Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung: Einführung der Superfusionsmethode zur Verbesserung der Mukoviszidose-Diagnostik

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

vorgelegt von Christian Geidel
aus Gießen

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums 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. A. Günther

Tag der Disputation: 01.04.2008

Gewidmet meiner Familie und Tanja, stellvertretend für alle Mukoviszidose-Patienten.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Allgemeines 1

1.2 Ionentransportstörung am respiratorischen Epithel bei Mukoviszidose 3

1.3 Klinischer Verlauf, Therapieprinzipien und Prognose 5

1.4 Die transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) und weitere elektrophysiologische Messmethoden 7

1.5 Zielsetzung 9

2 Methodik 10

2.1 Pathophysiologische Grundlagen der Potenzialdifferenzmessung 10

2.1.1 Blockade des Natriumeinstroms durch Amilorid..... 12

2.1.2 Unterstützung der Chlorid-Sekretion durch Gabe von Chlorionen freier Amilorid-Lösung (Natrium-Glukonat)..... 13

2.1.3 Unterstützung der Chlorid-Sekretion über CFTR-abhängige Kanäle durch Gabe eines Beta-Sympathomimetikums..... 13

2.2 Material- und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potenzialdifferenzmessung..... 14

2.3 Versuchsanordnung zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz 15

2.4 Herstellung der Agargelbrücken..... 18

2.5 Vorgehen bei der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz 19

2.6 Vorgehen bei den pharmakologischen Tests..... 23

2.6.1 Zusammensetzung des Amilorid-Nasensprays und der Superfusionslösungen 23

2.6.2 Vorgehen bei den pharmakologischen Untersuchungen 25

2.6.2.1 Untersuchungen der Wirkung des Amilorid-Nasensprays..... 25

2.6.2.2 Untersuchungen der PD-Veränderungen durch Amilorid-Superfusion (in chloridhaltigem Puffer) 25

2.6.2.3 Untersuchungen der PD-Veränderungen durch Superfusion von Amilorid in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat)..... 26

2.6.2.4 Untersuchungen der PD-Veränderungen durch Isoproterenol-Superfusion (in chloridfreier Amilorid-Lösung) 26

2.7 Vergleich Sensitivität und Spezifität für die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die PD-Werte nach Amilorid in chloridhaltigem Puffer 29

2.8 Untersuchungskollektive 29

2.9 Statistische Methoden..... 31

3 Ergebnisse..... 33

3.1 Potenzialdifferenz vor und nach Amilorid-Nasenspray..... 33

3.1.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz 33

3.1.2 PD-Werte nach Amilorid-Nasenspray 34

3.1.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD) vor und nach 2 Hub Amilorid-Nasenspray..... 35

3.2 PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion 37

3.2.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz 37

3.2.2 PD-Werte nach Amilorid-Superfusion 37

3.2.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig) 38

3.3 Vergleich der PD- Werte vor und nach 2Hub Amilorid Nasenspray mit den PD-Werten vor und nach Superfusion mit Amilorid 39

3.3.1 Vergleich der Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz 39

3.3.2 Vergleich der PD-Werte nach Amilorid-Nasenspray 0,3% und nach Amilorid Superfusion 0,03% 40

3.4 PD- Werte vor und nach Amilorid-Superfusion sowie nach Verwendung von chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) 41

3.4.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz und nach Superfusion mit Amilorid in chloridhaltigem Puffer 42

3.4.2 PD- Werte nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) 43

3.4.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte vor und nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) 44

3.4.4 Prozentuale Änderung der PD-Werte beiden Superfusionen in Bezug auf die Ausgangswerte 46

3.5 PD- Werte vor und nach Superfusion von Isoproterenol 46

3.5.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz, Werte nach Superfusion mit Amilorid und nach Superfusion von chloridfreiem Puffer 47

3.5.2 PD- Werte nach Superfusion von Isoproterenol 48

3.5.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) vor und nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach chloridfreiem Amilorid 49

3.5.4 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach Amilorid 51

3.5.5 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die Ausgangswerte 52

3.5.6 Übersicht über die PD-Ergebnisse 54

3.6 Sensitivität und Spezifität 55

3.6.1 Sensitivität und Spezifität der Basalwerte 55

3.6.2 Sensitivität und Spezifität für die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol 56

4. Diskussion 57

4.1 Allgemeines zur Potenzialdifferenzmessung 57

4.2 PD-Werte vor und nach Amilorid Nasenspray 57

4.3 Superfusion allgemein 58

4.4 PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig) 60

4.5 PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig) und folgender Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) 62

4.6 Superfusion mit Isoproterenol nach Natrium-Kanalblockade und nach Aktivierung der alternativen Chlorid-Kanäle 63

4.7 Übersicht über die PD-Ergebnisse 64

4.8 Sensitivität und Spezifität der PD-Messung mittels Superfusion 64

4.9 Abschließende Bilanz und Ausblick 65

5 Zusammenfassung 67

6 Summary 69

7 Literaturliste 71

8 Danksagung 86

9 Lebenslauf 87

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Mukoviszidose, auch Cystische Fibrose (CF) genannt, ist mit einer Prävalenz von 1:3000 die häufigste angeborenen Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung in Mitteleuropa und den USA [1, 2]. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt. Man schätzt die Anzahl der heterozygoten Merkmalsträger, die keine Symptome aufweisen, auf ca. 5 % [3].

Das CF Gen, das im Jahre 1989 identifiziert wurde, ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 im Bereich 7q3.1 lokalisiert und besteht aus 27 Exons. Es kodiert ein Protein von 1480 Aminosäuren, das den Namen „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) erhielt. Bei der häufigsten Mutation, Delta F508, die in Europa bei etwa 75-80 % der CF-Patienten vorliegt, fehlen 3 Nukleotide, die für Phenylalanin an der Position 508 des Proteins kodieren [2, 4, 5, 6]. Weitere relativ häufige Mutationen sind R553X, N1303K, G542X, G551D und R347P. Darüber hinaus wurden inzwischen mehr als 1500 verschiedene Mutationen identifiziert, und diese Zahl nimmt ständig zu [7].

Je nach Gendefekt kommt es an verschiedenen Stellen zu Störungen der Proteinsynthese. Deshalb teilt man die CF-Mutationen inzwischen in 6 Defektklassen ein (Abb.1.1) [7, 8, 9].

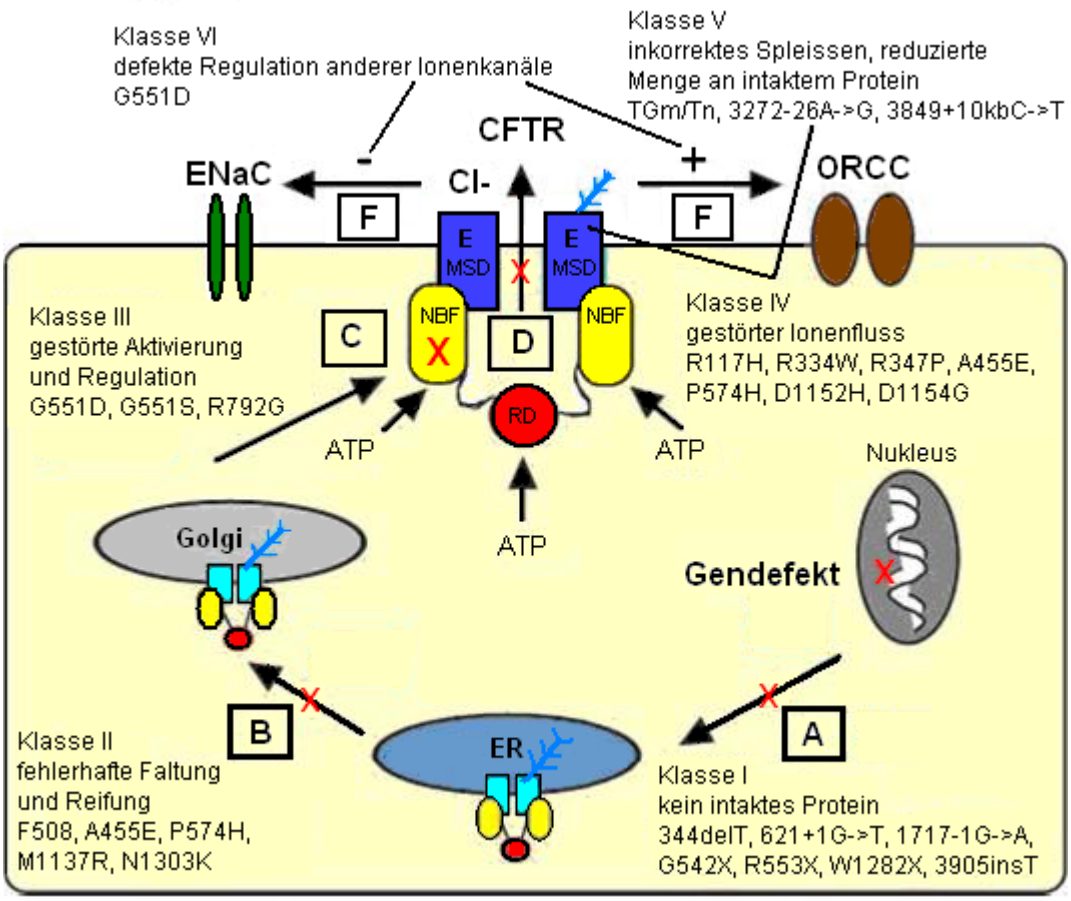


Abb.1.1 : CF-Mutationen mit 6 CFTR-Defektklassen (A bis F) der Synthese bzw. des CFTR-Processing (modif. nach Gallati [10])
CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; ENaC = Epithelialer Natriumionen-Kanal; ORCC = Outwardly Rectifying Chloride Channels; MSD = transmembrane Domänen; NBF Nukleotidbindungsfalten (binden ATP); RD = R-Domäne (die eigentliche Pforte für Chlorionen: Öffnung in phosphoryliertem Zustand, Blockade des Ionenflusses bei fehlender Phosphorylierung); ER = Endoplasmatisches Reticulum

Der Klasse I werden die Mutationen zugeordnet, bei denen kein intaktes Protein vorliegt, z. B. R553X oder G542X. Zur Klasse II zählt man die in Europa mit Abstand häufigste Mutation Delta F508. Hier kommt es zu einer fehlerhaften Faltung und Reifung des Proteins. Defekte der Klasse III weisen eine gestörte Regulation und Aktivierung des CFTR-Komplexes auf; dieser Gruppe ist beispielsweise die Mutation G551D zugeordnet. Gruppe IV weist eine gestörte Ionenleitfähigkeit des CFTR-Kanals auf; Beispiele hierfür sind R117H oder R347P.

Die Störung bei Klasse V liegt in einem inkorrekten Splicing, das für eine deutlich reduzierte Menge an intaktem Protein verantwortlich ist. Klasse VI weist eine defekte Regulation anderer Ionenkanäle auf.
Je nach Mutationsklasse kommt es zu unterschiedlich schweren Verlaufsformen der Mukoviszidose, wobei allerdings bei derselben Mutation eine erhebliche Varianz in der Ausprägung bestehen kann [11, 12].
Folge des defekten CFTR-Proteins ist eine Permeabilitätsstörung von Epithelzellen vieler Organe für Chlorionen wie auch für andere Anionen [13, 14]. Dadurch kann beispielsweise in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen von CF-Patienten - im Gegensatz zu Gesunden - kaum NaCl rückresorbiert werden, was zu einem höheren Verlust an Natrium und Chlorid über den Schweiß führt [15, 16, 17, 18, 19]. Diese hohe NaCl-Konzentration im Schweiß kann mit Hilfe des Schweißtestes (Schweißanalyse mittels Iontophorese nach lokaler Pilocarpin-Stimulation) gemessen werden, grenzwertige Ergebnisse sind aber nicht selten [20, 21, 22].
Zum Repertoire der CF-Diagnostik gehört seit einiger Zeit neben Schweiß- und Genanalyse auch die Potenzialdifferenzmessung an der nasalen Mucosa [23]. Diese Messmethode ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2 Ionentransportstörung am respiratorischen Epithel bei Mukoviszidose

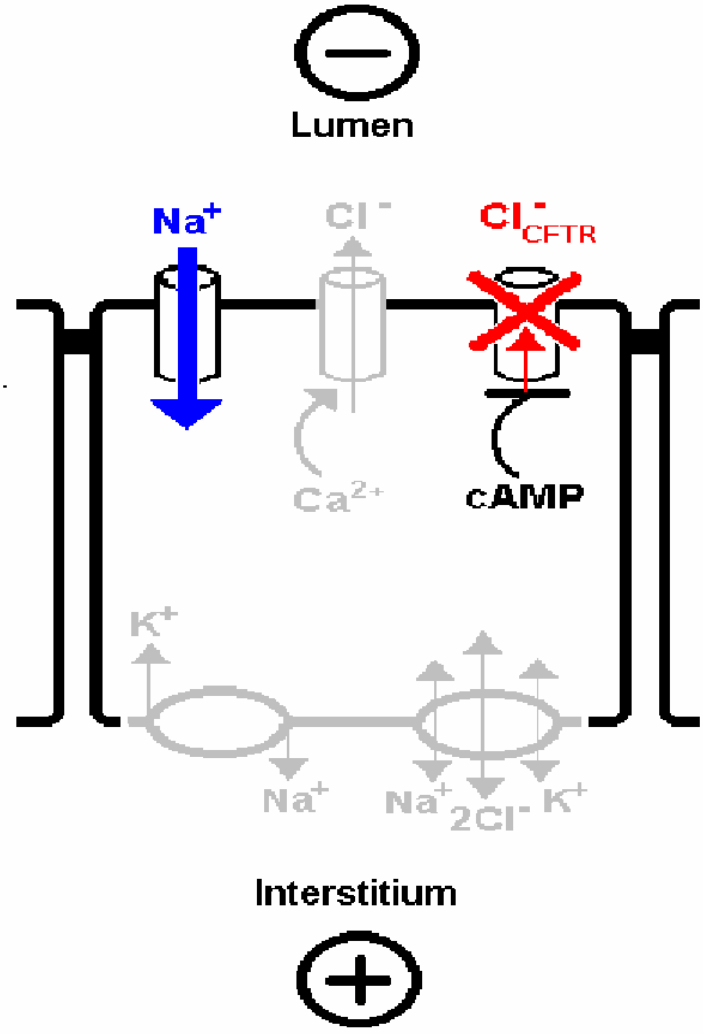
Der Ionentransport durch die Zelle der bronchialen Mucosa ist für die Zusammensetzung des Bronchialsekretes von großer Bedeutung. Er erfolgt über unterschiedliche Transportsysteme.
Bei der Mukoviszidose kommt es - wie bereits erwähnt - zu einer Ionentransport-störung, von der insbesondere die Chlorid- und Natriumkanäle betroffen sind (Abb. 1.2) [24]. Natrium-Ionen werden hauptsächlich aufgrund eines elektrochemischen Gradienten an der luminalen Seite der Mucosazelle aufgenommen und an der

basolateralen Membran mit Hilfe der Na-K-ATPase gegen Kalium ausgetauscht [24, 25, 26]. Der Chloridtransport an der apikalen Membran erfolgt über einen cAMP-regulierten Chloridkanal, der dem Glykoprotein des CFTR-Gens entspricht [27, 28, 29, 30]. Ein zweiter „alternativer“ Weg läuft über die Aktivierung der Calcium-abhängigen Proteinkinase mittels Calcium [25, 26]. Weiterhin gibt es parazelluläre Transportvorgänge, die zum Teil noch strittig sind und deshalb hier nicht näher erläutert werden sollen [18, 24, 31, 32].

Der bei der Mukoviszidose gestörte transepitheliale Natrium- und Chloridtransport wirkt sich verhängnisvoll aus: An der luminalen Membran resultiert eine gestörte Chloridsekretion und konsekutiv eine exzessiv gesteigerte Absorption von Natrium und Wasser. Dies führt wiederum zu einer Viskositätszunahme und Veränderung der Elektrolytkonzentration der Sekrete [13, 18, 24, 25, 32, 33, 34, 35, 36].

Bei der Mukoviszidose sind nach der derzeitigen Lehrmeinung vorrangig die Chloridkanäle betroffen, die per Phosphorylierung der cAMP Moleküle gesteuert werden. Die sogenannten alternativen Kanäle, die Calcium-abhängig sind, sind bei CF-Patienten wie bei Gesunden voll funktionstüchtig. Sie können einen geringen Teil der defekten Chloridsekretion kompensieren, eine vollständige Kompensation ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich (Abb.1.2) [27, 37].

Kürzlich präsentierte Ergebnisse zeigen auch Unterschiede der epithelialen Natrium-Kanäle auf mRNA- und Protein-Ebene [38]. Danach ist die Natrium-Hyperabsorption nicht allein durch den elektrochemischen Gradienten zu erklären, sondern auch durch die Generierung zusätzlicher Natrium-Kanäle. Daraus könnten sich in Zukunft evtl. neue Therapieansätze ergeben.



1.2 Prinzipien der transepithelialen Ionentransportstörung bei Mukoviszidose. (Erläuterungen im Text)

1.3 Klinischer Verlauf, Therapieprinzipien und Prognose

Klinisch führt die beschriebene Ionentransportstörung und daraus resultierende Viskositätszunahme der Sekrete zu einer Funktionsstörung, vor allem von Lunge und Pankreas:

Durch das zähe Sekret werden die Ausführungsgänge des Pankreas obturiert, die

Drüse zerstört, und es resultiert eine exokrine Pankreasinsuffizienz.
Im Respirationstrakt kommt es zu einer Sekretretention, die mukoziliäre Clearance ist deutlich herabgesetzt. Die Folge ist eine Kolonisation mit Krankheitserregern wie Staphylokokkus aureus, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa und Problemkeimen wie Burkholderia cepacia [7]. Rezidivierende Infektionen verursachen erhebliche Schädigungen des Lungengewebes; die Folge sind fibrosierende und atelektatische Bezirke sowie Bronchiektasen. Im Spätstadium entwickelt sich eine respiratorische Insuffizienz mit allen Begleiterscheinungen [7, 39].
Eine kausale Therapie der bronchopulmonalen Manifestation der Mukoviszidose steht bislang nicht zur Verfügung. Grundpfeiler des aktuell durchgeführten Therapie-Regimes sind die Sekretelimination mittels Physiotherapie und eine konsequent durchzuführende Inhalationstherapie. Atemwegsinfektionen sollten möglichst frühzeitig gezielt antibiotisch behandelt werden [7].
Viele CF-Patienten leiden zudem unter einer bronchialen Hyperreagibilität, der ein Asthma bronchiale, eine allergische bronchopulmonale Aspergillose oder eine Atemwegsinfektion zu Grunde liegen kann. Neben den inhalativen Glukokortikoiden haben sich zur antiobstruktiven Therapie Bronchodilatatoren bewährt, hierbei sind auch Anticholinergika gut geeignet. Das langwirksame Anticholinergikum Tiotropiumbromid, das neuerdings zur inhalativen Applikation zur Verfügung steht, aktiviert bei CF-Patienten zudem die eventuell vorhandene Restfunktion der Chloridkanäle langfristig, ohne dass das Risiko einer Toleranzentwicklung besteht [40].
Neben der Therapie der bronchopulmonalen Manifestation ist weiterhin auf eine ausreichende Kalorien- und Vitaminzufuhr zu achten. Bei bestehender Pankreasinsuffizienz ist eine angemessene Enzymsubstitution mit säurefesten Präparaten erforderlich, die eine fettreiche Ernährung möglich macht [7].

Die Prognose für CF-Patienten hat sich in den letzten Jahren erheblich verbessert. So kann man davon ausgehen, dass ein heute geborener Patient inzwischen eine

mittlere Lebenserwartung von etwa 40 Jahren hat. Dies ist zum einen mit den oben beschriebenen verbesserten Behandlungsmöglichkeiten zu erklären. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist ein umfassendes Versorgungskonzept, das eine engmaschige intensive Betreuung der Patienten beinhaltet [7, 39, 41]. Voraussetzung dafür ist ein Team aus kompetenten Ärzten, Pflegepersonal, Ernährungsberatern bzw. Ökotrophologen, Physio- und Familientherapeuten sowie eine gute psychosoziale Betreuung.

1.4 Die transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) und weitere elektrophysiologische Messmethoden

Wie bereits erwähnt erfolgt die Regulation des Flüssigkeitshaushaltes am respiratorischen Epithel (wie auch an anderen Epithelien) über aktive und passive Ionentransportsysteme. Durch diese Ionentransportvorgänge entsteht eine messbare Spannung, die sogenannte transepitheliale Potenzialdifferenz. Sie wird in Millivolt (mV) gemessen und ist in Bezug auf die Submukosa lumennegativ (vgl. Abb.1.2) [23, 32, 42, 43, 44].

Die Potenzialdifferenz kann in vivo am besten am respiratorischen Epithel der Nase unterhalb der Concha nasalis inferior gemessen werden.

Die Aktivierung über die cAMP-gesteuerte Signalübermittlung führt bei Gesunden nach Natriumkanalblockade zur Stimulation der Chlorid-Sekretion und damit zur Zunahme der Lumen-negativen Potenzialdifferenz. Bei CF-Patienten bleibt dieser Effekt typischerweise aus (siehe Abb.2.7). Damit erschließt sich der Zugang zu einer präziseren Information über eine eventuell bestehende Ionentransportstörung, als sie mit der Messung der basalen PD möglich ist.

