1998 (26); 155-161.
6. Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Van Cong N, Frezal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M, Donis-Keller H: A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 1985 (318); 380 - 382.
7. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 (245); 1066 - 1073.
8. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989 (245); 1059 - 1065.
9. Rosenstein BJ, Zeitlin PL: Cystic fibrosis. *Lancet* 1998 (351); 277-282.

10. Davies J, Trindade M-T, Wallis C, Rosenthal M, Crawford O, Bush A: Retrospective review of the effects of rhDNase in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997 (23); 243-248.
11. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DWH: Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 (151); 1075-1082.
12. Koch C: Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Ped Pulmonol* 2002 (34); 232-236.
13. Govan JRW, Nelson JW: Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 1992 (48); 912-930.
14. Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953 (12); 549-557.
15. Koch C, Høiby N: Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* 2000 (67); 239-247.
16. Ramsey BW, Smith AL: Reduced incidence of respiratory tract infections in cystic fibrosis patients using aerosolized dornase alfa. *Dornase Alfa Clinical Series* 1994 (1); 1-6.
17. Berger M: Inflammation in the lung in cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy* 1991 (9); 119-142.
18. Henry RL, Gibson PG, Carty K, Cai Y, Francis JL: Airway inflammation after treatment with aerosolized deoxyribonuclease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1998 (26); 97-100.
19. Amin N, Dozor AJ: Effects of administration of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease on resting energy expenditure in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1994 (18); 150-154.
20. Dasgupta B, Brown NE, King M: Effects of sputum oscillations and rhDNase in vitro: A combined approach to treat cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol* 1998 (26); 250-255.

21. Aitken ML, Burke W, McDonald G, Shak S, Montgomery AB, Smith A: Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. *JAMA* 1992 (267); 1947-1951.
22. Goldstein IM: Polymorphonuclear leukocyte lysosomes and immune tissue injury. *Prog Allergy* 1976 (20); 301-340.
23. Folds JD, Prince H, Spitznagel JK: Limited cleavage of human immunoglobulins by elastase of human polymorphonuclear granulocytes. *Lab Invest* 1978 (39); 313-321.
24. Baici A, Knöpfel M, Fehr K: Cathepsin G from human polymorphonuclear leukocytes cleaves human IgM. *Mol Immunol* 1982 (19); 719-727.
25. Davis WB, Fells GA, Chernick MS, Di Sant'Agnesse P, Crystal RG: A role for neutrophils in the derangements of the bronchial wall characteristic of cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1983 (127 S); 207.
26. Döring G, Goldstein W, Botzenhart K, Kharazmi A, Schiøtz PO, Høiby N, Dasgupta M: Elastase from polymorphonuclear leukocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* 1986 (64); 597-605.
27. Davis PB, Drumm M, Konstan MW: Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 (154); 1229-1256.
28. Fick RB Jr, Naegel GP, Squier SU, Wood RE, Gee JBL, Reynolds HY: Proteins of the cystic fibrosis respiratory tract. Fragmented immunoglobulin G opsonic antibody causing defective opsonophagocytosis. *J Clin Invest* 1984 (74); 236-248.
29. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989 (320); 365-376.
30. Tosi MF, Zakem H, Berger M: Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 1990 (86); 300-308.
31. Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG, Döring G: Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas*-infected lung in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1989 (84); 1302-1313.
32. Richman-Eisenstat JBY, Jorens PG, Hébert CA, Ueki I, Nadel JA: Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway disease. *Am J Physiol* 1993 (264); L413-L418.

33. Rochat T, Pastore FD, Schlegel-Haueter SE, Filthuth I, Auckenthaler R, Belli D, Suter S: Aerosolized rhDNase in cystic fibrosis: effect on leucocyte proteases in sputum. *Eur Respir J* 1996 (9); 2200-2206.
34. Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG: Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992 (89); 1478-1484.
35. Bruce MC, Poncz L, Klinger JD, Stern RC, Tomashefski JF Jr, Dearborn DG: Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1985 (132); 529-535.
36. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH: Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990 (85); 682-689.
37. Schuster A, Ueki I, Nadel JA: Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200, 355. *Am J Physiol* 1992 (6); L86-91.
38. Suter S, Schaad UB, Morgenthaler JJ, Chevalier I, Schnebli HP: Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1988 (158); 89-100.
39. Smallman LA, Hill SL, Stockley RA: Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: a serine protease effect. *Thorax* 1984 (39); 663-667.
40. Tegner H, Ohlsson K, Toremalm NG, von Mecklenberg C: Effect of human leukocyte enzymes on tracheal mucosa and its mucociliary activity. *Rhinology* 1979 (17); 199-206.
41. Woods DE, Straus DC, Johanson WG Jr, Bas JA: Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. *J Infect Dis* 1981 (143); 784-790.
42. Plotkowski MC, Beck G, Tournier JM, Bernardo-Filho M, Marques EA, Puchelle E: Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelium and the effect of leucocyte elastase. *J Med Microbiol* 1989 (30); 285-293.

43. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M: Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 (13); 257-261.
44. Armstrong JB, White JC: Liquefaction of viscous purulent exudates by deoxyribonuclease. *Lancet* 1950 (2); 739-742.
45. Chernick WS, Barbero GJ, Eichel JH: In vitro evaluation of effect of enzymes on tracheobronchial secretions from patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1961 (27); 589-596.
46. Elmes PC, White JC: Deoxyribonuclease in the treatment of purulent bronchitis. *Thorax* 1953 (8); 295-300.
47. Salomon A, Herchfus JA, Segal MS: Aerosols of pancreatic dornase in bronchopulmonary disease. *Ann Allergy* 1954 (12); 71-79.
48. Spier R, Witebski E, Paine JR: Aerosolised pancreatic dornase and antibiotics in pulmonary infections. *JAMA* 1961 (178); 878-886.
49. Lieberman J: Dornase aerosol effect on sputum viscosity in cases of cystic fibrosis. *JAMA* 1968 (205); 312-313.
50. Raskin P: Bronchospasm after inhalation of pancreatic dornase. *Am Rev Respir Dis* 1968 (98); 697-698.
51. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME: Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1994 (331); 637-642.
52. Geller DE: Aerosolized dornase alfa in cystic fibrosis: Is there a role in the management of patients with early obstructive lung disease? *Pediatr Pulmonol* 1997 (24); 155-158.
53. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL: Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 (87); 9188-9192.

54. Moore S: The Enzymes. PD Boyer (ed.). Academic Press, New York 1981 (14); 281-296.
55. Chernick WS, Barbero GJ: Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics* 1959 (24); 739-745.
56. Potter J, Matthews LW, Lemm J, Spector S: The composition of pulmonary secretions from patients with and without cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1960 (100); 493-495.
57. Matthews LW, Spector S, Lemm J, Potter JL: The overall chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am Rev Respir Dis* 1963 (88(2)); 199-204.
58. Rubin BK, Ramirez OE, Baharav AL: The physical and transport properties of CF sputum after treatment with rhDNase. *Pediatr Pulmonol* 1993 (16, Suppl. 9); 251.
59. Hodson ME, Shah PL: DNase trials in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1995 (8); 1786-1791.
60. Zahm JM, de Bentzmann SG, Deneuille E, Perrot-Minnot C, Dabadie A, Pennaforte F, Roussey M, Shak S, Puchelle E: Dose-dependent in vitro effect of recombinant human DNase on rheological and transport properties of cystic fibrosis respiratory mucus. *Eur Respir J* 1995 (8); 381-386.
61. Tomkiewicz RP, Shak S, King M: Effects of rhDNase on cystic fibrosis sputum viscoelasticity in vitro. *Ped Pulmonol*, 1993 (16, Suppl. 9); 251.
62. Zahm JM, de Bentzmann S, Deneuille E, Perrot-Minnot C, Depret E, Pennaforte F, Roussey M, Puchelle E: Recombinant human DNase I improves the transport of cystic fibrosis respiratory mucus ex vivo. *Ped Pulmonol*, 1993 (16, Suppl. 9); 250.
63. Dasgupta B, Tomkiewicz RP, Boyd WA, Brown NE, King M: Effects of combined treatment with rhDNase and airflow oscillations on spinnability of cystic fibrosis sputum in vitro. *Pediatr Pulmonol* 1995 (20); 78-82.
64. Shah PL, Scott SF, Knight RA, Marriott C, Ranasinha C, Hodson ME: In vivo effects of recombinant human DNase I on sputum in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1996 (51); 119-125.

65. Hubbard RC, McElvaney NG, Birrer P, Shak S, Robinson WW, Jolley C, Wu M, Chernick MS, Crystal RG: A preliminary study of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease I in the treatment of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992 (326); 812-815.
66. Shah PI, Bush A, Canny GJ, Colin AA, Fuchs HJ, Geddes DM, Johnson CA, Light MC, Scott SF, Tullis DE: Recombinant human DNase I in cystic fibrosis patients with severe pulmonary disease: a short-term, double-blind study followed by a six months open-label treatment. *Eur Respir J* 1995 (8); 954-958.
67. Ramsey BW, Astley SJ, Aitken ML, Burke W, Colin AA, Dorkin HL, Eisenberg JD, Gibson RL, Harwood IR, Schidlow DV, Wilmott RW, Wohl ME, Meyerson LJ, Shak S, Fuchs H, Smith AL: Efficacy and safety of short-term administration of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1993 (148); 145-151.
68. Ranasinha C, Assoufi B, Shak S, Christiansen D, Fuchs H, Empey D, Geddes D, Hodson M: Efficacy and safety of short-term administration of aerosolised recombinant human DNase I in adults with stable stage cystic fibrosis. *Lancet* 1993 (342); 199-202.
69. Accurso FJ: Aerosolized dornase alfa in cystic fibrosis patients with clinically mild lung disease. *Dornase Alfa Clinical Series* 1995 (2); 1-6.
70. Shah PL, Scott SF, Fuchs HF, Geddes DM, Hodson ME: Medium term treatment of stable stage cystic fibrosis with recombinant human DNase I. *Thorax* 1995 (50); 333-338.
71. Brandt T, Breitenstein S, von der Hardt H, Tümmler B: DNA concentration and length in sputum of patients with cystic fibrosis during inhalation with recombinant human DNase. *Thorax* 1995 (50); 880-882.
72. Shah PL, Conway S, Scott SF, Rainisio M, Wildman M, Stableforth D, Hodson ME: A case-controlled study with dornase alfa to evaluate impact on disease progression over a 4-year period. *Respiration* 2001 (68); 160-164.
73. Suter S, Schaad UB, Tegner H, Ohlsson K, Desgrandchamps D, Waldvogel FA: Levels of free granulocyte elastase in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis: effect of antimicrobial treatment against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1986 (153); 902-909.

74. Suter S, Chevalier I: Proteolytic inactivation of α 1-proteinase inhibitor in infected bronchial secretions from patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1991 (4); 40-49.
75. Potter JL, Matthews LW, Spector S; Lemm J: Complex formation between basic antibiotics and deoxyribonucleic acid in human pulmonary secretions. *Pediatrics* 1965 (36); 714-720.
76. Kueppers F, Fiel SB: Proteolytic activity of purulent secretions in patients with CF and bronchitis is increased by DNase. *Am Rev Respir Dis* 1992 (145); A563.
77. Shah PL, Scott SF, Knight RA, Hodson ME: The effects of recombinant human DNase on neutrophil elastase activity and interleukin-8 levels in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1996 (9); 531-534.
78. Costello CM, O'Connor CM, Finlay GA, Shiels P, FitzGerald MX, Hayes JP: Effect of nebulised recombinant DNase on neutrophil elastase load in cystic fibrosis. *Thorax* 1996 (51); 619-623.
79. Gaver III DP, Samsel RW, Solway J: Effects of surface tension and viscosity on airway reopening. *J Appl Physiol* 1990 (69); 74-85.
80. Rubin BK, Ramirez O, King M: Mucus rheology and transport in neonatal respiratory distress syndrome and the effect of surfactant therapy. *Chest* 1992 (101); 1080-1085.
81. De Sanctis GT, Tomkiewicz RP, Rubin BK, Schürch S, King: Exogenous surfactant enhances mucociliary clearance in the anaesthetized dog. *Eur Respir J* 1994 (7); 1616-1621.
82. Griese M: Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999 (13); 1455-1476.
83. Mariencheck WI, Savov J, Dong Q, Tino MJ, Wright JR: Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa*. *Am J Physiol* 1999 (277); L 777-L 786.
84. Restrepo CI, Dong Q, Savov J, Mariencheck WI, Wright JR: Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 (21); 576-585.