In analoger Weise werden am intestinalen Epithel der Rektumschleimhaut in vitro Messungen in einer modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt [45]. Neben der transepithelialen Potenzialdifferenz kann dabei der transepitheliale Widerstand

gemessen, und daraus der sog. äquivalente Kurzschlussstrom ermittelt werden. Die Entnahme von oberflächlichen, etwa 2 - 3 mm großen Rektumschleimhautbiopsien erfolgt rektoskopisch kontrolliert aus intakter Mucosa. Die Untersuchung kann problemlos in jeder Altersklasse, auch im Säuglings- und frühen Kindesalter, ggf. unter Sedierung, durchgeführt werden. Die Entnahme des Biopsates ist nicht schmerzhaft, da das Rektum nicht mit Schmerzfasern innerviert wird [46].

Die Indikation zu diesen weiterführenden elektrophysiologischen Untersuchungen ergibt sich, wenn die Diagnose bei klinischem Verdacht auf eine CF nach gebräuchlicher Diagnostik nicht eindeutig bestätigt oder verworfen werden kann. Da es sich sowohl bei der nasalen Potenzialdifferenzmessung als auch bei der Kurzschlussstrommessung in Rektumschleimhautbiopsien um technisch und personell aufwändige Untersuchungen handelt, werden diese nur an wenigen entsprechend ausgestatteten Zentren durchgeführt.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft und Ergänzung der Methodik zur Bestimmung der transepithelialen Potenzialdifferenz.

1) Zunächst sollte am Beispiel des Natriumkanalblockers Amilorid geklärt werden, ob sich durch eine gezielte Applikation von Medikamenten an den Messort mittels Superfusion die Aussagekraft der Potenzialdifferenzmessung gegenüber der Applikation mittels Nasenspray verbessern lässt.

2) Es sollte zudem untersucht werden, welcher Nutzen (unter Natrium-Kanal-Blockade) aus der Stimulation der CFTR-unabhängigen Chloridkanäle mit Hilfe einer chloridfreien Lösung gezogen werden kann.

3) Ferner sollte untersucht werden, inwieweit durch die direkte Stimulation des CFTR-abhängigen Chloridkanals über cAMP mit einem ß-Mimetikum ein diagnostischer Fortschritt zu erzielen ist.

2 Methodik

2.1 Pathophysiologische Grundlagen der Potenzialdifferenzmessung

Die Spannung, die bei der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung gemessen wird, resultiert aus Ionentransportvorgängen, die zum einen aktiv, zum anderen passiv über die Zellen ablaufen.
Im Rahmen früherer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Submukosa der gesamten Luftwegsepithelien isoelektrisch mit der Subkutis ist [47, 48]. Daher ist es möglich, die Referenz der transepithelialen Potenzialdifferenz subkutan von einer gut zugänglichen Stelle des menschlichen Körpers abzugreifen (vgl. Abb. 2.2).
Die ersten in-vivo-Messungen der Potenzialdifferenz am respiratorischen Epithel des Menschen wurden von der Arbeitsgruppe um *Knowles* vorgenommen [49, 50]. Früh erkannte man, dass am Flimmerepithel von Probanden ohne CF eine deutlich niedrigere PD zu messen war als bei Mukoviszidose-Patienten. Dafür wird die bei CF-Patienten zuvor beschriebene exzessiv gesteigerte Natrium-Absorption verantwortlich gemacht. Der Verlust von positiven Valenzen auf der luminalen Seite führt zu einer größeren Negativierung der PD-Werte im Vergleich zum Interstitium, als es bei Nicht-CF-Probanden der Fall ist, d.h. die Messwerte von Mukoviszidose-Patienten sind stärker negativ als die von Probanden ohne CF. *Knowles* beschreibt eine direkte Korrelation zwischen der Natrium-Absorption in die Zelle und einer erhöhten Potenzialdifferenz [50]. Durch die bei der Mukoviszidose genetisch determinierte Ionentransportstörung und die damit verbundene unterschiedliche Zusammensetzung des luminalen Sekretes ist somit eine diagnostische Unterscheidung zwischen CF-Patienten und Probanden ohne CF mit der PD-Messung grundsätzlich möglich [25, 26].
Die heutigen Vorstellungen über die Ionentransportvorgänge am respiratorischen Epithel von Mukoviszidose-Patienten sowie von Probanden ohne CF wurden in

Kapitel 1.2 bereits ausführlich dargestellt (vgl. Abb. 1.2).
Die verschiedenen Ionenkanäle bieten unterschiedliche Ansätze, die Potenzialdifferenz des respiratorischen Epithels pharmakologisch zu beeinflussen (vgl. Abb. 2.1). Die wichtigsten Möglichkeiten, die PD und damit die Ionenzusammensetzung zu verändern, werden nachfolgend im Einzelnen besprochen.

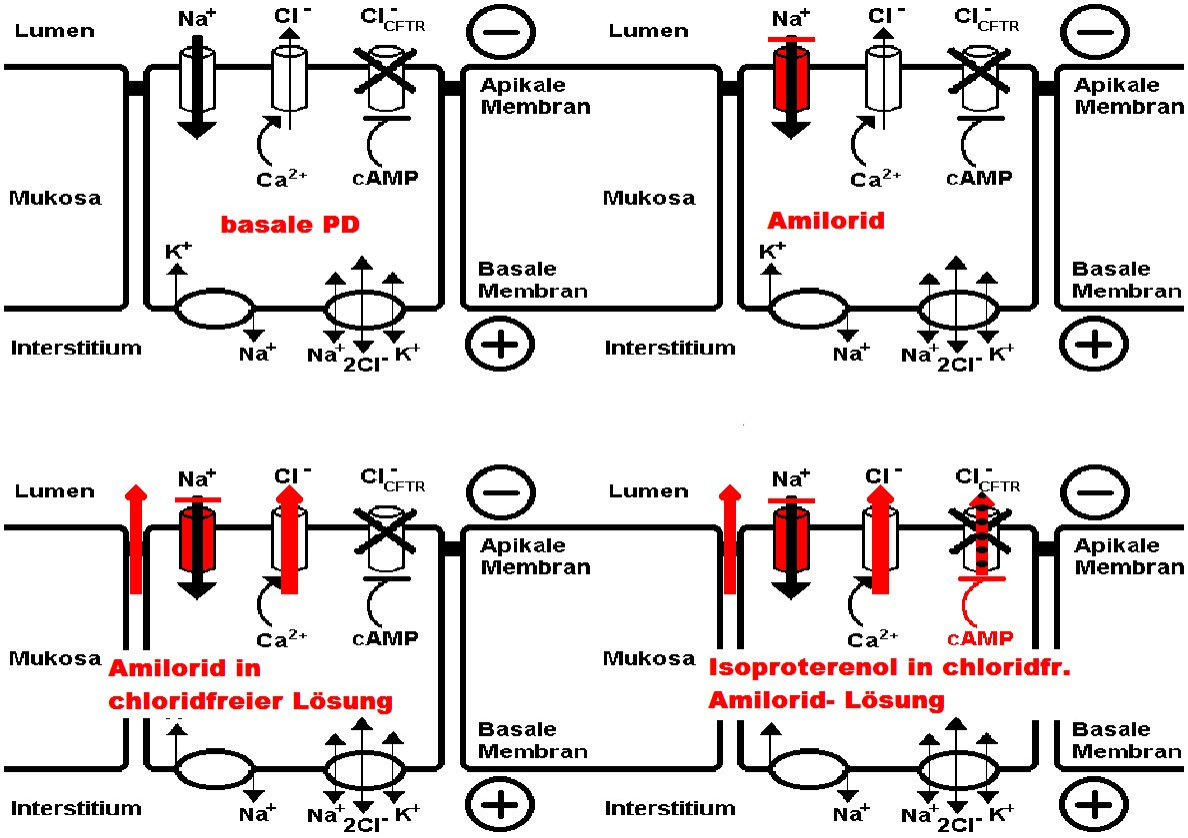


Abb. 2.1 Ansätze zur medikamentösen Beeinflussung der Potenzialdifferenz (PD):
Oben links: Grundlagen der Ausgangsmessung der PD
Oben rechts: Inhibition der gesteigerten Natrium-Absorption mittels Amilorid
Unten links: Unterstützung der Chlorid-Sekretion über Calcium-abhängige, „alternative" Chlorionenkanäle durch chloridfreie Amilorid-Lösung
Unten rechts: Stimulation der CFTR-abhängigen Chloridkanäle durch Isoproterenol

2.1.1 Blockade des Natriumeinstroms durch Amilorid

Eine seit längerem bekannte Möglichkeit der Beeinflussung der Ionenströme besteht in der Inhibition der Natriumkanäle. Natriumkanal-blockierende Substanzen hemmen selektiv den Einstrom von Natrium-Ionen in die Epithelzellen, beispielsweise nach nasaler, inhalativer oder rektaler Applikation [51, 52, 53, 54, 55, 56]. Damit wird den für Mukoviszidose typischen Ionentransportstörungen, die sich am respiratorischen Epithel neben der Hemmung der Chlorionen-Sekretion vor allem in Form einer gesteigerten Natrium-Absorption bemerkbar machen, entgegengewirkt [25, 26, 49]. Durch das Verbleiben der Natrium-Ionen auf der luminalen Seite des Flimmerepithels kommt es zu einer Erhöhung der positiven Ladung in diesem Bereich, was eine Verringerung der PD zur Folge hat [57, 58].

Für die klinische Anwendung ist zurzeit nur Amilorid zugelassen. Chemisch handelt es sich um N-amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-carboxamid, es gehört somit zu den Cycloamidinen. Amilorid blockiert den Natrium-Kanal schnell und reversibel, wobei seine Affinität zu diesen Kanälen eher gering ausgeprägt ist (s. u.). Amilorid und Natrium wirken am Natrium-Kanal wie schnelle Kompetitoren [51]. Der genaue Blockierungsmechanismus und die exakte Bindungsstelle für Amilorid sind jedoch noch unaufgeklärt. Wie bereits erwähnt, kommt es nach inhalativer Applikation von Amilorid zu einer Absenkung der PD-Werte [59]. Dieser Effekt kann sowohl bei Mukoviszidose-Patienten, als auch bei Probanden ohne CF beobachtet werden.

2.1.2 Unterstützung der Chlorid-Sekretion durch Gabe von Chlorionen freier Amilorid-Lösung (Natrium-Glukonat)

Neben den CFTR-abhängigen Chlorionenkanälen existieren Calcium-abhängige, „alternative“ Chlorionenkanäle, die im Rahmen der elektrophysiologischen Diagnostik mittels chloridfreier Lösung überprüft werden können [60]. Es kommt durch das Fehlen von Chlor außerhalb der Zelle zu einem passiven Ausstrom von Chlorionen.
Durch die lokale Applikation von aerosoliertem UTP (Uridintriphosphat) und ATP (Adenosintriphosphat) kann eine vorübergehende apikale Chlorid-Sekretion an diesen Calcium-regulierten Ionenkanälen über die Aktivierung von purinergen Rezeptoren induziert werden.

2.1.3 Unterstützung der Chlorid-Sekretion über CFTR-abhängige Kanäle durch Gabe eines Beta-Sympathomimetikums

Durch Gabe eines ß-Mimetikums lässt sich bei Probanden ohne CF über die Aktivierung der Adenylatzyklase und des zyklischen Adenosinmonophosphates eine Stimulation der Chlorid-Sekretion erzielen [26, 31, 61], wodurch es zur Erhöhung der PD-Werte kommt. Bei Mukoviszidose-Patienten gelingt eine Öffnung dieser Kanäle durch diese Medikamentengruppe in der Regel jedoch nicht [62, 63].
Allerdings lässt sich in vitro durch das Isolieren der Epithelzellen aus dem Zellverband und eine Depolarisation des Zellmaterials eine Öffnung der von zyklischem Adenosinmonophosphat abhängigen Chloridkanäle bewirken [64, 65, 66].

2.2 Material- und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potenzialdifferenzmessung

Folgende Materialien und Zubehör wurden zum Aufbau und zur Durchführung der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung verwendet:

- Millivoltmeter der Wissenschaftlichen-Technischen Werkstätten GmbH, WTW PH 530, Weilheim
- 2 Silberchlorid-Elektroden: Standardbezugselektrode Typ 373 von Ingold GmbH, PH-Messtechnik, Steinbach i. Taunus
- 2 Infusionspumpen, Typ Injektomat der Firma Fresenius
- 50 ml Injektomat-Spritzen
- Injektomat-Leitungssysteme
- 3-Wege-Hähne
- bakteriendichte Filter (Medex, 2µm)
- Venenverweilkanüle, Typ Surflo 24G
- Teflonschläuche (0,5mm Innendurchmesser) auf Kanüle 26G (0,45 x 13mm)
- 2 Agargelbrücken in Plastikschläuchen, gefüllt mit isotonischer Kochsalzlösung in Hochagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Agargelbrücken in U-förmigen Glasröhrchen, gefüllt mit 3-molarer KCl-Lösung in Hochagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Erlenmeyerkolben (Weithals) 200 ml mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllt, passende Kautschukstopfen mit Bohrungen
- 100 ml-Fläschchen isotonischer Kochsalzlösung
- Pflaster zur Fixierung der Verweilkanüle
- Kaltlichtquelle der Firma Storz, Typ 559
- Glasfaserkabel der Firma Storz
- Konnektierbares Nasenspekulum mit Fiberglas-Lichtträger, 13,5 cm
- Nasenspekulum nach HALLE-TIECK für Kleinkinder, 13 cm

- Augenärztliches Untersuchungsgestell höhenverstellbar
- PC
- Daisylab© Software zur Registrierung der Spannungskurve
- Drucker HP-Deskjet 660C

2.3 Versuchsanordnung zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz

Die Messeinheit bestand aus einem hochohmigen Millivoltmeter (mV), das über einen seriellen Ausgang mit einer Database verbunden wurde. Diese machte die ausgegebenen Daten für die Datenbearbeitungssoftware „Daisylab“ zugänglich, die eine Speicherung und spätere Auswertung der Daten ermöglichte. Das Voltmeter wurde mit zwei Silberchloridelektroden (AgCl) verkabelt, die in zwei mit 3-molarer Kaliumchlorid (KCl)-Lösung gefüllte Erlenmeyerkolben eingetaucht wurden. Diese Silberchloridelektroden wurden als Mess- und Referenzelektrode verwendet. Die Kolben wurden mit Hilfe von verdunstungsdichten Kunstoffstopfen, die über vorgebohrte Öffnungen für die Elektroden verfügten, verschlossen. Zwei U-förmig gebogene Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von je 5 mm, wurden mit Agargel gefüllt. Jeweils ein Schenkel wurde in die beiden Erlenmeyerkolben eingeführt, der zweite Schenkel, der mit 3-molarer KCl-Lösung angesetzten Agargelbrücken, mündete jeweils in einem 100 ml Fläschchen mit isotonischer Kochsalzlösung (Abb. 2.2 und 2.3). Diese beiden zum Versuchsaufbau gehörenden Fläschchen enthielten ferner je eine zweite mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Agargelbrücke (mit Hochagar befüllte Kunststoffschläuche), deren Enden mit dem Seitenanschluss je eines 3-Wege-Hahns gekoppelt wurden. An die zuführenden Schenkel der Hähne wurde von 50 ml-Injektomatspritzen über zwischengeschaltete Schläuche isotonische Kochsalzlösung geleitet. Das Ende der Schläuche wurde, entsprechend dem

Verwendungszweck, entweder mit der Seite der Messelektrode oder derjenigen der Referenzelektrode konnektiert.
Die abführenden Schenkel der 3-Wege-Hähne wurden auf Seiten der Messelektrode über eine Perfusorleitung mit einer Kanüle G26 sowie mit einem extrem dünnen Teflonschlauch (Innendurchmesser 0,5mm) verbunden und auf Referenzseite mit einer kleinkalibrigen Venenverweilkanüle (Surflo 24G) konnektiert. Zwischen der zuführenden Perfusorleitung auf Messseite und dem Teflon-Messkatheter wurden nach der Messung der Basalwerte drei 3-Wege-Hähne eingebracht, über welche die Superfusionslösungen während der Messung zugeschaltet werden konnten. Hierbei wurden von distal nach proximal die folgenden Lösungen angeschlossen:
1. Amilorid,
2. Amilorid in chloridfreiem Puffer,
3. Amilorid in chloridfreiem Puffer + Isoproterenol.
Es wurde streng darauf geachtet, dass keine der Lösungen schon vorher in die 3-Wege-Hähne gelangen konnte.
Die Lösungen wurden über Injektomaten per 50ml Injektomat-Spritzen mit einer Geschwindigkeit von 100ml/h perfundiert. Die Verschaltung und Anordnung der Gelbrücken, Lösungen und Elektroden geht in dieser Form auf die Arbeitsgruppe um *Boucher* zurück [67]. Sie wurde um die Datenverarbeitung mittels Computer und Datashuttle sowie Daisylab-Software erweitert (Abb. 2.2 und 2.3).

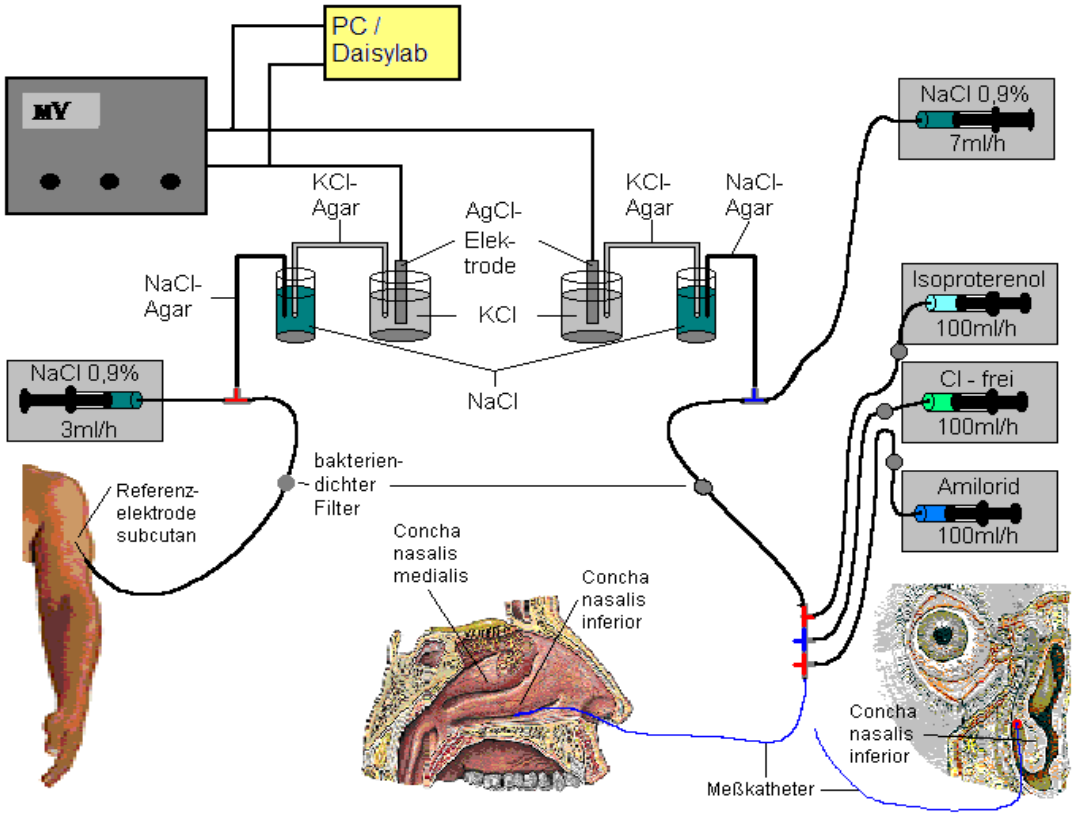


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbau zur transepithelialen Potenzialdifferenz-Messung (PD) mit Superfusion (Erläuterungen im Text)

Abbildung 2.3: Geräteaufbau zur transepithelialen Potenzialdifferenz-Messung (PD) im PD-Labor der Universitäts-Kinderklinik Gießen

2.4 Herstellung der Agargelbrücken

Zur Herstellung der Gelbrücken wird zunächst herkömmlicher Kochagar im Mikrowellenherd erhitzt und dann zu jeweils gleichen Teilen mit 3-molarer KCl-Lösung bzw. physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Diese Gemische werden in die U-förmigen Glasrohre bzw. die Plastikschläuche gefüllt. Während der Erkaltungsphase von 24 Stunden wurden die Schläuche in die jeweiligen

Elektrolytlösungen gelegt, um sie völlig aufzusättigen. Zur Funktionsüberprüfung werden die Agargelbrücken in die Erlenmeyerkolben getaucht und miteinander verbunden. Zeigt das Voltmeter bei diesem Kurzschluss 0 mV an, wird von korrekter Leitfähigkeit ausgegangen. Wird eine Spannung angezeigt, so ist anzunehmen, dass Risse bzw. Luftblasen in den Gelbrücken vorliegen, die zu einer Verminderung der Leitfähigkeit führen. Die Herstellung der Gelbrücken geht auf eine Freiburger Arbeitsgruppe zurück [68].