85. Kabha K, Schmegner J, Keisari Y, Parolis H, Schlepper-Schaeffer J, Ofek I: SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1997 (272); L 344-L 352.
86. Manz-Keinke H, Plattner H, Schlepper-Schäfer J: Lung surfactant protein A (SP-A) enhances serum-independent phagocytosis of bacteria by alveolar macrophages. *Eur J Cell Biol* 1992 (57); 95-100.
87. Hull J, South M, Phelan P, Grimwood K: Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 (156 (1)); 161-165.
88. Bernhard W, Wang JY, Tschernig T, Tümmler B, Hedrich HJ, von der Hardt H: Lung surfactant in a cystic fibrosis animal model: increased alveolar phospholipid pool size without altered composition and surface tension function in CFTR (m1HGU/ m1HGU) mice. *Thorax* 1997 (52 (8)); 723-730.
89. Griese M, Birrer P, Demirsoy A: Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1997 (10); 1983-1988.
90. von Bredow C, Birrer P, Griese M: Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001 (17); 716-722.
91. Mander A, Hockey PM, Wang JY, Warner JO, Postle AD: Pulmonary surfactant composition of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1996 (Suppl 9(5)); 180.
92. Sharma A, Meyer K, Zimmerman J: Surfactant protein A depletion in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 (Suppl 149(3)); A670.
93. Meyer KC, Sharma A, Brown R, Weatherly M, Moya FR, Lewandowski J, Zimmermann JJ: Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young adults with cystic fibrosis. *Chest* 2000 (118); 164-174.
94. Espinosa FF, Shapiro AH, Fredberg JJ, Kamm RD: Spreading of exogenous surfactant in an airway. *J Appl Physiol* 1993 (75); 2028-2039.

95. Van 't Veen A, Krijt EJ, Gommers D, Mouton JW, Kluytmans JAJW, Lachmann B: Surfactant as a carrier for antibiotics: influence of amphotericin B, ceftazidime, pentamidine and tobramycin on surfactant activity. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 (151); A 715.
96. Mrsny RJ, Daugherty AL, Short SM, Widmer R, Siegel MW, Keller G: Distribution of DNA and alginate in purulent cystic fibrosis sputum: Implications to pulmonary targeting strategies. *J Drug Target* 1996 (4); 233-243.
97. Enhorning G: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 1977 (43); 198-203.
98. Balows A, Hansler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ: *Manual of Clinical Microbiology*. 5 th edn. Am Soc. Microbiol., Washington 1991.
99. Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Powers P, Hargreave FE: The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy* 1994 (24); 778-783.
100. Popov TA, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave FE: Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995 (8); 559-565.
101. Sachs L: *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, 9.Auflage, Heidelberg 1999.
102. Cobos N, Danés I, Gartner S, González M, Liñán S, Arnau JM: DNase use in the daily care of cystic fibrosis: who benefits from it and to what extent? Results of a cohort study of 199 patients in 13 centres. *Eur J Pediatr* 2000 (159); 176-181.
103. Innes JA: DNase in cystic fibrosis: the challenge of assessing response and maximising benefit. *Thorax* 1998 (53); 1003-1004.
104. Ledson MJ, Walshaw MJ: Targeting DNase for cystic fibrosis. *Thorax* 1999 (54); 470.
105. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutiérrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD: Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 (156); 1197-1204.

106. Conway SP: Evidence-based medicine in cystic fibrosis: How should practice change? *Pediatr Pulmonol* 2002 (34); 242-247.
107. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, Chen C, Schink T, Döring G, van Konigsbruggen S, Wahn U, Ratjen F : Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 (169); 719-725.
108. Lieu TA, Ray GT, Farmer G, Shay GF: The cost of medical care for patients with cystic fibrosis in a health maintenance organization. *Pediatrics* 1999 (103 (2)); 1273.
109. Cai Y, Carty K, Gibson P, Henry R: Comparison of sputum processing techniques in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996 (22); 402-407.
110. Vogelmeier C, Döring G: Neutrophil proteinases and rhDNase therapy in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1996 (9); 2193-2195.
111. De Rose V: Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2002 (19); 333-340.
112. Becher, Lindemann H: Persönliche Mitteilung.
113. Durantou J, Belorgey D, Carrère J, Donato L, Moritz T, Bieth JG: Effect of DNase on the activity of neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3 in the presence of DNA. *FEBS* 2000 (473); 154-156.
114. Pan CQ, Dodges TH, Baker DL, Prince WS, Sinicropi DV, Lazarus RA: Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem* 1998 (273); 18374-18381.
115. Zahm JM, Debordeaux C, Maurer C, Hubert D, Dusser D, Bonnet N, Lazarus RA, Puchelle E: Improved activity of an actin-resistant DNase I variant on the cystic fibrosis airway secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 (163); 1153-1157.
116. Postle AD, Mander A, Reid KBM, Wang JY, Wright SM, Moustaki M, Warner JO: Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 (20); 90-98.
117. Griese M, Maderlechner N, Bufler P: Surfactant proteins A and D in sputum. *Eur J Med Res* 2001 (6); 33-38.