2.5 Vorgehen bei der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz

Den Probanden/Patienten und Angehörigen wurde der theoretische Hintergrund der Messung ihrem Alter entsprechend mit Hilfe von Bildern und Skizzen erklärt. Explizit wurde – nach Information über die Zustimmung der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität - auf die Freiwilligkeit der Teilnahme hingewiesen und das Einverständnis seitens des Patienten bzw. dessen Eltern eingeholt.
Anschließend erfolgte nach Hautdesinfektion die subkutane Platzierung einer kleinkalibrigen Venenverweilkanüle (Surflo 24G) im Bereich der Außenseite des linken Oberarmes [50]. Nach Entfernung der Nadel wurde sie mit Pflaster fixiert. Diese Venenverweilkanüle diente als Anschluss für die Injektomatleitung, welche zur Referenzelektrode führte.
Vor dem Anschluss der Perfusorleitung für die Referenzelektrode an den Katheter wurde ein Kurzschluss zwischen den Perfusorleitungen der Mess- und Referenzelektrode hergestellt. Dabei sollte die Anzeige des Millivoltmeters keine Spannung anzeigen („Nullabgleich“). Es wurde von der Funktionstüchtigkeit der Elektroden ausgegangen, wenn die Werte zwischen -1mV und +1mV lagen. Im Falle größerer Schwankungen wurde nach Luftblasen im System gesucht bzw. die Unversehrtheit der Gelbrücken überprüft.
Für die Messung wurde die Venenverweilkanüle nach luftblasenfreier Befüllung

(NaCl 0,9%) mit der Perfusorleitung verbunden und die Injektomatpumpe mit einer Fördergeschwindigkeit von 3ml/Stunde gestartet. Auf die Perfusorleitung der Messelektrode wurde mittels Luer-Lock eine dünne Kanüle gesetzt, die sich in einem dünnen Teflon-Schlauch fortsetzte, welcher als Messkatheter diente. Der Schlauch an der Messelektrode wurde ebenfalls mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt, die dazugehörige Injektomatpumpe wurde mit der Förderleistung von 7ml/h gestartet. Die Unterschiede in den Förderleistungen erklären sich mit der größeren Länge, den unterschiedlichen Querschnitten an Referenz- und Messelektrode und der durch den höheren Fluss schneller transportierten Superfusionslösung [69, 70]. Durch Anlegen der Messelektrode auf eine mit NaCl 0,9% befeuchtete Stelle des Unterarms wurde schließlich das gesamte System auf Luftblasenfreiheit überprüft, da nur dann eine Spannungsdifferenz abgelesen werden konnte.
Danach begann die eigentliche Messung:
Hierzu platzierte der Patient sein Kinn auf die an einem Tisch befestigte Kinnstütze, die von einem augenärztlichen Untersuchungstisch stammte, um eine möglichst ruhige Kopfhaltung zu erreichen. Die Kopfstellung war für die Messung der PD-Basalwerte leicht rekliniert. Der Versuchsaufbau erlaubte dem Untersucher, den Kopf des Patienten ebenso wie das Voltmeter im Blickfeld zu haben (Abb. 2.4).

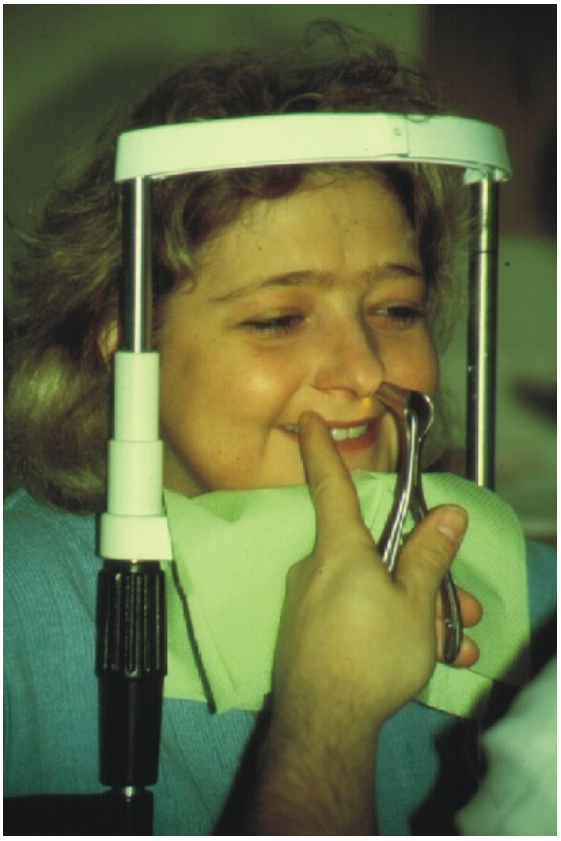


Abbildung 2.4: Höhenverstellbare Kinnstütze eines augenärztlichen Untersuchungstisches zur Gewährleistung einer ruhigen Kopfhaltung (PD-Labor der Universitäts-Kinderklinik Gießen)

Mit dem an eine Kaltlichtquelle angeschlossenem Nasenspekulum spreizte der Untersucher das Vestibulum nasi und verschaffte sich einen ersten anatomischen Überblick. Die Kaltlichtquelle war so eingestellt, dass die untere Nasenmuschel gut ausgeleuchtet wurde. Zur PD-Messung wurde die Messelektrode unter die untere Nasenmuschel geschoben und unter ständigem Kontakt mit der Schleimhaut so lange an deren Dach entlang geschoben, bis der Maximalwert der PD abzulesen war. Vom Epithel unter der unteren Nasenmuschel ist bekannt, dass es morphologisch mit dem Flimmerepithel der Lunge vergleichbar ist und dass sein Biopotenzial dem der unteren Atemwege weitgehend entspricht, somit bei CF-Patienten den Basisdefekt der Mukoviszidose repräsentiert [32, 47]. Der Ort der maximalen PD befand sich meist ca. 3-4 cm von der Öffnung der Nase

entfernt und war für den Untersucher nicht direkt einsehbar (vgl. Abb. 2.5).
Ziel der Messungen war es, den Maximalwert über mindestens 5 s konstant zu halten, um möglichst verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Der erwartete Bereich der Messwerte liegt bei dieser Methode zwischen –100 und 0 mV. Wichen die Ergebnisse eines Probanden in der vorliegenden Untersuchung davon ab, so war davon auszugehen, dass sich entweder Luftblasen im System befanden oder die Messelektrode den Kontakt zur Nasenschleimhaut verloren hatte. Es wurden jeweils zwei Messungen in jeder Nasenöffnung durchgeführt, wobei der Mittelwert aus den beiden Messungen als Basalwert registriert wurde. Ziel der zweiten Messung in der jeweiligen Nasenöffnung war es, den Maximalwert der ersten Messung möglichst gut zu reproduzieren. Gelang dies nicht, wurden weitere Messungen vorgenommen, bis ein Messergebnis reproduziert werden konnte. Die Dokumentation einer PD-Messung (Basalwerte) bei einem CF-Patienten mittels Daisylab ist exemplarisch in Abb. 2.6 dargestellt.

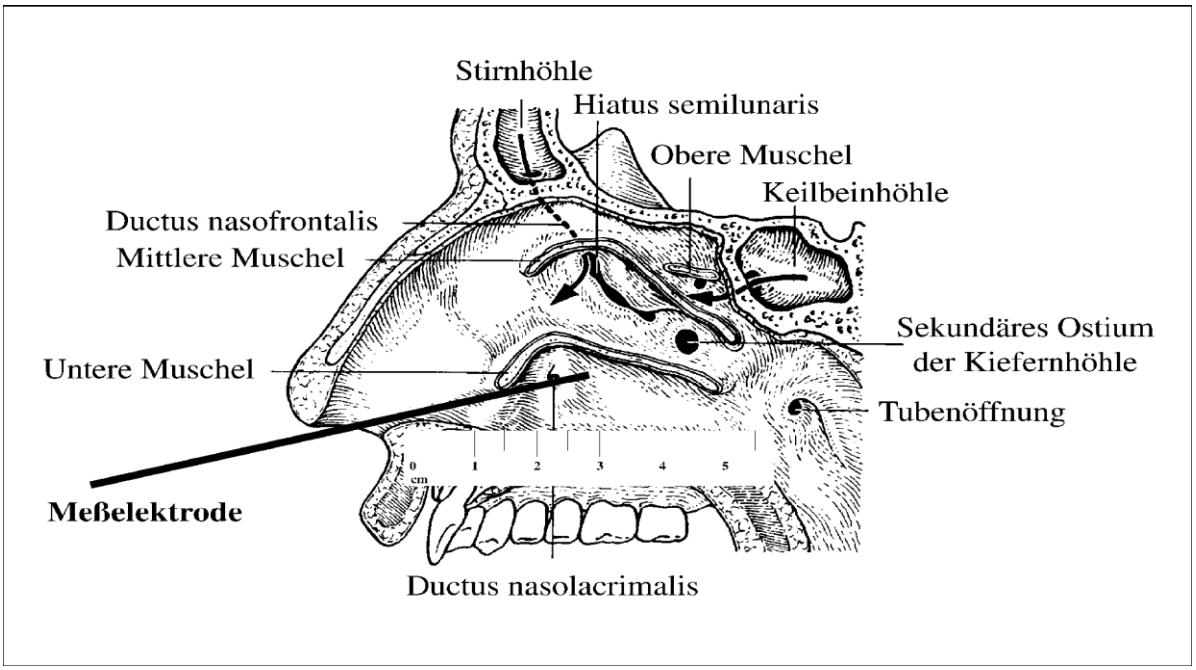


Abb. 2.5: Skizze zur Lage der Messelektrode unterhalb der unteren Nasenmuschel mit Darstellung der Größenverhältnisse. Abbildung modifiziert nach H.G. Boenninghaus [71].

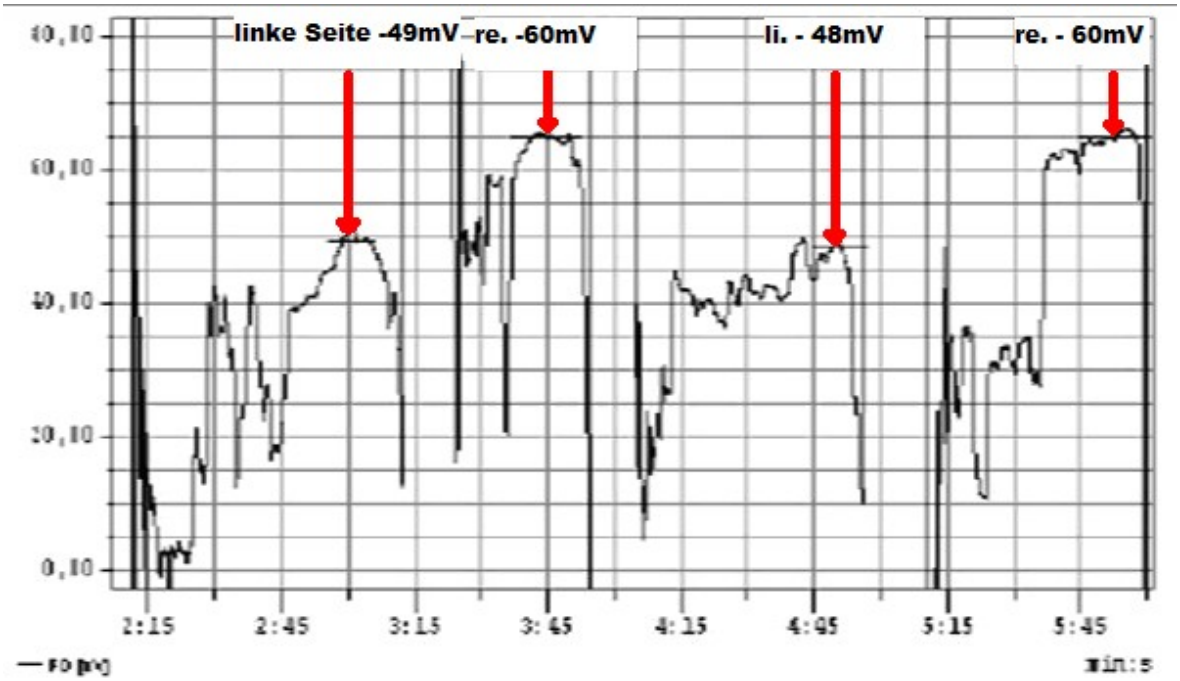


Abb. 2.6: Exemplarische Dokumentation einer nasalen PD-Messung bei einem CF-Patienten (S.H. 23 J.) mittels „Daisylab“ wie in Abb. 2.2. Auswertung der Maximalwerte: Linke Seite: -49 mV, -48 mV; rechte Seite: -60 mV, -60 mV

2.6 Vorgehen bei den pharmakologischen Tests

2.6.1 Zusammensetzung des Amilorid-Nasensprays und der Superfusionslösungen

Zur Durchführung der pharmakologischen Tests wurden folgende Lösungen verwendet (Tab. 2.1):

- Amilorid in isotonischer Kochsalzlösung: 0,3 mg / ml verabreicht als Nasenspray

- Superfusionslösungen:
  1. Amilorid-Lösung in chloridhaltigem KBR-Puffer
  2. Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer
  3. Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer unter Zusatz von Isoproterenol

Tabelle 2.1 Verwendete Superfusionslösungen:

1. Amiloridlösung in chloridhaltigem KBR-Puffer (1000 ml)	**2. Amiloridlösung in chloridfreiem Puffer (1000 ml)**	**3. Amiloridlösung in chloridfreiem Puffer + Isoproterenol (1000 ml)**
K_2HPO_4 418 mg KH_2PO_4 55 mg NaCl 6,721 g Na CO_3 2,10 g $MgCl_2$ 244 mg $CaCl_2$ 133 mg Amilorid 10^{-4} Mol = 30 mg =0,03 mg / ml = 0,003 %	K_2HPO_4 418 mg KH_2PO_4 55 mg Na-Glukonat 25,081 g Na CO_3 2,10 g $MgSO_4$ 296 mg Ca-Glukonat 533 mg Amilorid 10^{-4} Mol=30 mg	K_2HPO_4 418 mg KH_2PO_4 55 mg Na-Glukonat 25,081 g Na CO_3 2,10 g $MgSO_4$ 296 mg Ca-Glukonat 533 mg Amilorid 10^{-4} Mol = 30 mg Isoproterenol 10^{-5} Mol

Die zum Ansetzen der Lösungen verwendeten Stammlösungen wurden nach deren Herstellung steril filtriert. Herstellung und Filtration erfolgten in der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen.

Amilorid ist lichtempfindlich und zerfällt bei längerer Aufbewahrung in elektrolythaltigen Puffern. Wie Messungen im HPLC-Labor des Zentrums für Kinderheilkunde der Universität zeigten, ist Amilorid in Aqua dest. über zwei Jahre stabil. Nach eigenen Messungen sind alle hier benutzten Lösungen außer Isoproterenol in der Perfusorspritze mindestens über eine Woche stabil. Das Isoproterenol wurde deshalb täglich frisch zur chloridfreien Amiloridlösung hinzugemischt.

2.6.2 Vorgehen bei den pharmakologischen Untersuchungen

2.6.2.1 Untersuchungen der Wirkung des Amilorid-Nasensprays

Für die Untersuchung der Wirkung des Amilorid-Nasensprays wurde die in der Therapie normalerweise eingesetzte Konzentration von 0,3 mg / ml (= 0,3 %) gewählt [72].
Unmittelbar nachdem mit dem oben beschriebenen Verfahren bei allen Probanden die Ausgangswerte der Potenzialdifferenz bestimmt worden waren, wurden vom Untersucher 2 Sprühstöße (Hub) á 0,15 ml (entsprechend eine Gesamtdosis von 0,09 mg) Nasenspray mittels herkömmlichem Sprühkopf in die Nase der Probanden/Patienten eingebracht. Dabei wurde sorgfältig auf eine vertikale Position des Lösungsbehälters geachtet. Nach einem Intervall von 2 Minuten wurden die PD-Werte erneut zweimal an beiden Nasenöffnungen gemessen und der Mittelwert aus beiden Messungen protokolliert.

2.6.2.2 Untersuchungen der PD-Veränderungen durch Amilorid-Superfusion (in chloridhaltigem Puffer)

Vor der Fortführung der Messungen wurden über die oben beschriebenen 3-Wege-Hähne die Perfusoren mit den Pharmaka zwischen Messkatheter und Injektomatleitung platziert.
Der weitere Messvorgang entsprach dem der Grundmessung. Nachdem der Messkatheter an der richtigen Stelle positioniert wurde, wurde der Patient aufgefordert, den Kopf leicht nach vorne zu beugen. Dadurch konnte verhindert werden, dass die im Anschluss applizierte Lösung geschluckt wurde. Anschließend wurde der Dreiwegehahn geöffnet und für drei Minuten

Amiloridlösung mit 100ml/h perfundiert. Die im Vergleich zum Nasenspray um eine Zehner-Potenz niedrigere Amilorid-Konzentration ergibt bei dieser Perfusionsgeschwindigkeit und -dauer eine applizierte Dosis von 0,15 mg. Die höhere Dosis wurde gewählt, um eine möglichst vollständige Natriumkanal-Blockade zu erreichen. Diese Gesamt-Dosis lässt eine diuretische Wirkung nicht erwarten, da die Lösung sofort wieder aus der Nase läuft und bei Erwachsenen orale Tagesdosen von 5 - 10 mg angewandt werden, um eine diuretische Wirkung zu erzielen [73]. Nach drei Minuten wurde der zuführende 3-Wege-Hahn geschlossen und der PD-Wert am Voltmeter abgelesen.

2.6.2.3 Untersuchungen der PD-Veränderungen durch Superfusion von Amilorid in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat)

Analog wurde die chloridfreie Lösung appliziert und das Ergebnis registriert.

2.6.2.4 Untersuchungen der PD-Veränderungen durch Isoproterenol-Superfusion (in chloridfreier Amilorid-Lösung)

Wie bei den vorangegangenen Messungen wurde die Isoproterenol-Lösung appliziert und das Ergebnis registriert.
Mit Hilfe einer speziell erarbeiteten Software konnte der Kurvenverlauf zeitgleich mit der Messung aufgezeichnet werden. Es ergaben sich für CF-Patienten und Probanden ohne CF (Non-CF) typische Kurvenverläufe, die in Abbildung 2.7 und 2.8 dargestellt sind.

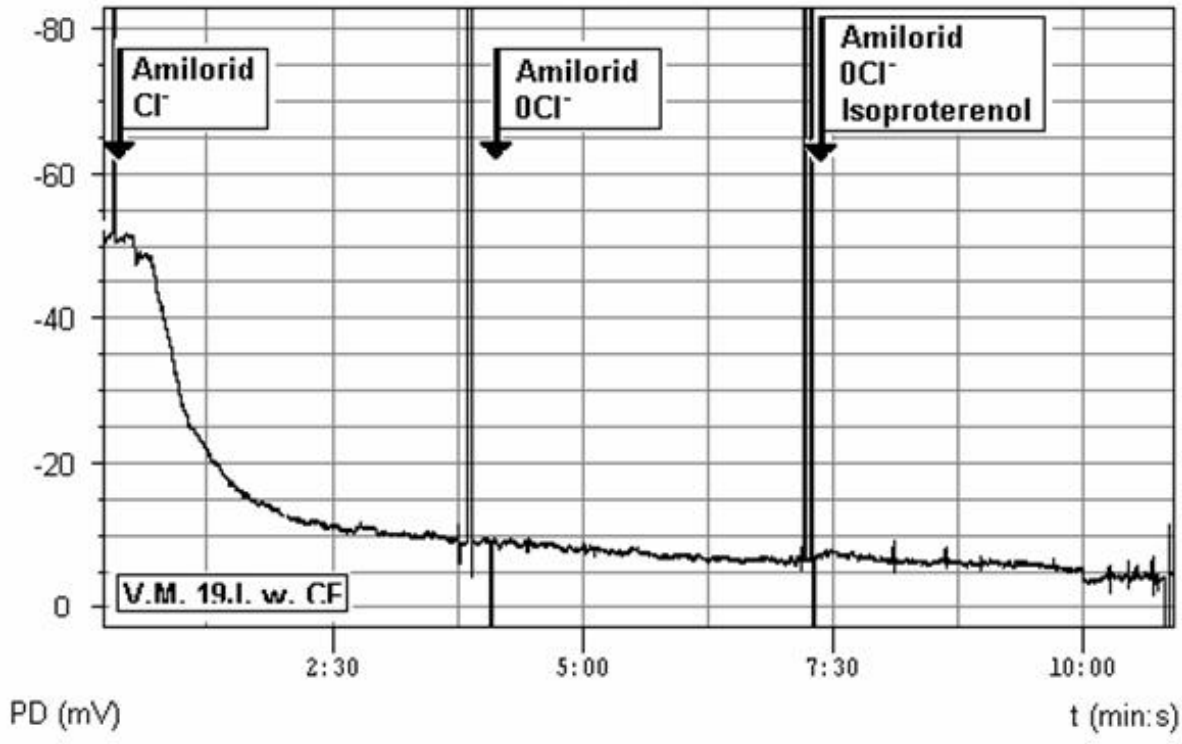


Abb. 2.7 Aufzeichnung der PD einer 19jährigen Mukoviszidose-Patientin: Der Ausgangswert der Potenzialdifferenz lag bei –53 mV, nach dreiminütiger Applikation der Amiloridlösung kam es zu einem Abfall der PD-Werte auf –9 mV, also um 44 mV (83,0 %). Nach Gabe des chloridfreien Puffers (0Cl) wurden Werte von -6 mV erreicht. Auch die Applikation von Isoproterenol führte nicht zum Anstieg des PD- Wertes, sondern dieser fiel weiter auf –4 mV ab
Fazit: Es war keine Stimulation der Chlorionenkanäle möglich. Es bestand eine für die Mukoviszidose typische Ionentransportstörung.

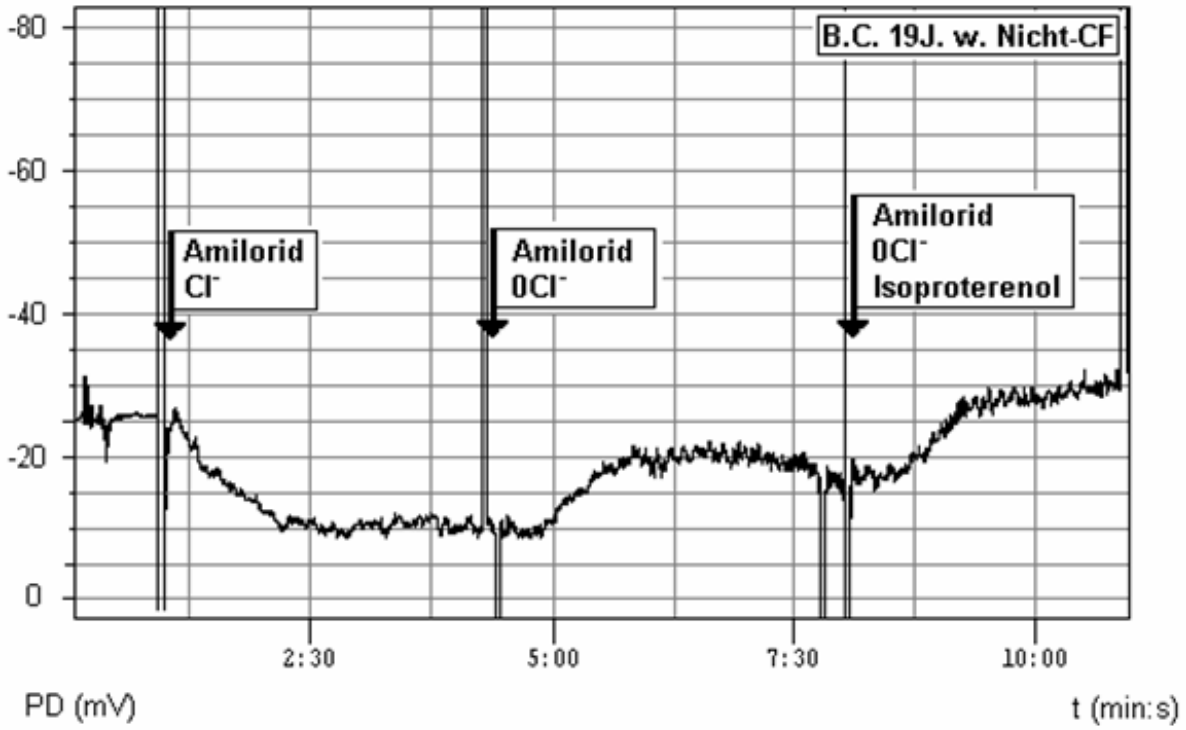


Abb. 2.8 PD- Aufzeichnung bei einer 19jährigen Probandin ohne CF: Der Ausgangswert der PD lag deutlich niedriger als in Abb.2.7 (–26 mV). Nach dreiminütiger Applikation der Amiloridlösung kam es zu einem Abfall der PD-Werte auf -10 mV (∆PD: 61,5 %). Nach Gabe des chloridfreien Puffers (0Cl) erfolgte eine Stimulation der alternativen Chlorionenkanäle. Es kam zu einem Anstieg der PD auf –16 mV. Die Applikation von Isoproterenol führte zu einem weiteren Anstieg der PD-Werte um 125 % auf einen Wert von –30 mV.
<u>Fazit:</u> Die Chlorionen-Sekretion ließ sich durch das ß-Sympathomimetikum stimulieren. Die für Mukoviszidose typische Ionentransportstörung konnte ausgeschlossen werden.

2.7 Vergleich Sensitivität und Spezifität für die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die PD-Werte nach Amilorid in chloridhaltigem Puffer

Folgende Formeln wurden zur Berechnung der Sensitivität bzw. der Spezifität benutzt:
Sensitivität: Richtig erkannte Kranke / Gesamtzahl der Kranken (in Prozent)
Spezifität: Richtig erkannte Gesunde / Gesamtzahl der Gesunden (in Prozent).

Um die Bedeutung der Potenzialdifferenz als diagnostisches Verfahren einschätzen zu können, berechnet man die Sensitivität und die Spezifität der Messung und deren Beeinflussung durch Einführung der Superfusionsmethode. Hierbei wurden die Berechnungen wegen der klinischen Relevanz beschränkt auf die Basalwerte und die Werte der prozentualen Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die PD-Werte nach Amilorid in chloridhaltigem Puffer.
Zur Bestimmung der Sensitivität wurden die jeweils ersten Messergebnisse der Mukoviszidose-Patienten in Gießen ausgewertet. Zur Bestimmung der Spezifität wurden die Messungen an Kontrollpersonen ohne CF ausgewertet.

2.8 Untersuchungskollektive

Das Patientenkollektiv rekrutierte sich aus der Mukoviszidose-Ambulanz der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, aus der Erwachsenen-Mukoviszidose-Ambulanz der Lungenklinik Seltersberg der JLU Gießen sowie vereinzelt auch aus stationär behandelten CF-Patienten beider Abteilungen. Es wurde keine Selektion der Patienten vorgenommen.
Das Vergleichskollektiv rekrutierte sich aus Patienten der pneumologischen

Ambulanz (vorwiegend Asthmatiker) und aus Studenten der Universität Gießen. Bei den Probanden ohne CF wurde darauf geachtet, dass keine Rhinitis oder eine Polyposis nasi vorlag.
Alle PD-Messungen erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission nach Zustimmung der Probanden beziehungsweise durch die Eltern der Probanden. Die Messungen wurden bei Patienten im Alter < 18 Jahren in Anwesenheit der Eltern durchgeführt.

Ausschlusskriterien für die Untersuchungen waren:

- Die Inhalation von Amilorid oder eines $ß_2$-Mimetikums in einem Zeitraum von 8 Stunden vor der Messung ;
- eine schlechte körperliche Verfassung oder eine akute bronchopulmonale Infektion bzw. eine akute Rhinitis;
- ausgeprägte Nasenpolypen, die eine exakte Lokalisation des Messortes unmöglich machten;
- wiederholte Polypektomien, da narbige Veränderungen der Nasenschleimhäute die PD-Werte verfälschen können;
- Probandenalter unter 5 Jahren, da erst vom Schulalter an mit einer ausreichenden Kooperation bei der nasalen Potenzialdifferenzmessung zu rechnen ist.

Die zum Zeitpunkt der Messung bestehende individuelle Langzeitmedikation der CF-Patienten wurde beibehalten.

Insgesamt nahmen 211 Probanden an den Untersuchungen teil, wovon 49 CF-Patienten und 162 Probanden ohne CF waren (Tab. 2.2). Zum Teil beteiligten sich die Probanden bereitwillig mehrfach an den verschiedenen Studien.

Tabelle 2.2: Deskriptive Statistik zu den Untersuchungskollektiven
Nicht-CF: Probanden ohne CF bzw. Asthmatiker

	Nicht-CF (Jahre) n = 162	CF (Jahre) n = 49
Mittelwert	18,1	21,3
Median	13,3	19,6
Standardabweichung	14,2	10,7
Minimum	0,2	0,1
Maximum	57,2	56,3

2.9 Statistische Methoden

Die deskriptive Statistik diente der Beschreibung, Darstellung und Strukturierung der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse. Dabei gibt *n* den Stichprobenumfang, d.h. die Anzahl der PD-Messungen der Patienten an. Die Ergebnisse sind in absoluten und prozentualen Werten dargestellt. Der prozentuale Abfall nach Amilorid bezieht sich auf Null, der prozentuale Wiederanstieg nach Applikation des Adrenergikums auf die individuelle PD-Änderung nach Amilorid, die 100% gesetzt wurde. Die jeweilige Zielgröße wie z.B. Wirksamkeit und PD-Abfall bzw. Wiederanstieg nach einem Pharmakon wurde anhand von Mittelwert (x), Standardabweichung (s), Standardabweichung des Mittelwertes (Sx), Median (Med.) sowie der größten und der kleinsten Merkmalsausprägung (Max. / Min.) dargestellt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (r) und der linearen Regression wurde nach den üblichen statistischen Verfahren vorgenommen [74]. Der im Ergebnisteil aufgeführte Fehler 1. Art (p) gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Ablehnung der Nullhypothese an. Zur Auswertung wurden die Statistikprogramme „OriginPro 6.1“ und „WinStat Vers. 3.1“ eingesetzt.

Der Vergleich der Ergebnisse zwischen Probanden ohne CF und CF-Patienten wurden mittels unabhängigem T-Test durchgeführt. Der Vergleich der PD-Werte

vor bzw. nach Medikamenteneinfluss erfolgte innerhalb der Gruppe der Nicht-CF-Probanden bzw. CF-Patienten mittels abhängigem T-Test. Ein Ergebnis für $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.
Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Potenzialdifferenz vor und nach Amilorid-Nasenspray

3.1.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz

Zunächst wurden die Basiswerte der nasalen Potenzialdifferenz (PD) mit dem im eigenen Labor etablierten Messverfahren bei 99 Probanden ohne CF und bei 6 Patienten mit CF erhoben (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: PD-Basiswerte (mV) von Probanden ohne CF (N-CF) und CF-Patienten (CF)

	N-CF basal (n = 99)	CF basal (n = 6)
Mittelwert	-30,5	-43,8
Median	-30,0	-42,8
Minimum	-10,0	-35,5
Maximum	-53,0	-54,0
Standardabweichung	9,6	7,5

Die PD-Ausgangswerte waren normal verteilt. Sie lagen bei Probanden ohne CF im Mittel deutlich niedriger als diejenigen der CF-Patienten (-30,5 mV vs. -43,8 mV; s. Tab. 3.1). Im T-Test für unabhängige Stichproben war ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar ($p = 0,001$).
Allerdings bestand ein deutlicher Überlappungsbereich, der anhand der Boxplot-Diagramme gut zu verdeutlichen ist (Abb. 3.1).

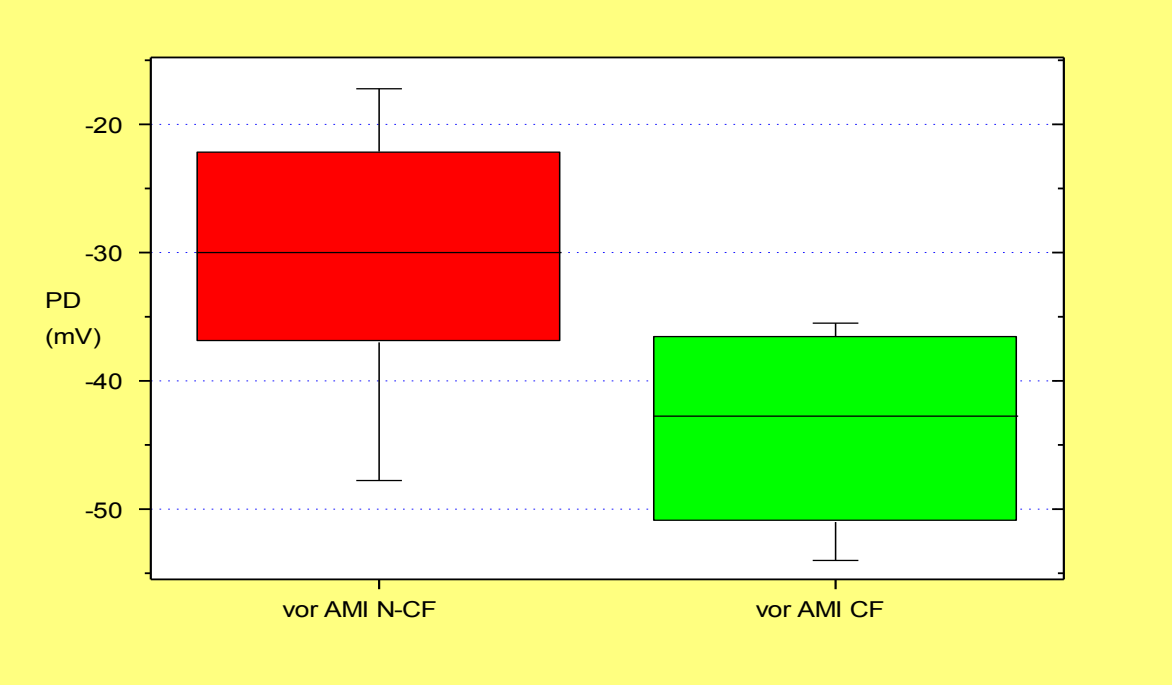


Abbildung 3.1: PD-Basiswerte (mV) von Probanden ohne CF (N-CF; n = 99) und CF-Patienten (n = 6) vor Amilorid-Nasenspray (vor AMI)
Boxplot-Diagramme: Markierung von Median, 5., 25., 75. und 95. Perzentile

3.1.2 PD-Werte nach Amilorid-Nasenspray

Nach den Basismessungen wurden allen Probanden jeweils 2 Hub Amilorid-Nasenspray 0,3% verabreicht. Ca. 2 Minuten nach Applikation wurden die PD-Werte nach Natriumkanal-Blockade erhoben.
Die PD-Messwerte der Probanden ohne CF nach Applikation von 2 Hub Amiloridlösung per Nasenspray lagen im Mittel deutlich niedriger als diejenigen der CF-Patienten (-16,3 mV vs. -28,5 mV; Tab. 3.2). Im T-Test für unabhängige Stichproben war ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar (p = 0,0002). Es bestand ein geringer Überlappungsbereich, der anhand der Boxplot-Diagramme gut zu verdeutlichen ist (Abb. 3.2).

Tabelle 3.2: PD- Werte (mV) von Probanden ohne CF (n = 99) und CF-Patienten (n = 6) nach 2 Hub Amilorid-Nasenspray 0,3 % (AMI)

	N-CF nach AMI (n = 99)	CF nach AMI (n = 6)
Mittelwert	-16,3	-28,5
Median	-15,0	-30,0
Minimum	-3,0	-20,0
Maximum	-48,0	-33,0
Standardabweichung	7,5	5,2

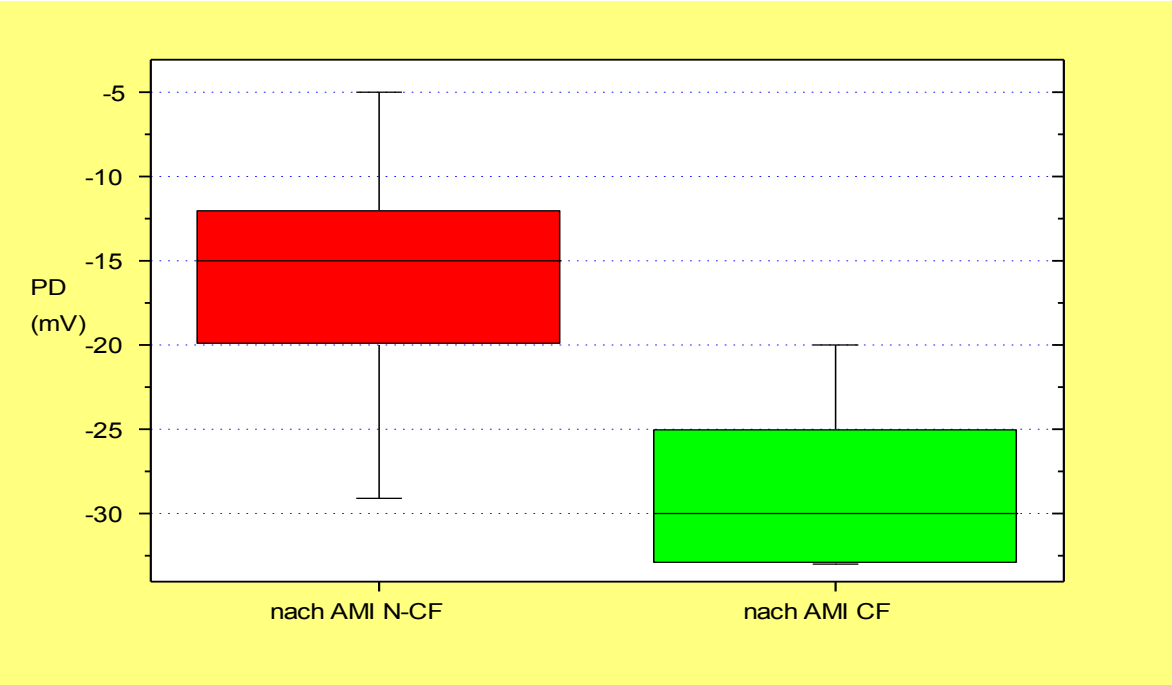


Abbildung 3.2: PD-Werte (mV) von Probanden ohne CF (N-CF; n = 99) und CF-Patienten (n = 6) nach Amilorid-Nasenspray (nach AMI)

3.1.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD) vor und nach 2 Hub Amilorid-Nasenspray

Die ΔPD-Werte nach 2 Hub Amilorid-Nasenspray der Probanden ohne CF lagen

im Mittel etwas höher als diejenigen der CF-Patienten (46 % vs. -34 %; Tab. 3.3). Im T-Test für unabhängige Stichproben war kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar (p = 0,14).

Tabelle 3.3: Prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD (%)) von Probanden ohne CF (N-CF; n = 99) und CF-Patienten (n = 6) vor und nach 2 Hub Amilorid-Nasenspray

	N-CF ΔPD AMI (n = 99)	CF ΔPD AMI (n = 6)
Mittelwert	46 %	34 %
Median	48 %	39 %
Minimum	-29 %	10 %
Maximum	90 %	48 %
Standardabweichung	20,4 %	15,3 %

Es bestand ein beträchtlicher Überlappungsbereich (Abb. 3.3)

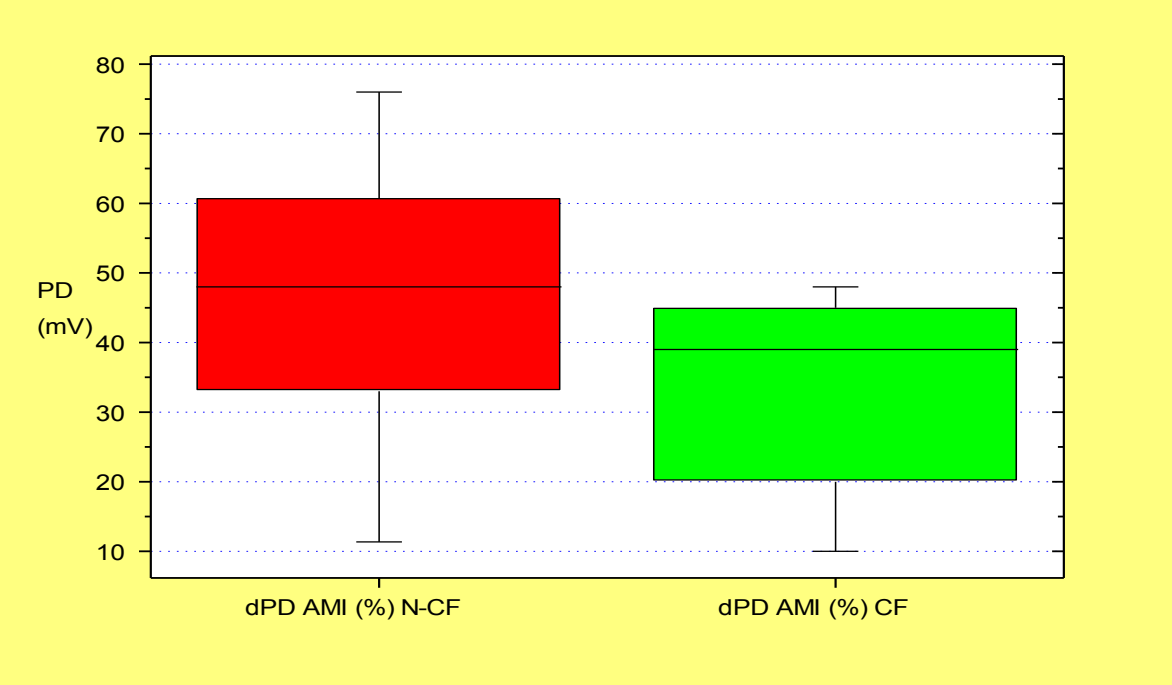


Abbildung 3.3: ΔPD-Werte (mV) von Probanden ohne CF (N-CF; n = 99) und CF-Patienten (n = 6) vor und nach Amilorid-Nasenspray (dPD AMI %)

3.2 PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion

3.2.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz

Auch in dieser Messreihe wurden zunächst die Basiswerte der nasalen Potenzialdifferenz (PD) mit dem im eigenen Labor etablierten Messverfahren bei 149 Probanden ohne CF und bei 80 CF-Patienten erhoben.

Tabelle 3.4: PD-Basiswerte (mV) von Probanden ohne CF (N-CF) und CF-Patienten (CF)

	N-CF basal (n = 149)	CF basal (n = 80)
Mittelwert	-29,8	-48,5
Median	-29,0	-46,5
Minimum	-14,0	-18,0
Maximum	-56,0	-82,0
Standardabweichung	9,0	14,1

Die PD-Ausgangswerte lagen bei Probanden ohne CF lagen im Mittel wie bei der ersten Untersuchung (Kap. 3.1.1) deutlich niedriger als diejenigen der CF-Patienten (-29,8 mV vs. -48,5 mV; Tab. 3.4). Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied (p = 7,99E-27).

3.2.2 PD-Werte nach Amilorid-Superfusion

Nach den Basismessungen erfolgte in dieser Messreihe eine drei Minuten dauernde Superfusion von Amilorid 0,03% in chloridhaltigem Puffer. Am Ende der Superfusion erfolgte die Messung der PD-Werte.