118. Tegtmeier FK, Möller J, Zabel P: Inhibition of granulocyte activation by surfactant in a 2-yr-old female with meningococcus-induced ARDS. *Eur Respir J* 2002 (19); 776-779.
119. Zahm JM, Galabert C, Chaffin A, Chazalotte JP, Grosskopf C, Puchelle E: Improvement of cystic fibrosis airway mucus transportability by recombinant human DNase is related to changes in phospholipid profile. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 (157); 1779-1784.
120. Griese M, Bufler P, Teller J, Reinhardt D: Nebulization of a bovine surfactant in cystic fibrosis: a pilot study. *Eur Respir J* 1997 (10); 1989-1994.
121. Brand P, Friemel I, Meyer T, Schulz H, Heyder J, Häußinger K: Total deposition of therapeutic particles during spontaneous and controlled inhalations. *J Pharm Sci* 2000 (89); 724-731.
122. Brand P, Meyer T, Häussermann S, Schulte M, Scheuch G, Bernhard T, Sommerauer B, Weber N, Griese M: Optimal peripheral drug deposition in patients with cystic fibrosis. *J Aerosol Med* 2005 (18); 45-54.
123. Knoch M, Keller M: The customised electronic nebuliser: a new category of liquid aerosol drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2005 (2); 377-390.

9. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Lindemann für die Überlassung des Doktorarbeitsthemas und die verständnisvolle und geduldige Betreuung während meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. Seeger möchte ich danken, dass er es mir ermöglichte, in seinem Surfactantlabor einen Teil der Experimente durchzuführen. Ganz besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Herrn Prof. Dr. A. Günther, der mich bei der Arbeit im Surfactantlabor betreute und auch bei anderen Arbeitsschritten meiner Promotion immer wieder unterstützte und während der „Durststrecken“ ermutigte. Ein Zustandekommen dieser Arbeit wäre ohne seine Kooperation vermutlich nicht denkbar gewesen.

Ferner danke ich den Mitarbeitern des Lungenfunktionslabores der Kinderklinik Gießen, die mich ebenfalls jederzeit unterstützten und motivierten.

Den Mitarbeitern des Genlabors unter Herrn Prof. Dr. Rascher möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung und die Möglichkeit danken, dort einen Teil meiner Experimente durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. App danke ich für die Bestimmung der Elastase- und DNA-Konzentration im Sputum von CF-Patienten.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Medizinstudium und die Promotionsarbeit ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. Simon und Frau Dr. Simon-Oppermann danke ich dafür, dass ich mich wiederholt bei ihnen während meines Urlaubs in der Nähe von Gießen zum Fortführen der Doktorarbeit einquartieren konnte, nachdem ich selbst nicht mehr in Gießen wohnte. Ihnen danke ich auch für die geduldige fachmännische Beratung.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Freunden Dr. Hans Knauf, Dr. Christa Breitfeld, Dr. Annette Baumgart und Annette Greier, die mir während der Jahre meiner Promotion zur Seite standen und mich immer wieder ermutigten.

10. LEBENSLAUF

Name		Annette Bock
Geburtsdatum/-ort		23.01.70 in Marburg
Nationalität		deutsch
Familienstand		ledig
Schulbildung	1976-1980	Alexander-von-Humboldt- Grundschule Eschwege
	1980-1986	Friedrich-Wilhelm-Gymnasium Eschwege
	1986-1989	Oberstufengymnasium Eschwege
Schulabschluß	05/1989	Abitur
Studium	1989-1996	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen und an der Universität Bologna, Italien
	1996	3. Staatsexamen
Promotionsarbeit	1994	unter Prof. Dr. med. Lindemann, Zentrum für Kinderheilkunde, Univer- sität Gießen; Einflüsse auf die Sputum-Deoxyribo- nucleinsäure bei Mukoviszidose (Zys- tische Fibrose)

Beruf

1997-2004	Ausbildung zur Fachärztin in Kinderheilkunde, zuletzt unter Herrn Dr. med. Koch, Allgemeines Krankenhaus Hagen, Kinderklinik
06/2004	Facharztprüfung Kinderheilkunde
07/2004 – 03/2006	Weiterbildung in Neuropädiatrie unter Herrn Dr. med. Pott, DRK-Kinderklinik Siegen
seit 04/2006	Assistenzärztin am Sozialpädiatrischen Zentrum der Kinderklinik des Bethlehem-Krankenhauses Stolberg