Tabelle 3.5: PD- Werte (mV) von Probanden ohne CF (n = 149) und CF-Patienten (n = 80) nach Superfusion von Amilorid 0,03 % in chloridhaltigem Puffer (SFA)

	N-CF nach SFA (n = 149)	CF nach SFA (n = 80)
Mittelwert	-13,4	-15,2
Median	-13,0	-14,0
Minimum	-4,0	-4,0
Maximum	-30,0	-33,0
Standardabweichung	5,4	7,1

Die PD-Messwerte der Probanden ohne CF nach Amilorid-Superfusion lagen im Mittel minimal niedriger als diejenigen der CF-Patienten (-13,4 mV vs. -15,2 mV). Es war ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar (p = 0,036). Wie die weitgehend übereinstimmenden Minimum- und Maximum-Werte zeigen, bestand jedoch ein sehr deutlicher Überlappungsbereich (Tab. 3.5)

3.2.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig)

Tabelle 3.6: Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%) von Probanden ohne CF (n = 149) und CF-Patienten (n = 80) vor und nach Amilorid-Superfusion

	N-CF ∆PD SFA (n = 149)	CF ∆PD SFA (n = 80)
Mittelwert	54 %	68 %
Median	55 %	70 %
Minimum	19 %	33 %
Maximum	87 %	90 %
Standardabweichung	14,3 %	13,8 %

Die ∆PD-Werte von Probanden ohne CF nach Amilorid-Superfusion lagen im Mittel niedriger als diejenigen der CF-Patienten (54 % vs. -68 %). Statistisch war

ein signifikanter Unterschied nachweisbar (p = 2,62361E-11).
Es bestand wiederum ein erheblicher Überlappungsbereich (Tab. 3.6)

3.3 Vergleich der PD- Werte vor und nach 2Hub Amilorid Nasenspray mit den PD-Werten vor und nach Superfusion mit Amilorid

Hierzu wurden Messungen vor und nach Amilorid-Nasenspray bei 99 Probanden ohne CF und bei 6 CF-Patienten durchgeführt. Es wurden bei 149 Probanden ohne CF und bei 80 CF-Patienten Messungen vor und nach Amilorid-Superfusion durchgeführt.

3.3.1 Vergleich der Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz

Der Vergleich der Basalwerte zeigte bei den Probanden ohne CF in beiden Messreihen fast keine Unterschiede (Mittelwerte: -30,5 mV vs. -29,8 mV; Tab. 3.7; p = 0,55). Dagegen fielen die Basalwerte der CF-Patienten unterschiedlich (Mittelwerte: -43,8 mV vs. -48,5 mV; p = 0,42) aus, lagen aber insgesamt nur geringfügig höher als die Werte der Probanden ohne CF.

Tabelle 3.7: PD- Werte (mV) von Probanden ohne CF (n = 99) und CF-Patienten (n = 6) vor Amilorid-Nasenspray (AMI) sowie von Probanden ohne CF (n = 149) und CF-Patienten (n = 80) vor Amilorid-Superfusion (SFA)

	N-CF vor AMI (n = 99)	N-CF vor SFA (n = 149)	CF vor AMI (n = 6)	CF vor SFA (n = 80)
Mittelwert	-30,5	-29,8	-43,8	-48,5
Median	-30,0	-29,0	-42,8	-46,5
Minimum	-10,0	-14,0	-35,5	-18
Maximum	-53,0	-56,0	-54,0	-82
Standardabweichung	9,6	9,0	7,53	14,05

3.3.2 Vergleich der PD-Werte nach Amilorid-Nasenspray 0,3% und nach Amilorid Superfusion 0,03%

Der Vergleich der PD-Werte nach Amilorid-Nasenspray bzw. -Superfusion zeigte bei den Probanden ohne CF nur geringe, aber signifikante Unterschiede (Mittelwerte -16,3 mV vs. -13,4 mV; Tab. 3.8; p = 6,03E-4). Auch die PD-Werte der CF-Patienten waren nach Amilorid-Nasenspray bzw. –Superfusion signifikant unterschiedlich (Mittelwerte -28,5 mV vs. -15,2 mV; p = 2,12E-5).
Der Vergleich der PD-Werte vor und nach Amilorid-Nasenspray ergab einen statistisch hochsignifikanten Unterschied für Probanden ohne CF (p = 2,91E-30) und einen signifikanten Unterschied für CF-Patienten (p = 0,006). Für die PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied für Probanden ohne CF (p = 2,67E-61) und für CF-Patienten (p = 1,57E-37).

Tabelle 3.8: PD- Werte (mV) von Probanden ohne CF (n = 99) und CF-Patienten (n = 6) nach Amilorid-Nasenspray (AMI) sowie bei Probanden ohne CF (n = 149) und CF-Patienten (n = 80) nach Amilorid-Superfusion (SFA)

	N-CF nach AMI (n = 99)	N-CF nach SFA (n = 149)	CF nach AMI (n = 6)	CF nach SFA (n = 80)
Mittelwert	-16,3	-13,4	-28,5	-15,2
Median	-15,0	-13,0	-30,0	-14,0
Minimum	-3,0	-4,0	-20,0	-4,0
Maximum	-48,0	-30,0	-33,0	-33,0
Standardabweichung	7,5	5,4	5,2	7,1

3.4 PD- Werte vor und nach Amilorid-Superfusion sowie nach Verwendung von chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat)

Ziel dieser Studie war es, eine Verbesserung der diagnostischen Unterscheidung zwischen Probanden ohne CF und CF-Patienten durch Stimulation der CFTR-unabhängigen Chlorid-Kanäle zu erreichen. Wegen der präziseren Anwendbarkeit wurde ausschließlich die Superfusion zur Applikation der Substanzen verwendet. Hierzu wurden bei 120 Probanden ohne CF und bei 77 CF-Patienten Messungen vor und nach Amilorid-Superfusion sowie nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) durchgeführt.
Diese Studie basierte auf den bereits dargestellten Erkenntnissen mit Amilorid-Superfusion auf, wurde aber zeitlich zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, so dass es sich nicht um die gleichen Probanden handelte und unterschiedlich große Probanden-Gruppen vorlagen. Deshalb erfolgte ausschließlich eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse der im Versuchsablauf jeweils initial stattfindenden Superfusion mit Amilorid.

3.4.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz und nach Superfusion mit Amilorid in chloridhaltigem Puffer

Die PD-Ausgangswerte bei Probanden ohne CF lagen wie bei den Voruntersuchungen im Mittel signifikant niedriger als diejenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: -29,2 mV vs. -48,6 mV; p = 1,04E-24). Die bereits vorher beobachtete Überlappung ist anhand der Minimum- und Maximum-Werte der PD-Messung gut nachzuvollziehen (Tab. 3.9).

Die PD-Messwerte nach Amilorid-Superfusion bei Probanden ohne CF lagen statistisch signifikant niedriger als diejenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: -12,8 mV vs. -15,2 mV; p = 0,01). Die Überlappung war jedoch auch in diesem Fall beträchtlich.

Die auf die Ausgangswerte bezogenen prozentualen Änderungen der PD-Werte von Probanden ohne CF lagen wie bei den Voruntersuchungen statistisch signifikant unter denjenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: 56 % vs. -68 %; p = 8,24E-9). Die erhebliche Überlappung bleibt bestehen.

Tabelle 3.9: PD-Werte (mV) der Ausgangsmessung (basal) sowie nach Superfusion mit Amilorid (SFA) von Probanden ohne CF (n = 120) und CF-Patienten (n = 77) sowie die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Amilorid-Superfusion.

	N-CF basal (n = 120)	CF basal (n = 77)	N-CF nach SFA (n = 120)	CF nach SFA (n = 77)	N-CF ∆PD SFA (n = 120)	CF ∆PD SFA (n = 77)
Mittelwert	-29,2	-48,6	-12,8	-15,2	56 %	68 %
Median	-28,0	-47,0	-12,0	-14,0	56 %	70 %
Minimum	-14,0	-18,0	-4,0	-4,0	23 %	28 %
Maximum	-56,0	-82,0	-30,0	-33,0	87 %	90 %
Standardab-weichung	9,0	14,1	5,6	7,2	14,3 %	13,9 %

3.4.2 PD- Werte nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat)

Im Anschluss an die Messungen nach Superfusion von Amilorid in chloridhaltigem Puffer wurde eine dreiminütige Superfusion mit Amilorid in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) durchgeführt. Während und am Ende der Superfusion erfolgte die erneute Bestimmung der PD-Werte.
Die PD-Messwerte nach Amilorid-Superfusion in chloridfreiem Puffer der Probanden ohne CF lagen etwas höher als diejenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: -22,1 mV vs. -16,6 mV; Tab. 3.10). Es war ein statistisch signifikanter Unterschied für die Werte nach Superfusion der chloridfreien Amilorid-Lösung zwischen Nicht-CF-Probanden und CF- Patienten nachweisbar (p = 1,35E-4).

Tabelle. 3.10: PD- Werte von Probanden ohne CF (n = 120) und CF-Patienten (n = 77) nach Superfusion von - Amilorid/Natrium-Glukonat-Lösung (NaG) (chloridfreier Puffer)

	N-CF nach NaG (n = 120)	CF nach NaG (n = 77)
Mittelwert	-22,1	-16,6
Median	-20,5	-14,0
Minimum	-6,0	-3,0
Maximum	-49,0	-50,0
Standardabweichung	9,6	10,0

Allerdings zeigt sich in den Boxplot-Diagrammen ein deutlicher Überlappungsbereich (Abb. 3.4), so dass die diagnostische Bedeutung gering ist. Es ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied für Probanden ohne CF (p = 1,09E-24) und ein gerade signifikanter Unterschied für CF-Patienten (p = 0,048).

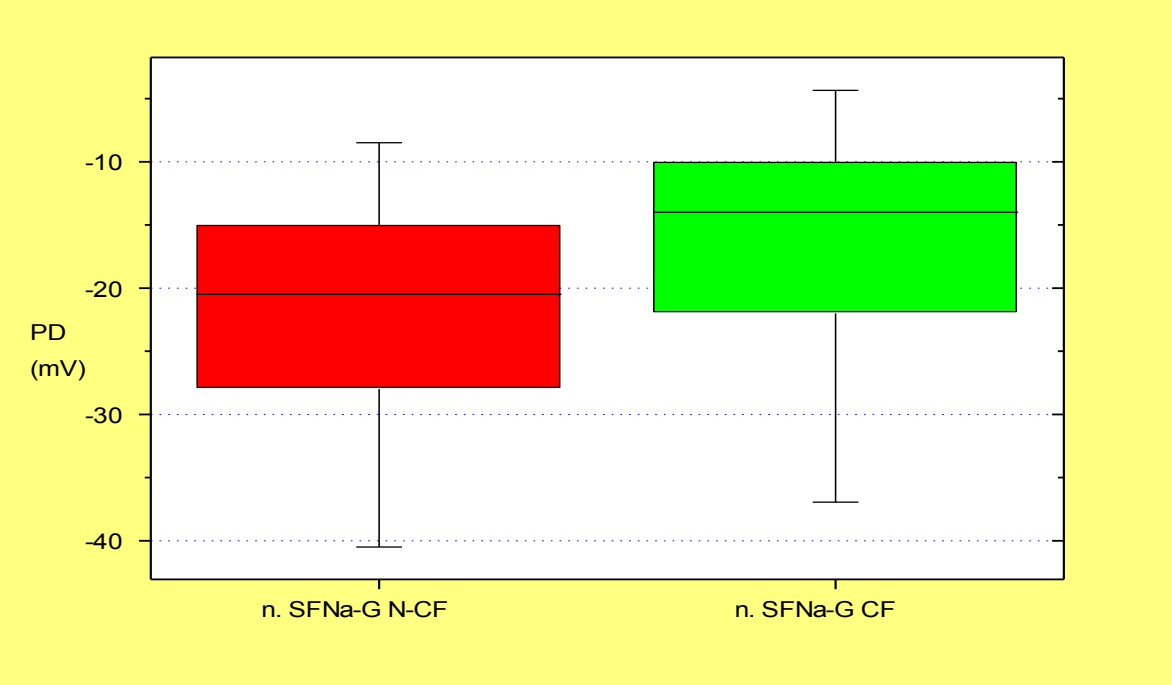


Abbildung 3.4: PD- Werte von Probanden ohne CF (N-CF, n = 120) und CF-Patienten (CF, n = 77) nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer

3.4.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte vor und nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat)

Die prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD-Werte) nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer bei Probanden ohne CF lagen signifikant über denjenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: 61 % vs. 5 %; Tab. 3.11; p = 3,21E-14).
Die Boxplot-Diagramme zeigten eine deutlich geringere Überlappung als bei den absoluten PD-Werten (Abb. 3.5; vgl. Abb. 3.4). Dennoch lässt sich auch hiermit keine verlässliche Diagnostik durchführen.

Tabelle 3.11: Prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD (%)) von Probanden ohne CF (n = 120) und CF-Patienten (n = 77) vor und nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer

	N-CF ΔPD NaG (n = 120)	CF ΔPD NaG (n = 77)
Mittelwert	62 %	5 %
Median	51 %	0 %
Minimum	-42 %	-33 %
Maximum	317 %	119 %
Standardabweichung	57,5 %	25,8 %

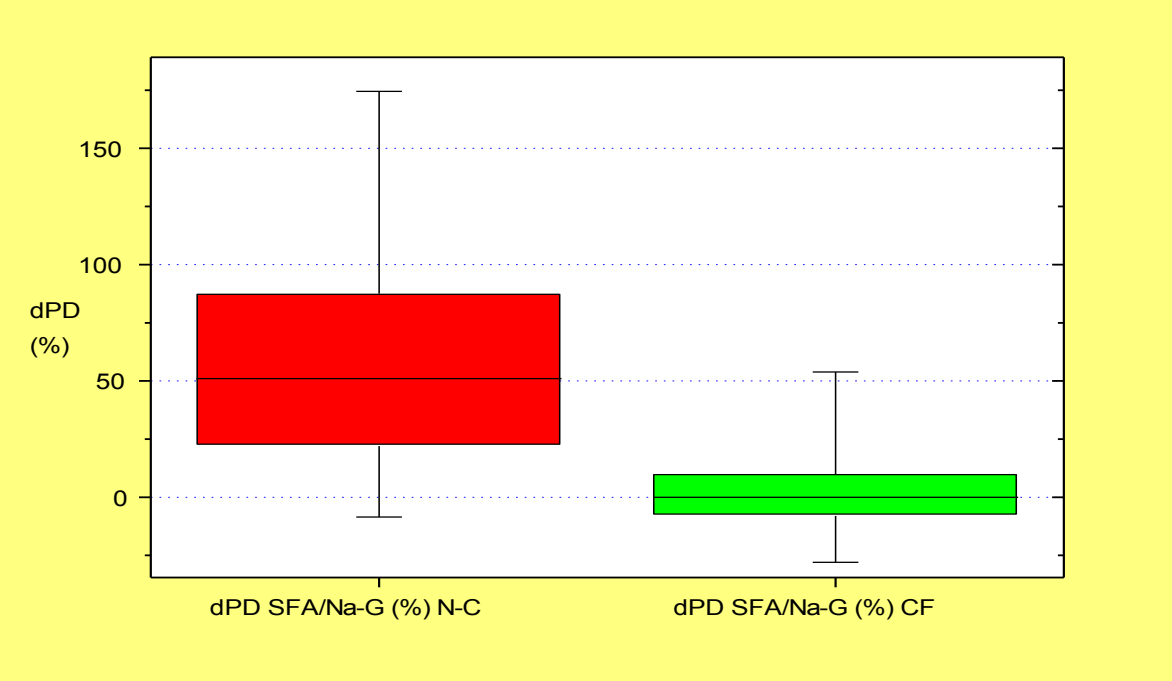


Abbildung 3.5: Prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD (%)) von Probanden ohne CF (N-C, n = 120) und CF-Patienten (CF, n = 77) vor und nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer

3.4.4 Prozentuale Änderung der PD-Werte beiden Superfusionen in Bezug auf die Ausgangswerte

Die ∆PD-Werte nach beiden Superfusionen bei Probanden ohne CF lagen signifikant über denjenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: 78 % vs. 35 %; Tab. 3.12; p = 7,61E-23). Es bestand noch eine deutliche Überschneidung.

Tabelle 3.12: Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) von Probanden ohne CF (n = 120) und CF-Patienten (n = 77) vor und nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer

	N-CF ∆PD ges. (n = 120)	CF ∆PD ges. (n = 77)
Mittelwert	78 %	35 %
Median	73 %	29 %
Minimum	13 %	6 %
Maximum	168 %	109 %
Standardabweichung	29,4 %	20,2 %

3.5 PD- Werte vor und nach Superfusion von Isoproterenol

Ziel dieser Studie war es, durch Stimulation der CFTR-abhängigen Chlorid-Kanäle, eine bessere Differenzierung zwischen Probanden ohne CF und mit CF zu erreichen.
Hierzu wurden Messungen vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig), nach Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer sowie nach Superfusion von Isoproterenol (in Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer) bei 74 Probanden ohne CF und bei 45 CF-Patienten durchgeführt.
Diese Studie basierte auf den zuvor gewonnenen Erkenntnissen, wurde aber zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, so dass es sich nicht um die gleichen Probanden handelte und unterschiedlich große Probanden-Gruppen vorlagen.

Deshalb erfolgte erneut die kurze Darstellung der Ergebnisse der im Versuchsablauf vorgeschalteten Untersuchungen mit den verschiedenen Amilorid-Lösungen.

3.5.1 Ausgangswerte der nasalen Potenzialdifferenz, Werte nach Superfusion mit Amilorid und nach Superfusion von chloridfreiem Puffer

Die PD-Ausgangswerte der Probanden ohne CF lagen erneut signifikant niedriger als diejenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: -28,1 mV vs. -47,3 mV; s. Tab. 3.13; p = 2,79E-16).
Die PD-Messwerte nach Amilorid-Superfusion bei Probanden ohne CF lagen minimal und im Gegensatz zur vorhergehenden Messreihe nicht signifikant niedriger als diejenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: -12,3 mV vs. -14 mV; Tab. 3.13; p = 0,12972).
Die Messungen nach Superfusion von Amilorid in chloridfreiem Puffer ergaben wie in der vorhergehenden Messreihe signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bei noch deutlicher Überlappung (p= 1,06E-6). Auch der Unterschied in der Gruppe der Probanden ohne CF war wie zuvor hochsignifikant (p = 1,39E-15). Allerdings zeigte sich in der Gruppe der CF-Patienten nun kein signifikanter Unterschied mehr für die PD-Werte vor und nach chloridfreier Amilorid-Superfusion (p = 0,078).

Tabelle 3.13: PD- Basiswerte (mV) von Probanden ohne CF (n = 74) und CF-Patienten (n = 45), Werte nach Amilorid (SFA) und nach Natrium-Glukonat (NaG)

	N-CF basal (n = 74)	CF basal (n = 45)	N-CF nach SFA (n = 74)	CF nach SFA (n = 45)	N-CF nach NaG (n = 74)	CF nach NaG (n = 45)
Mittelwert	-28,1	-47,3	-12,3	-14,0	-21,0	-13,1
Median	-26,0	-46,0	-11,5	-13,0	-19,5	-13,0
Minimum	-14,0	-18,0	-4,0	-4,0	-6,0	-3,0
Maximum	-49,0	-82,0	-27,0	-33,0	-43,0	-30,0
Standardab-weichung	8,0	14,1	5,3	7,1	8,9	6,8

3.5.2 PD- Werte nach Superfusion von Isoproterenol

Im Anschluss an die Messungen nach Superfusion von Amilorid in chloridfreiem Puffer wurde eine Superfusion mit Isoproterenol über drei Minuten durchgeführt. Während sowie am Ende dieser Superfusion erfolgte die erneute Bestimmung der PD-Werte.

Die PD-Messwerte nach Isoproterenol-Superfusion bei Probanden ohne CF lagen signifikant höher als diejenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: -30,3 mV vs. -13,4 mV; Tab. 3.14; p = 2,60E-18).

Tab. 3.14: PD- Werte (mV) von Probanden ohne CF (n = 74) und CF-Patienten (n = 45) nach Superfusion von Isoproterenol (ISO)

	N-CF nach ISO (n = 74)	CF nach ISO (n = 45)
Mittelwert	-30,3	-13,4
Median	-30,0	-12,0
Minimum	-14,0	-2,0
Maximum	-61,0	-29,0
Standardabweichung	9,3	7,4

Grafisch zeigte sich eine minimale Überschneidung (Abb. 3.6).

Beim Vergleich der PD-Werte vor und nach Superfusion von Isoproterenol zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied für Probanden ohne CF (p = 2,25E-22), aber kein signifikanter Unterschied für CF-Patienten (p = 0,41).

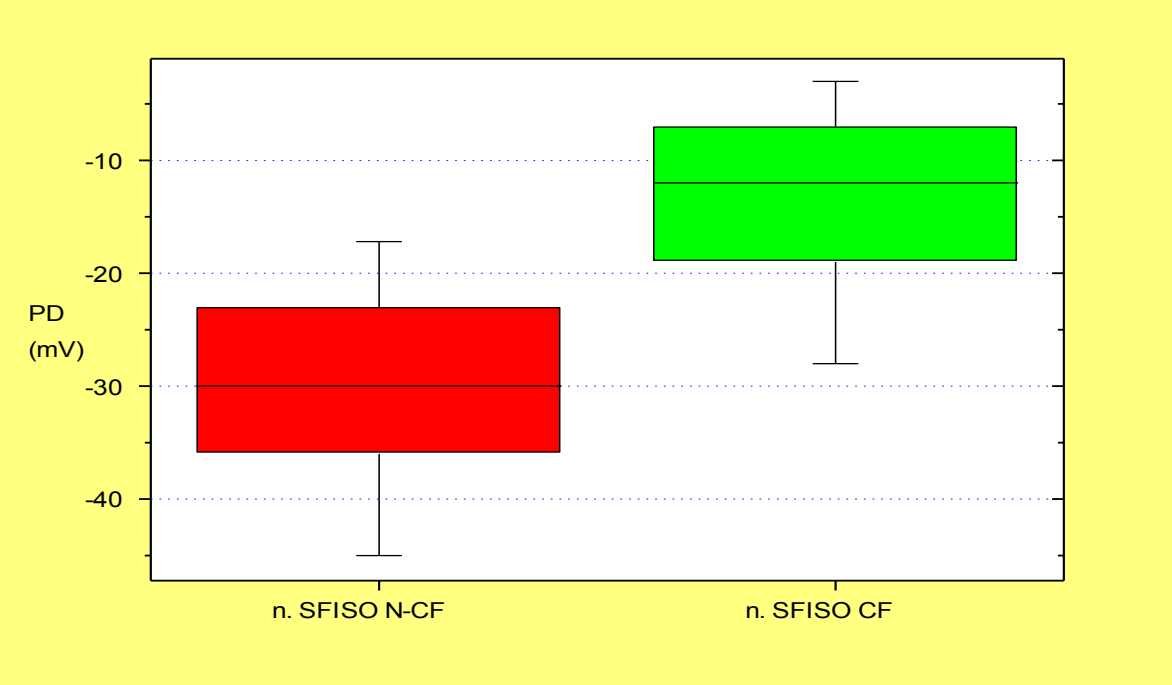


Abbildung 3.6: PD- Werte von Probanden ohne CF (N-CF, n = 74) und CF-Patienten (CF, n = 45) nach Isoproterenol-Superfusion (SFISO)

3.5.3 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) vor und nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach chloridfreiem Amilorid

Die ∆PD-Werte nach Superfusion von Isoproterenol (bezogen auf das PD-Niveau nach chloridfreiem Amilorid) bei Probanden ohne CF lagen signifikant über

denjenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: 244 % vs. 9 %; Tab. 3.15; p = 5,95E-6). Die Boxplot-Diagramme zeigten eine deutliche Überlappung (Abb. 3.7).

Tabelle 3.15: Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%) von Probanden ohne CF (n = 74) und CF-Patienten (n = 45) vor und nach Superfusion von Isoproterenol (SFISO)

	N-CF ∆PD ISO/NaG (n = 74)	CF ∆PD ISO/NaG (n = 45)
Mittelwert	244 %	9 %
Median	121 %	0 %
Minimum	-7 %	-400 %
Maximum	1500 %	700 %
Standardabweichung	306,5 %	161,5 %

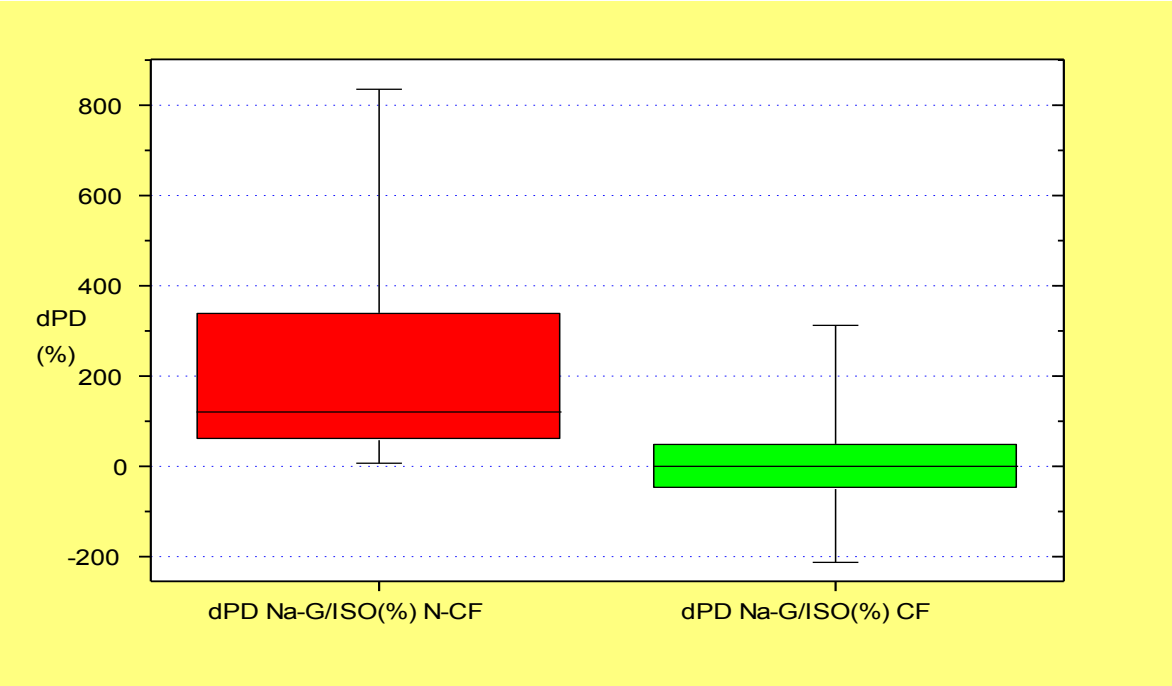


Abbildung 3.7: Prozentuale Änderung der PD-Werte (dPD (%)) von Probanden ohne CF (N-CF, n = 74) und CF-Patienten (CF, n = 45) vor und nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach chloridfreiem Amilorid

3.5.4 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach Amilorid

Die ∆PD-Werte nach allen Superfusionen (bezogen auf das PD-Niveau nach chloridhaltigem Amilorid) lagen bei Probanden ohne CF signifikant über denjenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: 119 % vs. -3 %; Tab. 3.16; p = 4,13E-28). In diesem Boxplot-Diagramm zeigte sich keinerlei Überlappung (Abb. 3.8).

Tabelle 3.16: Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) von Probanden ohne CF (n = 74) und CF-Patienten (n = 45) vor und nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach Amilorid (chloridhaltig)

	N-CF ∆PD ISO/SFA (n = 74)	CF ∆PD ISO/SFA (n = 45)
Mittelwert	119 %	-3 %
Median	107 %	-2 %
Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert (=DAM)	37,3 %	12,4 %
Minimum	14 %	-45 %
Maximum	400 %	29 %
Standardabweichung	54,8 %	16,4 %

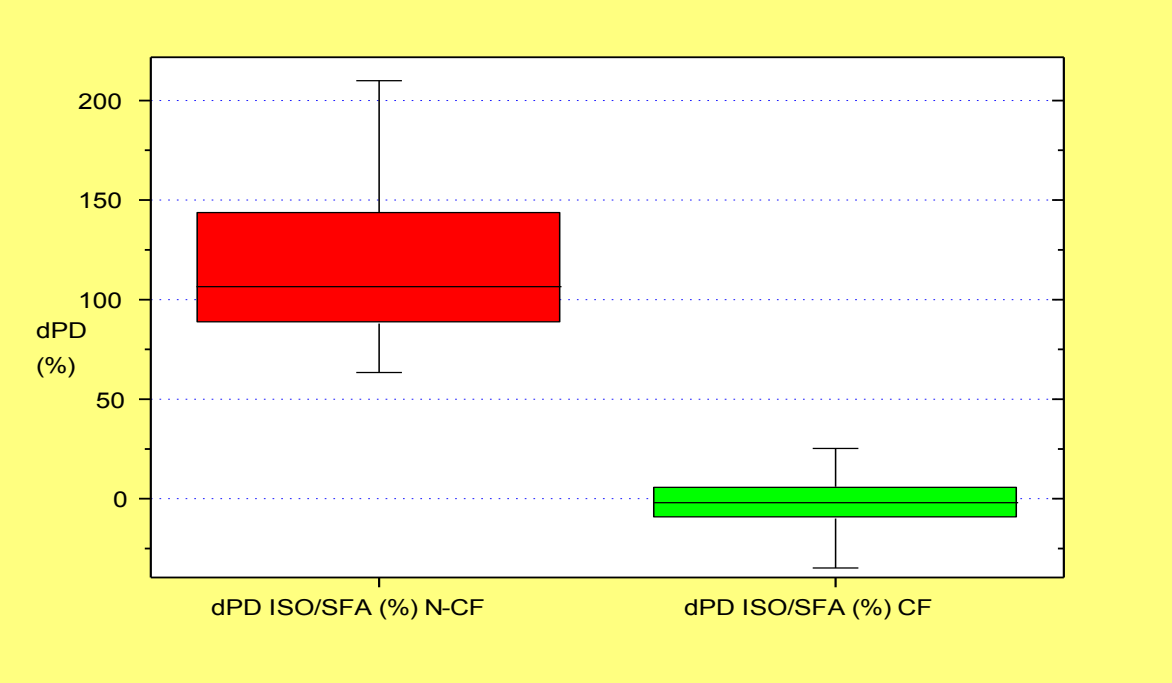


Abbildung 3.8: Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD (%)) von Probanden ohne CF (N-CF, n = 74) und CF-Patienten (CF, n = 45) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf das PD-Niveau nach Amilorid (chloridhaltig)

3.5.5 Prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die Ausgangswerte

Die ∆PD-Werte bezogen auf die Ausgangswerte vor der ersten Superfusion lagen bei Probanden ohne CF hochsignifikant über denjenigen der CF-Patienten (Mittelwerte: 110 % vs. 28 %; Tab. 3.17; p = 2,10E-40).
Auch in diesen Boxplot-Diagrammen war keine Überlappung festzustellen (Abb. 3.9).

Tabelle 3.17: Prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD (%)) von Probanden ohne CF (n = 74) und CF-Patienten (n = 45) nach Amilorid-Superfusion (chlorhaltig), nach folgender Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat) und nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die Ausgangswerte

	N-CF ΔPD gesamt (n=74)	CF ΔPD gesamt (n=45)
Mittelwert	110 %	28 %
Median	103 %	28 %
Minimum	73 %	6 %
Maximum	186 %	57 %
Standardabweichung	24,6 %	13,4 %

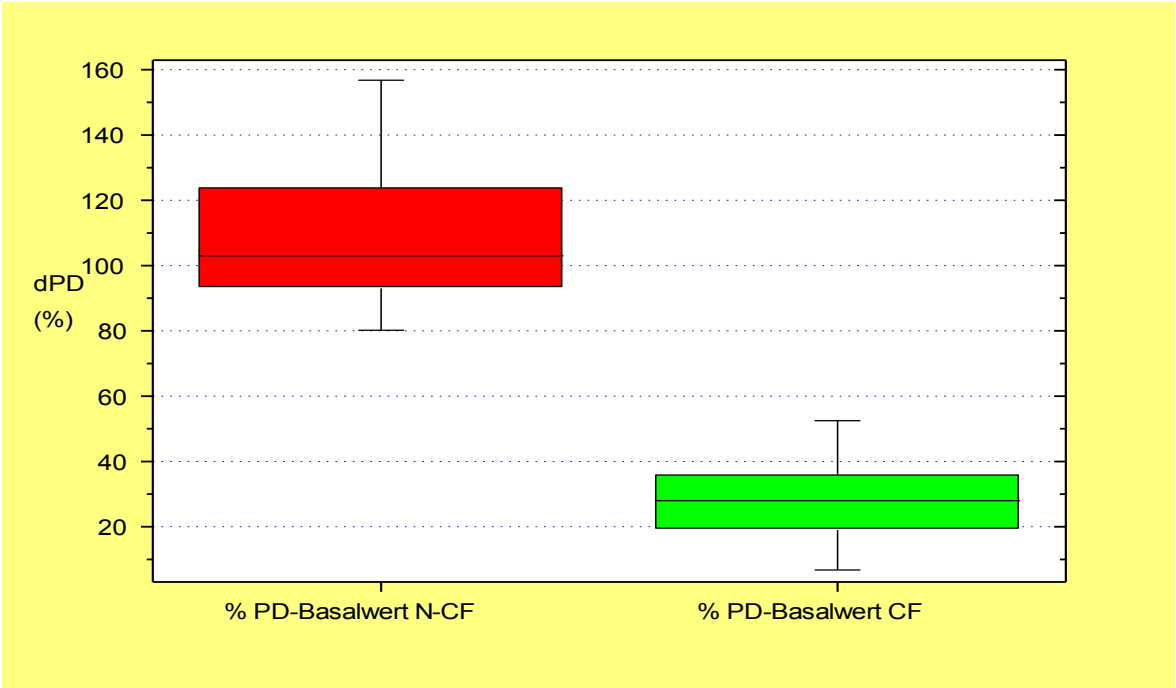


Abbildung 3.9: Prozentuale Änderung der PD-Werte (dPD (%)) von Probanden ohne CF (N-CF, n = 74) und CF-Patienten (CF, n = 45) vor und nach Superfusion von Amilorid in chloridhaltigem und chloridfreiem Puffer sowie nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die Basalwerte

3.5.6 Übersicht über die PD-Ergebnisse

Zur Veranschaulichung der wichtigsten Resultate wurden in Abb. 3.10 die Mittelwerte der PD-Messungen (in mV) vor und nach Superfusion der verschiedenen Pharmaka bei Probanden ohne und mit CF dargestellt.
Der optische Eindruck einer guten Differenzierung zwischen CF und Nicht-CF durch die Basalwerte wurde durch die statistische Auswertung relativiert, durch die eine deutliche Überlappung der PD-Werte der Probanden ohne CF mit denjenigen der CF-Patienten nachzuweisen war (Abb. 3.1; s. auch Kap. 3.6.1).

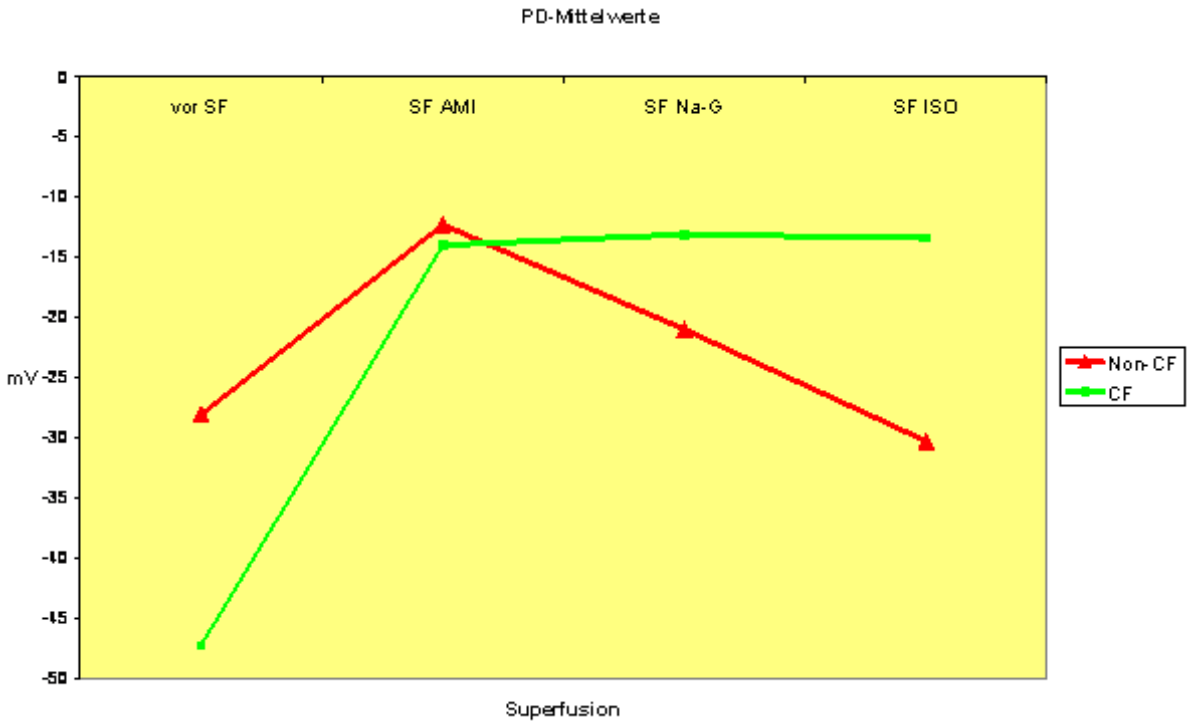


Abb. 3.10: Vergleich der PD-Mittelwerte vor und nach jeweiliger Superfusion bei Probanden ohne und mit CF

3.6 Sensitivität und Spezifität

3.6.1 Sensitivität und Spezifität der Basalwerte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei insgesamt 442 Probanden ohne CF und bei 208 CF-Patienten Basalwerte erhoben, wobei hier auch die mehrfach bestimmten Basalwerte von Probanden integriert wurden, die an verschiedenen Messreihen teilnahmen. Aus diesen Werten kann der Sollwertbereich für Probanden ohne CF und der Messwertbereich für CF-Patienten abgeleitet werden. Ein Wert der Potenzialdifferenzmessung von größer als -44 mV (Mittelwert + 2-fache durchschnittliche Abweichungen vom Mittelwert (DAM)) ist dementsprechend als pathologisch einzuordnen (Tab. 3.18).

Tab. 3.18: Messwerte der Potenzialdifferenz bei Probanden ohne CF und mit CF

	N-CF basal (n = 442)	CF basal (n = 208)
Mittelwert	-29,5	-48,1
Median	-29,0	-46,0
Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert (=DAM)	7,4	10,9
Minimum	-10,0	-18,0
Maximum	-56,0	-82,0
Standardabweichung	9,0	13,9

Bei detaillierter Betrachtung der Ergebnisse fällt jedoch auf, dass der Überlappungsbereich erheblich ist, da die Spannweite der Nicht-CF-Probanden von –10 bis –56 mV, diejenige der CF-Patienten von –18 bis – 82 mV reicht.

Für die Berechnungen der Sensitivität und der Spezifität wurde der für Probanden ohne CF berechnete Grenzwert von -44 mV (Mittelwert + 2 DAM) zugrunde gelegt. Es ergab sich dadurch eine Sensitivität von 59 % und eine Spezifität von 93 %, wenn keine pharmakologischen Tests durchgeführt wurden.

3.6.2 Sensitivität und Spezifität für die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol

Aus den Ergebnissen der pharmakologischen Tests war zu entnehmen (Kap. 3.1.2 bis 3.5.8), dass die Nicht-CF-Probanden von CF-Patienten am besten abzugrenzen sind, wenn man als Kriterium die prozentuale Änderung der PD-Werte nach Isoproterenol (bezogen auf das PD-Niveau nach Superfusion von Amilorid) heranzieht. Ein Überlappungsbereich zwischen beiden Kollektiven war unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten (Abb. 3.8).
Bei 74 Probanden ohne CF und bei 45 CF-Patienten ergab sich ein Mittelwert von 119 % bzw. -3 % und eine DAM von 12,4 % bei den CF-Patienten (Tab 3.16).
Berechnet man nun analog zu den Basalwerten den Grenzwert für die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol (Mittelwert + 2 DAM), so ergibt sich ein Wert von ∆PD = 27,8 %.
Basierend auf diesem Grenzwert errechnete sich eine Sensitivität von 97,8 % und eine Spezifität von 98,6 %.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines zur Potenzialdifferenzmessung

Anamnese und klinischer Befund, aber auch Schweiß- und Genanalyse ließen bisher deutliche Defizite der Mukoviszidose-Diagnostik erkennen [75]. Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung bot sich nach bisherigen Mitteilungen nicht nur als ergänzendes Instrument der Diagnostik, sondern auch für Forschungszwecke an [76]. Möglichkeiten und Grenzen der PD-Messung mussten aber erst noch ausgelotet werden.

4.2 PD-Werte vor und nach Amilorid Nasenspray

Die hier vorgelegten Daten der Ausgangswerte (43,8 $\pm$ 7,5 mV) für CF-Patienten zeigten zwar einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber Probanden ohne CF (-30,5 $\pm$ 9,6 mV; p = 0,0002). Allerdings fanden sich auch einige Messungen mit PD-Werten bei Probanden ohne CF, die im vermuteten pathologischen Bereich liegen (> - 50 mV). Umgekehrt gab es CF-Patienten mit unauffälligen, z. T. sehr niedrigen PD-Basalwerten (< - 25 mV). Der niedrigste Wert von allen an der Studie beteiligten CF-Patienten lag bei – 18 mV.
Hohe Ausgangswerte der nasalen PD ergeben demnach zwar erste Hinweise, dass eine Cystische Fibrose vorliegen könnte [77]. Sie erlauben jedoch keine verlässliche diagnostische Zuordnung, da sie eine hohe Variabilität aufweisen und sich mit den Werten gesunder Probanden überlappen. Dies ist seit langem bekannt [49, 68, 78].

Mit dem Einsatz eines *Amilorid-Nasensprays* verband sich die Hoffnung einer Erleichterung der Diagnostik und einer Verbesserung der diagnostischen Sicherheit auf der Basis der Natriumkanal-Blockade.
Am vorliegenden Datenmaterial ließen sich zwar statistisch signifikante Unterschiede bei den Werten nach Amilorid-Nasenspray nachweisen (mittlerer PD-Wert bei Probanden ohne CF -16,3 mV, bei CF-Patienten -28,5 mV; $p = 0,0002$). Allerdings zeigten die prozentualen Veränderungen (ΔPD) keine signifikanten Unterschiede zwischen Probanden ohne und mit CF (mittleres Absinken der PD um -46,0 bzw. 34,0 %; $p = 0,14$). Damit wurden frühere Erfahrungen bestätigt [79].

4.3 Superfusion allgemein

Entscheidender Nachteil der Applikation einer Substanz mittels Nasenspray ist die Unsicherheit, ob eine ausreichende Deposition am Messort erfolgt. Anatomische Variationen können die Messergebnisse erheblich beeinflussen [80]. Deshalb war unter anderem die Zielsetzung dieser Arbeit, die Fehlerquellen durch eine gezielte Aufbringung des Amilorids am Messort mittels Superfusion zu reduzieren. Allerdings mussten andere Schwierigkeiten beachtet werden.
Spezielle Probleme bei der Superfusion stellen die Temperaturdifferenzen zwischen superfundierter Lösung und Messort an der Nasenschleimhaut dar. Sinnvoll wäre eine Anpassung an die Temperatur des Messortes. Es zeigte sich jedoch in einer eigens durchgeführten Pilotuntersuchung, dass eine Temperierung der Lösungen auf Körpertemperatur bzw. auf das Temperaturniveau in der Nase nicht einfach ist bzw. mit Komplikationen verbunden sein kann. Die Perfusorschläuche mit den pharmakologischen Lösungen müssen durch ein Wasserbad geleitet werden, das mittels Heizspule temperiert wird. Die notwendigen Temperaturen im Wasserbad, durch die entsprechende

Temperaturen am Messkatheter-Ende erreicht werden, betragen ca. 55°C, so dass die Stabilität der Lösungen gefährdet war. Untersuchungen mit Lösungen, die (wie bei intravenös applizierten Medikamenten üblich) Zimmertemperatur hatten, führten nicht zu einer Beeinträchtigung der Messergebnisse. Eine 2003 in den USA durchgeführte Multicenterstudie ergab zwar bei Anwärmen der Superfusionslösungen ein besseres Ansprechen der PD auf Isoproterenol, allerdings war die Reaktion auf chloridfreie Lösung geringer, so dass das Gesamtergebnis nicht wesentlich beeinflusst wurde. Es fand sich ein signifikanter Gesamtunterschied (ΔPD nach chloridfreier Amiloridlösung und nach Isoproterenol in chloridfreier Amiloridlösung) zwischen angewärmten Lösungen und Lösungen bei Raumtemperatur von im Mittel -4,4 mV (95 % Konfidenzintervall -7,6 bis - 1,1 mV; p = 0,01). Dieser Unterschied wurde von den Autoren vor allem als relevant für die Überprüfung der Chlorid-Leitfähigkeit nach CFTR-korrigierender Therapie angesehen, da hier auch geringe Unterschiede im Chlorid-Transport eine Rolle spielen. Für die CF-Diagnostik spielen diese Unterschiede aber nur eine untergeordnete Rolle [81]. Im Rahmen der Erstellung eines Standards zur Verwendung der nasalen Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion im Rahmen von Multicenter-Studien wurden 2004 Lösungen mit Zimmertemperatur verwendet [82]. Auf eigene weitergehende Untersuchungen zu dieser Thematik wurde daher verzichtet.

Als besondere Fehlerquelle der Superfusionsmethode sind die teilweise bestehenden Kontaktschwierigkeiten bei Luftblasen im System zu beachten, die durch die Verlängerung und Erweiterung des Systems bei der Superfusion etwas verstärkt auftreten. Hier ist auf eine akribische Entlüftung bzw. luftfreie Befüllung der Systeme zu achten. Im weiteren Verlauf wurde deshalb im Anschluss an die Messungen für diese Arbeit nach dem Vorbild von Knowles/Boucher auf ein zweilumiges System umgestellt [76], bei dem dieses Problem deutlich reduziert ist.

4.4 PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig)

Aus oben genannten Gründen war unter anderem die Zielsetzung dieser Arbeit, durch eine gezielte Applikation des Amilorids an den Messort mittels Superfusion, die Präzision der Messmethode zu verbessern.

Die Ausgangswerte dieser Messreihe vor Superfusion sind mit den Werten vor Amilorid-Nasenspray vergleichbar und ergeben den erwarteten statistisch signifikanten Unterschied zwischen Probanden ohne und mit CF auf einem etwas höheren Niveau (-29,8 $\pm$ 9,0 mV bzw. -48,5 $\pm$ 14,1 mV; p = 7,99E-27). Hier macht sich offenbar der Vorteil der Superfusionsmethode dadurch bemerkbar, dass man bei CF-Patienten den lokalen Entzündungsprozessen und anatomischen Besonderheiten (s.o.) aus dem Weg gehen kann und den bei ungünstigen Bedingungen besten Messort finden kann. Es gelten prinzipiell jedoch o.g. Einschränkungen.
Am vorliegenden Datenmaterial ließen sich statistisch signifikante Unterschiede bei den Werten nach Amilorid-Superfusion nachweisen (Nicht-CF: -13,4 $\pm$ 5,4 mV; CF-Patienten: -15,2 $\pm$ 7,1 mV; p = 0,036), wobei eine deutliche Überlappung bestehen bleibt. Im Gegensatz zur Messung nach Amilorid-Nasenspray zeigen die prozentualen Veränderungen (ΔPD) auch statistisch eindeutige Unterschiede. Die Hoffnung auf eine bessere diagnostische Differenzierung zwischen Probanden ohne oder mit CF erfüllten sich jedoch nicht, obwohl während der Superfusion auch eine etwas höhere Gesamtdosis von Amilorid, als mittels Nasenspray verabreicht wurde (Nicht-CF: 54 $\pm$ 13,9 %; CF-Patienten: 68% $\pm$ 10,9 % p = 2,62E-11).
Auch andere Autoren kamen zu diesem wenig befriedigenden Ergebnis bezüglich der Diagnostik [79, 82].

Wichtiger als die beschriebene, diagnostisch verwertbare Absenkung der PD-Werte durch die selektive Natrium-Kanal-Blockade mittels Amilorid, welches als Kalium-sparendes Diuretikum seit längerem bekannt ist [51, 54], ist die therapeutische Nutzung des Medikamentes im Hinblick auf die Zusammensetzung und die Konsistenz des Bronchialsekretes. Im *Urogenitalsystem* blockiert Amilorid die Natrium-Reabsorption im distalen Tubulus und vermindert das transepitheliale Potenzialgefälle. Die passiv ablaufende Kalium-Exkretion wird auf Grund dieses Pathomechanismus verringert [51, 83]. Im *Mucus* steigt durch die Natrium-Kanal-Blockade der Natrium- und Wassergehalt an. Die Viskosität und Elastizität des Sekretes werden verringert und die mukoziliäre Clearance dadurch gesteigert [55, 56, 67, 84, 85, 86]. Die Patienten berichten über eine Erleichterung der Sekretexpektoration, die sich auch objektivieren ließ [85]. Auch eine Erhöhung der Zilienschlagfrequenz am Flimmerepithel und eine antimikrobielle Wirkung sind belegt [33, 87, 88].

Allerdings ist die Wirkungsdauer der üblichen Amiloridlösungen begrenzt [54], so dass mit Hilfe der PD-Messmethode zunächst die maximal mögliche Konzentration ausgelotet werden musste [72]. Basierend auf den Resultaten dieser Untersuchung konnten Hüls et al. bei einer retrospektiven Studie nach 6 bis 8 Jahren konsequenter Amiloridinhalation im Vergleich zu CF-Patienten ohne Amiloridtherapie eine Verbesserung der Lungenfunktion nachweisen [89]. Weiterführende PD-Untersuchungen bei denen auf die Erfahrungen mit punktuellen Messungen zurückgegriffen wurde, befassten sich mit der Überprüfung verschiedener Amiloridpulver. In der aktuellen Form ist Amilorid als Pulverkapsel für die individuelle Anwendung mit herkömmlichen Pulverinhalatoren wie Aerolizer, Handihaler und Inhalator M rezeptierbar ist [90, 91]. Mittelfristig könnten länger wirkende Amiloridanaloga [92, 93, 94, 95, 96, 97], die derzeit teilweise in Klinischen-Phase-II bzw. -III-Studien geprüft werden, zur Verfügung stehen.

4.5 PD-Werte vor und nach Amilorid-Superfusion (chloridhaltig) und folgender Superfusion von Amilorid-Lösung in chloridfreiem Puffer (Natrium-Glukonat)

Die Superfusion mit Amilorid in chloridhaltigem Puffer allein bzw. mit Amilorid in chloridhaltigem Puffer und nachfolgende PD-Messung nach Superfusion von Amilorid in chloridfreiem Puffen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und zum großen Teil an verschiedenen Probanden durchgeführt. Dennoch fallen die bei vergleichbaren Bedingungen erzielten Messergebnisse sehr ähnlich aus, woran die Konstanz der unter Superfusionsbedingungen ermittelten PD-Werte abzulesen ist.

Es fanden sich bei Superfusion von Amilorid in chloridhaltiger (Nicht-CF: -13,5 $\pm$ 5,4 mV, CF: -15,2 $\pm$ 7,1 mV; p= 0,036) und chloridfreier Lösung (Nicht-CF: -22,1 $\pm$ 9,6 mV, CF: -16,6 $\pm$ 10 mV; p= 1,09E-24) ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen Probanden ohne CF und mit CF.

Eine höhere Sicherheit bei der Diagnostik ließ sich daraus allerdings nicht abzuleiten. In jüngster Zeit gab es daher Bemühungen, die zumindest im Rahmen der Routine-Diagnostik auf einen Verzicht der gesonderten Superfusion mit Natrium-Glukonat abzielen [98, 99]. Der dadurch bedingte Zeitgewinn ist besonders bei jungen Kindern von großem Vorteil.

Damit wird der Wert dieser Untersuchung im Rahmen der Forschung nicht geschmälert: Die Beurteilung der Testung des Chloridtransports über die „alternativen“ Kanäle [60] ist bei der Überprüfung neuer Pharmaka mittels PD-Messung von hoher Aktualität, wie auch in jüngster Zeit wieder gezeigt wurde [100, 101, 102].

4.6 Superfusion mit Isoproterenol nach Natrium-Kanalblockade und nach Aktivierung der alternativen Chlorid-Kanäle

Die Superfusion von Isoproterenol in chloridfreier Amilorid-Lösung. ergab eindeutige und signifikante Unterscheidungen zwischen Non-CF-Probanden und CF-Patienten (Nicht-CF: -30,3 ± 9,3 mV; CF: -13,3 ± 7,4 mV; p= 2,25E-22). In den Boxplot-Diagrammen der Absolutwerte war kaum noch eine Überlappung zu erkennen. Andere Arbeitsgruppen geben eine völlig fehlende Überschneidung an [76, 79, 103, 104, 105]. Dies dürfte allerdings angesichts der unten beschriebenen Übergangsbereiche wenig wahrscheinlich sein.
Wurde die prozentuale Änderung der PD-Werte (∆PD) nach Superfusion von Isoproterenol in chloridfreiem Amilorid bezogen auf die Änderung nach Amilorid in chloridhaltigem Puffer zur Beurteilung herangezogen, so ließ sich eine Überlappung der Ergebnisse völlig vermeiden (vgl. Abb. 3.11).
Somit kann durch die Superfusion mit Isoproterenol der cAMP-abhängige CFTR-Kanal stimuliert werden, wodurch es zu einem Chlorid-Ausstrom und damit zu einem Anstieg der PD kommt.
Von anderen Arbeitsgruppen werden verschiedene weitere Medikamente zur Stimulation des CFTR-abhängigen Chlorid-Transportes verwendet, z.B. Terbutalin, Genistein, Adenosin und ATP/UTP [79, 106, 107, 108].
Die hier verwendete Methode der PD-Messung wurde ferner zur Überprüfung der Wechselbeziehung zwischen CFTR-Funktionsstörung und Krankheits-Schweregrad der CF (einschließlich Pankreasfunktion und pulmonalem Status) eingesetzt [109, 110, 111, 112, 113, 114]. Hierbei korrelierte unter anderem die Chlorid-Leitfähigkeit mit dem Pankreasstatus (aber nicht mit der Lungenfunktion), während der Natrium-Transport mit dem Einsekundenwert (FEV_1) korrelierte.
Die insgesamt mäßigen Korrelationen zwischen den Ergebnissen der PD-Messungen und dem Genotypus bzw. dem Phänotypus reflektieren wahrscheinlich die begrenzte Wechselbeziehung zwischen dem Phänotypus und

dem Ionentransport, da CFTR-unabhängige Einflussfaktoren ebenfalls eine wichtige Rolle bei dem Schweregrad der klinischen Manifestation eine Rolle spielen (unterschiedliche Therapie, Klima oder modifizierende Gene etc. [7, 80, 111, 113, 114].

4.7 Übersicht über die PD-Ergebnisse

Vergleicht man jeweils alle Mittelwerte vor und nach den verschiedenen Pharmaka miteinander (Abb. 3.13), gewinnt man den Eindruck, dass die diagnostische Sicherheit bei den Ausgangswerten und nach Superfusion des Adrenergikums Isoproterenol der Applikation des Natriumkanalblockers Amilorid und der chloridfreien Lösung Natriumglukonat überlegen ist.
Eine zuverlässige Diagnostik kommt allerdings ausschließlich der prozentualen Änderung der PD-Werte nach Isoproterenol zu, wenn sie auf die Spannung nach Amilorid bezogen werden (Abb. 3.11; s. auch Kap. 3.6.2).
Dies bestätigen auch die nachfolgenden Ausführungen zur Sensitivität und Spezifität.

4.8 Sensitivität und Spezifität der PD-Messung mittels Superfusion

Um die bisherigen diagnostischen Möglichkeiten mit den Änderungen durch die Superfusionsmethode zu vergleichen, wurde für die Superfusionsmethode die prozentuale Änderung der PD-Werte (ΔPD) nach Superfusion von Isoproterenol bezogen auf die PD-Werte nach Amilorid in chloridhaltigem Puffer gewählt, da hierdurch die Verbesserungen durch die Superfusionsmethode als Gesamtuntersuchung am besten beurteilbar wurde. Es ließ sich eine entscheidende Verbesser-

ung der Diagnostik erreichen. Je nach verwendetem Grenzwert ergab sich durch die präzise Stimulation CFTR-abhängiger Chloridkanäle am Messort eine maximale Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 98,6 %, während die alleinige Berücksichtigung der Ausgangswerte mit einer Sensitivität von 59 % und einer Spezifität von 93 % eine große diagnostische Unsicherheit beinhaltete. Damit bestätigten sich frühere Erfahrungen [49, 68 103]. Sofern nicht andere Ionentransportstörungen vorliegen, die sich klinisch ebenfalls unter dem Bild der Mukoviszidose manifestieren können [115, 116, 117], steht mit der nasalen Potenzialdifferenzmessung ein zuverlässiges diagnostisches Instrument zur Verfügung.

Bei Grenzfällen kann man auf die wesentlich aufwändigere in-vitro-Diagnostik am Darmepithel mittels Kurzschlussstrommessung in der Ussing-Kammer zurückgreifen. Sie hat den Vorteil, dass auch Substanzen, die für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen sind, eingesetzt werden können [103, 118].

4.9 Abschließende Bilanz und Ausblick

Es lässt sich folgendes Resümee ziehen: Durch die PD-Messung in Verbindung mit der Superfusion der Pharmaka kann die Unterscheidung zwischen CF und NON-CF deutlich sicherer getroffen werden als durch die bisher verfügbaren diagnostischen Verfahren. Allerdings ist die PD-Messung aufgrund der Anforderungen an die Kooperation erst ab einem Alter von ca. 5 - 6 Jahren anwendbar, weshalb zur reinen Ausschlussdiagnostik nur klinisch spät auffällige Patienten davon profitieren können. Aber gerade die Mutationen mit untypischem und mildem Verlauf manifestieren sich häufiger erst spät und zeigen oft nicht eindeutige Befunde in der Schweißanalyse nach Pilocarpinstimulation, die immer noch als Standardtest gilt, weil sie wenig aufwändig ist.

Nach Etablierung der nasalen PD-Messung wurde die Methode in Gießen inzwischen dahingehend modifiziert, dass durch eine rektale PD-Messung auch Kinder unter 6 Jahren bis hin zum Neugeborenenalter untersucht werden können.

Die Überprüfung neuer Therapieansätze ist neben der Diagnostik ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich der PD-Messung. Je nach Applikationsform des eingesetzten Medikamentes kommen die punktuelle Messung mit Messsonden oder die kontinuierliche Superfusionsmethode zur Anwendung.
Von besonderem Interesse ist die Frage, welche Medikamente bei Mutationen mit einer CFTR-Restfunktion ggf. eine Steigerung des transepithelialen Chloridtransports oder durch Natrium-Kanal-Blockade eine Normalisierung der PD bewirken können. In Early-Phase-Studien konnte ein überzeugender Wirkungsnachweis erbracht werden [119, 120]. Nicht minder wichtig ist die Objektivierung der Effekte auf dem Gebiet der Gentherapie. So ließ sich per PD-Messung dokumentieren, dass virale Vektoren [121, 122, 123] eine transgene Übergabe von intaktem CFTR ermöglichen, wobei der Erfolg nur passager ist [104].
Auch bei Substanzen, wie Gentamycin und PTC 124, die ein weiteres Auslesen von Stopmutationen (Klasse I, z.B. W1282X) bewirken sollen, kann der Erfolg mittels PD-Messung überprüft werden [124, 125, 126, 127, 128].

International wird die Methode der nasalen Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion von Amilorid, chloridfreier Lösung und einem Betamimetikum (meist Isoproterenol) als wichtiger Fortschritt in der Mukoviszidose-Diagnostik eingeschätzt, auch wenn die Bemühungen um eine Standardisierung der Methodik noch nicht abgeschlossen sind [23, 80]. Künftige Anstrengungen müssen vor allem der Vereinfachung des Messvorgangs gelten, da die PD-Messung wegen des großen Aufwandes bisher nur an wenigen Kliniken durchgeführt werden kann.

5 Zusammenfassung

Hintergrund:
Die Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz (PD) stellt ein wichtiges Hilfsmittel im Rahmen der Mukoviszidose-Diagnostik und -Forschung dar.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mukoviszidose-Diagnostik durch Einführung der Superfusionsmethode bei der PD-Messung zu verbessern.

Methodik:
In einer initialen Messreihe wurden im Rahmen der konventionellen PD-Messung Werte für die nasale Applikation von Amilorid mittels Spray erhoben. In einer zweiten Versuchsanordnung wurde der konventionelle Versuchsaufbau mit Millivoltmeter, Silberchloridelektroden, Agargelbrücken, subkutaner Kanüle (Verbindung zur Referenzelektrode) und Messkatheter (Verbindung zur Messelektrode) über Dreiwegehähne mit den Superfusionslösungen verbunden, die zur Applikation verschiedener Pharmaka dienten. Nach der Ausgangsmessung wurden nacheinander die Superfusionslösungen (1. Amilorid, 2. Amilorid in chloridfreiem Puffer und 3. Amilorid in chloridfreiem Puffer + Isoproterenol) perfundiert, wobei jedes Pharmakon in einer eigenen Messreihe untersucht wurde. Insgesamt nahmen 162 Probanden ohne CF (Nicht-CF) in einem Alter von 0,2 bis 57,2 Jahre und 49 Mukoviszidose(CF)-Patienten in einem Alter von 0,1 bis 56,3 Jahre an den Messungen teil.

Ergebnisse:
Bei den PD-Ausgangswerten (Nicht-CF: -29,5 $\pm$ 9 mV, CF: -48,1 $\pm$ 13,9 mV; p = 8,02639E-73), sowie den Werten nach Amilorid-Nasenspray (Nicht-CF: -16,3 $\pm$ 7,5 mV, CF: -28,5 $\pm$ 5,2 mV; p= 0,0002) waren zwar statistisch signifikante Unterschiede zwischen Nicht-CF-Probanden und CF-Patienten zu beobachten.

Diese erlaubten jedoch keine ausreichende diagnostische Zuordnung. Bei Superfusion von Amilorid in chloridhaltiger und Amilorid in chloridfreier Lösung ergaben sich zwar ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen Probanden ohne CF und CF-Patienten, aber erst die Superfusion von Isoproterenol in chloridfreier Amilorid-Lösung (Nicht-CF: -30,3 $\pm$ 9,3 mV, CF: -13,3 $\pm$ 7,4 mV; p= 2,25E-22) ermöglichte eine eindeutige Trennung mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 98,6 %, während die Basalwerte ohne pharmakologische Tests lediglich eine Sensitivität von 59 % und eine Spezifität von 93 % aufwiesen.

Fazit:

Durch die Superfusion kann die Unterscheidung zwischen CF-Patienten und NON-CF-Probanden deutlich sicherer getroffen werden. Allerdings ist die Methode wegen der Anforderungen an die Kooperation erst ab einem Alter von ca. 5 - 6 Jahren anwendbar. Dennoch ist diese Form der PD-Diagnostik als deutliche Bereicherung anzusehen, vor allem bei Mutationen mit untypischem und mildem Verlauf, die meist erst spät diagnostiziert werden, da in diesen Fällen oft weder die Schweißanalyse noch die Genanalyse eindeutige Befunde liefert.

6 Summary

Background

The measurement of the nasal transepithelial potentialdifference (PD) represents an important aid in the context of the diagnostics and research of cystic fibrosis (CF). A goal of this work was to improve the cystic fibrosis diagnostics by means of introduction of the superfusion method.

Methods

In initials a series of measurements were done in the context of the conventional nasal PD measurement to get values for the nasal application of Amiloride by means of spray. In a second experimental assembly the conventional experimental setup with millivoltmeter, silver chloride electrodes, agar yellow backs, subcutaneous tube (connection to the reference electrode) and measuring catheter (connection to the test electrode) was connected by means of three-way cocks with the superfusion solutions, which served for the application of different medicines. After the basic measurement successively the superfusion solutions (1st Amiloride, 2nd Amiloride in chloride-free buffer and 3rd Amiloride in chloride-free buffer + Isoproterenol) by-founds, whereby each medication in its own series of measurements was examined. Altogether 162 healthy participants at an age from 0.2 to 57.2 years and 49 cystic fibrosis patients at an age from 0.1 to 56.3 years participated in the measurements.

Results

With the PD initial values (NON-CF: -29,5 $\pm$ 9 mV, CF: -48,1 $\pm$ 13,9 mV; p = 8,02639E-73) as well as the values after nasal application of Amiloride by means of spray (NON-CF: -16,3 $\pm$ 7,5 mV, CF: -28,5 $\pm$ 5,2 mV; p= 0,0002) statistically significant differences between healthy participants and CF patients were to be observed. This permitted however no sufficient diagnostic allocation. The

superfusion of Amiloride and Amiloride in chloride-free solution showed likewise significant differences between healthy participants and CF patients, but only the superfusion of Isoproterenol in chloride-free Amiloride solution (NON-CF: -30,3 ± 9,3 mV, CF: -13,3 ± 7,4 mV; p= 2,25E-22) brought a clear separation with a sensitivity of 100 % and a specificity of 98,6 %, while the basal values without pharmacologic tests exhibited only a sensitivity of 59 % and a specificity of 93 %.

Conclusion

The distinction between CF patients and NON CF participants can be met by the superfusion more surely. However for this method cooperation is necessary, starting from an age of approx. 5 - 6 years, it is possible.

But the CF mutations with atypical and mild process are noticeable more frequently only late and often do not show clear findings in the sweat-test and no clear clinical findings. Also more frequently the gene analysis is not clear in these cases, so that with the superfusion method also a further possibility insists to get additional information on the way to the diagnosis.

7 Literaturliste

[1] Rosenstein, B.J., Langbaum, T.S.: Diagnosis. In: Taussig, L.M. (ed.): Cystic fibrosis. Thieme-Stratton Inc., Stuttgart, New York, 85-114 (1984)

[2] Rosenstein, B.J., Levine, J., Langbaum, T.S., Kennedy, T.: Cystic fibrosis in adults: delayed diagnosis in three siblings, South Med. J., 79: 319-322 (1986)

[3] Wainwright, B.J., Scambler, P.J., Schmidtke, J., Watson, E.A., Law Hai-Yang, Faval, M., Cooke, H.J., Eiberg, H., Williamson, R.: Location of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. Nature 318: 384-385 (1985)

[4] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M.L., Ianuzzi, M.C., Collins, F.S. Tsui, L.C.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245: 1066-1073 (1989)

[5] Rommens, J.M., Ianuzzi, M.C., Kerem, B.S., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L.C., Collins, F.S.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 245: 1059-1065 (1989)

[6] Kerem, B.S., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080 (1989)

[7] Lindemann, H., Tümmler, B., Dockter, G. (Hrsg.): Mukoviszidose – Zystische Fibrose. 4. Aufl., Thieme Stuttgart-New York 2004

[8] Zielenski, J., Tsui, L.C.: Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu. Rev. Genet. 29: 777-807 (1995)

[9] Zielenski, J.: Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 67: 117-33 (2000)

[10] Galatti, S.: Molekularbiologische Methoden für den Mutationsnachweis. In: Reinhardt, D., Götz, M., Kraemer, R., Schöni, M.H. (Hrsg.). Cystische Fibrose. Springer, Berlin 2003, S. 214-215

[11] Kerem, E., Corey, M., Kerem, B.-S., Rommens, J., Markiewicz, D., Levison, H., Tsui, L.-C., Durie, P.: The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis - analysis of the most common mutation (.F508). New Engl. J. Med. 323: 1517-1522 (1990)

[12] Super, M.: Milestones in cystic fibrosis. Brit. Med. Bulletin 48: 717-737 (1992)

[13] Frömter, E.: Die Ionentransportstörung bei der Mukoviszidose. Aktueller Wissensstand. Pneumologie 44: 1144-1146 (1990)

[14] Tabcharani, J.A., Rommens, J.M., Hou, Y.X., Chang, X.B., Tsui, L.C., Riordan, J.R., Handrahan, J.W.: Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. Nature 366: 79-82 (1993)

[15] Gibson, L.E., Cooke, R.E.: A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by electrophoresis. Pediatrics 23: 545-549 (1959)

[16] Bijman, J., Frömter, E.: Direct demonstration of high transepithelial chloride conductance in normal human sweat duct which is absent in cystic fibrosis. Pflügers Arch. 407: 123-127 (1986)

[17] Bijman, J., Quinton, P.: Permeability properties of cell membranes and tight junctions of normal and cystic fibrosis sweat ducts. Pflügers Arch. 408: 505-510 (1987)

[18] Knowles, M., Stutts, M.J., Spock, A., Fischer, N., Gatzy, J.T., Boucher, R.C.: Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. Science 221: 1067-1069 (1983)

[19] Reddy, M.M., Quinton, P.M.: Localisation of Cl-conductance in normal and Cl-impermeability in cystic fibrosis sweat duct epithelium. Am. J. Physiol. 257: C727-C735 (1989)

[20] Delmarco, A., Pradal, U., Cabrini, G., Bonizzato, A., Mastella, G.: Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. Eur. Respir. J. 10: 1145-1149 (1997)

[21] Highsmith, W.E., Burch, L.H., Zhou, Z., Olsen, J.C., Boat, T.E., Spock, A., Gorvoy, J.D., Quittell, L., Friedman, K.J., Silverman, L.M., Boucher, R.C., Knowles, M.R.: A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentration. New Engl. J. Med. 331: 974-980 (1994)

[22] Wheeler, W.B., Colton, H.R.: Cystic fibrosis: current approach to diagnosis and management. Pediatr. Rev. 9: 241-248 (1988)

[23] Schüler, D., Semet-Gaudelus, I., Wilschanski, I., Ballmann, M., Dechau-Edelmann, A., Hug, M., Leal, T., Lebacq, J., Lenoir, G., Stanke Wallemacq, P., Tümmler, B., Knowles, M.R.: Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurement. J. Cyst. Fibros. 3: 151-155, European Thematic Network for Cystic Fibrosis (2004)

[24] Knowles, M., Stutts, M.J., Yankaskas, J.R., Gatzy, J.T., Boucher, R.C.: Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. Clin. Chest Med. 7: 285-297 (1986)

[25] Boucher, R.C.: Human airway ion transport. Part one. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150: 271-281 (1994)

[26] Boucher, R.C.: Human airway ion transport. Part two. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150: 581-593 (1994)

[27] Anderson, M.P., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., Welsh, M.J.: Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. Science 251: 679-682 (1991)

[28] Deridas, S., Guggino, W.B: CFTR: Domains, structure and function. J. Bionerg. Biomembr. 29: 443 (1993)

[29] Jentsch, T.J., Günther, W: Chloride channels: an emerging molecular picture. Bio. Essay 19: 117-126 (1997)

[30] Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., Guggino, W.B: CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. Physiol. Rev. 79: 145-66 (1999)

[31] Boucher, R.C., Knowles, M.R., Stutts, M.J., Gatzy, J.T.: Epithelial dysfunction in cystic fibrosis lung disease. Lung 161: 1-17 (1983)

[32] Knowles, M., Gatzy, J., Boucher, R.: Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. J. Clin. Invest. 71: 1410-1417 (1983)

[33] Boucher, R.C., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Cantley, L., Gatzy, J.T.: Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. J. Clin. Invest. 78: 1245-1252 (1986)

[34] Jiang, C., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., Mccray P.B. Jr., Miller, S.S.: Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. Science 262: 424-427 (1993)

[35] Smith, J.J., Karp, P.H., Welsh, M.J.: Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia. J. Clin. Invest. 93: 1307-1311 (1994)

[36] Welsh, M.J., Smith, A.E.: Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 73: 1251-1254 (1993)

[37] Anderson, M.P., Welsh, M.J.: Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 6003-6007 (1991)

[38] Bangel N., Rudack C., Weber W.M., Kusche K.: Different expression levels of ENaC from human nasal epithelium in CF and non-CF tissue; acta physiologica 2006; Acta Physiologica Congress; Abstract number: 12914

[39] Welsh, M.J., Tsui, L., Boat, T.F., Beaudet, A.L.: Cystic fibrosis. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Frederickson, D.S.(eds.): The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York 1995, p. 3799-3876

[40] Weber, K., Barth, C., Schüler, D., Bittner-Dersch, P., Pabst, J., Geidel, C., Hüls, G., Lindemann, H.: Zum Einfluß von Tiotropium auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenzmessung. Atemw.-Lungenkrkh. 30, 38-42 (2004)

[41] Lindemann, H.: Pulmonaler Verlauf der Mukoviszidose beim Kind. Atemw.-Lungenkrkh. 19: 503-509 (1993)

[42] Ussing H.H., Zerahn, K.: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta physiol. Scand. 23: 112-127 (1950)

[43] Lassen, U.V., Rasmissen, B.E.: Use of microelectrodes for measurement of membrane potentials. In: Giebish, G. (ed.): Membrane transport in biology, Berlin 1978, 169-203

[44] Knowles, M., Buntin, W.H., Bromberg, P., Gatzy, J.T., Boucher, R.C.: Measurement of transepithelial electric potential difference in the trachea and bronchi of human subjects in vivo. Am. Rev. Respir. Dis. 126: 108-112 (1982)

[45] Ballke, E.H.: Die transepitheliale elektrische Potenzialdifferenz (tPd) der respiratorischen und gastrointestinalen Schleimhaut im Kindesalter. Diss. Univ. Greifswald (1990)

[46] Veeze, H.J., Sinaasappel, M., Bijman, J., Bouquet, J., De Jonge, H.R.: Ion transport abnormities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. Gastroenterology 101: 398-403 (1991)

[47] Knowles, M., Carson, J.L., Collier, A.M., Gatzy, J.T., Boucher, R.C.: Measurement of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. Am. Rev. Respir. Dis. 124: 484-490 (1981)

[48] Cogswell, J.J., Reidon, R.A., Taylor, B.: Supportive lung disease in sisters mimicking cystic fibrosis. Arch. Dis. Child. 49: 520 (1974)

[49] Knowles, M., Gatzy, J., Boucher, R,: Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. New Engl. J. Med. 305: 1489-1495 (1981)

[50] Knowles, M.R., Murray, G.F., Shallal, J.A., Gatzy, J.T., Boucher, R.C.: Bioelectric properties and ion transport in excised human bronchi. Physiologist 23: 100 (1980)

[51] Kleyman, T.R., Cragoe, E.J.: Amiloride and its analogs as tools in the study of the ion transport. J. Membrane Biol. 105: 1-21 (1988)

[52] Lindemann, H.: Amiloridinhalation. Pneumologie 50: 841-844 (1996)

[53] Bowler, I.M., Kelman, B., Worthington, D., Littlewood, J.M., Watson, A., Conway, S.P., Smye, S.W., James, S.L., Sheldon, T.A.: Nebulized amiloride in respiratory exacerbations of cystic fibrosis: a randomised controlled trial. Arch. Dis. Child. 73: 427-430 (1995)

[54] Hofmann, T., Stutts, M.J., Ziersch, A., Rückes, C., Weber, M., Knowles, M.R., Lindemann, H., Boucher, R.C.: Effects of topically delivered benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 1844-1849 (1998)

[55] Knowles, M., Church, N.L., Waltner, W.E., Yankaskas, J.R., Gilligan, P., King, M., Edwards, L., Helms, R.W., Boucher, R.: A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. New Engl. J. Med. 322: 1189-1194 (1990)

[56] Middleton, P.G., Geddes, D.M., Alton, E.W.F.W.: Effect of amiloride and saline on nasal mucociliary clearance and potential difference in cystic fibrosis and normal subjects. Thorax 48: 812-816 (1993)

[57] Sauder, R.A., Chesrown, S.E., Loughlin, G.M.: Clinical application of transepithelial potential differences measurements in cystic fibrosis. J. Pediatr. 111: 353-358 (1987)

[58] Stewart, E.J., Cinnamond, M.J., Nichols, P., Stanford, C.F.: The effects of diuretics on nasal transmucosal potential difference. Clin. Otolaryngol. 17: 351-353 (1992)

[59] Ziersch, A.: Optimierung der Mukoviszidose-Diagnostik und Überprüfung neuer Therapie-Ansätze auf der Basis der nasalen Potenzialdifferenz-Messung, Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen 1999

[60] Alter, H., Geidel, C., Krahl, A., Hüls, G., Lindemann, H.: Moderne elektrophysiologische CF-Diagnostik in vivo. Monatsschr. Kinderheilkd. 2: 166 (1999)

[61] Cotton, C.U., Stutts, M.J., Knowles, M. R.: Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis nasal epithelium. Clin. Res. 33: 463 A (1985)

[62] Frizzel, R.A., Rechkemmer, G., Shoemaker, R.I.: Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. Science 233: 558-560 (1986)

[63] Knowles, M., Clarke, L., D.V.M., Boucher, R.C.: Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. New Engl. J. Med. 325: 533-538 (1991)

[64] Welsh, J.M., Liedtke, C.M.: Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia. Nature 322: 467-470 (1986)

[65] Welsh, M.J.: Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia. FASEB J. 4: 2718-2725 (1990)

[66] Boucher, R.C., Cheng, E.H., Paradiso, A.M., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Earp, H.S.: Chloride secretory response of cystic fibrosis human airway epithelia; preservation of calcium but not protein kinase C- and A-dependent mechanisms. J. Clin. Invest. 84: 1424-1431 (1989)

[67] Boucher R.C., Bromberg P.A., Gatzy J.T. : Airway transepithelial electric potential in vivo: species and regional differences. J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol. 48: 169-176 (1980)

[68] Ünal-Maelger, Ö.H., Urbanek, R.: Stellenwert der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD) am respiratorischen Epithel in der Mukoviszidose-Diagnostik. Monatsschr. Kinderheilkd. 136: 76-80 (1988)

[69] Hüls, G., Hofmann, T, Senier, I., Lindemann, H.: Potenzialdifferenz am respiratorischen Epithel: Stellenwert in Diagnostik und klinischer Forschung bei Mukoviszidose. Atemw.-Lungenkrkh. 18: 258-259 (1994)

[70] Hofmann, T.: Kindgerechte Bestimmung der transepithelialen Potenzialdifferenz am respiratorischen Epithel der Nase. Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen (1994)

[71] Boenninghaus, H.G: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 9. Aufl.: S. 169 (1986)

[72] Hofmann, T., Senier, I., Bittner, P., Hüls, G., Schwandt, H-J., Lindemann, H.: Aerosolized Amiloride: Dose effect on nasal bioelectric properties, pharmacokinetics, and effect on sputum expectoration in patients with cystic fibrosis J. Aerosol Medicine 10: 147-158 (1997)

[73] Fülgraf G., Palm D. (Hrsg.): Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie. 10. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Lübeck-Ulm 1997

[74] Sachs, L.: Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin (2004**)**

[75] Alton, E.W., D. Currie, R. Logan-Sinclair, J.O. Warner, M.E. Hodson, Geddes D.M.: Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. Eur. Respir. J. 3: 922–926 (1990)

[76] Knowles, M. R., A. M. Paradiso, And R. C. Boucher: In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. Hum. Gene Ther. 6: 445–455, (1995)

[77] Hofmann T., Böhmer O, Hüls G, Terbrack Hg, Bittner-Dersch P , Klingmüller V, Heerd V, Lindemann H: Conventional and modified nasal potential-difference measurement in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155: 1908-1913 (1997)

[78] Hay J.G. and Geddes D.M.: Transepithelial potential difference in cystic fibrosis. Thorax 40: 493–496 (1985)

[79] Middleton P.G., Geddes D.M., Alton E.W.: Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium; Eur. Respir. J. 7: 2050– 2056 (1994)

[80] Rowe S, Accurso F, Clancy J.P.: Detection of CFTR activity in early phase clinical trials. Proc. Am. Thorac. Soc.4: 387–398 (2007)

[81] Michael P. Boyle, Marie Diener-West, Laura Milgram, Michael Knowles, Carla Foy, Pamela Zeitlin, and Thomas Standaert: A Multicenter Study of the Effect of Solution Temperature on Nasal Potential Difference Measurements. Chest 124: 482 - 489 (2003)

[82] Standaert T.A., Boitano L., Emerson J., Milgram L.J.H, Konstan M.W., Hunter J., Berclaz P.Y., Brass L., Zeitlin P.L., Hammond K., Davies Z., Foy C., Noone P.G., Knowles M.R.: Standardized Procedure for Measurement of Nasal Potential Difference: An Outcome Measure in Multicenter Cystic Fibrosis Clinical Trials. Pediatric Pulmonology 37: 385-392 (2004)

[83] Hyams, D.E.: Amiloride: a review. society of medicine. International congress and symposium series 44: 65-73 (1981)

[84] Köhler, D., App, E., Schmitz-Schuhmann, M., Würtemberger, G., Matthys, H.: Inhalation of amiloride improves the mucociliary and the cough clearance in patients with cystic fibrosis. Eur. J. Respir. Dis. 69: 319-326 (1986)

[85] Lindemann, H., Becker, T., Bittner, P., Boldt, A., Hofmann, T., Schwandt, H.J.: Sekretelimination bei CF-Patienten unter Amiloridinhalation Pneumologie 44: 1148-1150 (1990)

[86] App, E.M., King, M., Helfesrieder, R., Köhler, D., Matthys, H.: Acute and long-term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease Am. Rev. Respir. Dis. 141: 605-612 (1990)

[87] Benedetto, G.D., Lopez-Vidriero, M.T., Carratu, L., Clarke, S.W.: Effect of amiloride on human bronchial ciliary activity in vitro. Respiration 57: 37-39 (1990)

[88] Cohn, R.C., Rudzienski, L., Putnam, R.W.: In vitro antimicrobial activity of amiloride analogs against Pseudomonas. Chemotherapy 38: 232-237 (1992)

[89] Hüls G, Müller M, Von Bredow C, Heuere, Paul K, Ulbrich K, Lindemann H.: Long term efficacy of aerosolized amiloride in paediatric patients with cystic fibrosis. Proceedings of 25th European Cystic Fibrosis Conference, Genua, 251-253 (2002)

[90] A. Krahl, C. Geidel, H. Alter, T. Hofmann, P. Bittner-Dersch, G. Hüls, J. Pabst, H. Lindemann: Effective amiloride administration to CF-patients by powder inhalation. Pediatr. Pulmonol. Suppl. 17, 280 [abstract] (1998)

[91] Hüls G, Bittner-Dersch P, Fegbeutel C, Müller M, Pabst J, Lindemann H: Amiloride dry powder inhalation in CF patients. Atemw. Lungenkrkh. 29: 189-190 [abstract] (2003)

[92] Hofmann T, Ziersch A , Senier I, Blank U , Weber Wm, Bittner-Dersch P, Hüls G, Lindemann H: Cystic fibrosis respiratory epithelium: Effects of topically applied benzamil and amiloride on nasal PD and inhibition of sodium absorption. Eur. Resp. J. 9, Suppl. 23, 175s [abstract] (1996)

[93] Blank U, Clauss W , Hofmann T , Lindemann H , Hüls G , Ziersch A , Weber W.M.: Sodium channel blockers in primary cultured cystic fibrosis nasal epithelium: Effects of amiloride, benzamil and phenamil. Eur. Resp. J. 9, Suppl. 23, 180s [abstract] (1996)

[94] Blank U, Rückes C , Clauss W , Hofmann T , Lindemann H, Münker G , Weber W-M : Cystic fibrosis and non-cystic-fibrosis human nasal epithelium show analogous Na^+ absorption and reversible block by phenamil. Eur. J. Physiol. 434: 19-24 (1997)

[95] Andrew J. Hirsh, Bruce F. Molino, Jianzhong Zhang, Nadezhda Astakhova, William B. Geiss, Bruce J. Sargent, Brian D. Swenson, Alexander Usyatinsky, Michael J. Wyle, Richard C. Boucher, Rick T. Smith, Andra Zamurs, M. Ross Johnson. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Novel 2-Substituted Pyrazinoylguanidine Epithelial Sodium Channel Blockers: Drugs for Cystic Fibrosis and Chronic Bronchitis. J. Med. Chem. 49: 4098-4115 (2006)

[96] Rückes-Nilges C., Weber U., Popp C., Fryen A., Klimek T., Glanz H., Lindemann H., Münker G., Clauss W., Weber·W.-M.: Ionentransporte über die Nasen- und Nasennebenhöhlenschleimhaut bei Mukoviszidose und chronischer Sinusitis. HNO 47:157–166 (1999)

[97] Rodgers H.C., Knox A.J.: The effect of topical benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis. Eur. Respir. J. 14:693–696 (1999)

[98] Moerkerk. W.: Neue Optionen der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung im Rahmen der Mukoviszidose-Diagnostik. Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen 2008

[99] Schüler D, Moerkerk W, Alter H, Weber K, Geidel C, Hüls G, Lindemann H: Vereinfachung der CF-Diagnostik bei der nasalen transepithelialen Potentialdifferenzmessung mittels Superfusion. Monatsschr. Kinderheilkd. 148: 327–328 [Abstract] (2000)

[100] Mall M., Wissner A., Gonska T, Calenborn D., Kuehr J., Brandis M., Kunzelmann K.: Inhibition of Amiloride-Sensitive Epithelial Na^+ Absorption by Extracellular Nucleotides in Human Normal and Cystic Fibrosis Airways, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 23: 755-761 (2000)

[101] Deterding R, J. Mundahl, C. Shaffer, D. Kellerman, D. Mathews, L. Lavange, J. Goren, A. Quittner, J. Williams, B. Ramsey: Safety and tolerability of INS37217 inhalation solution, a novel P_2Y_2 receptor agonist, in patients with mild to moderate cystic fibrosis: results of a phase ½ multi-center study. Pediatr. Pulmonol. Suppl. 24: 258 [abstract] (2002)

[102] Zeitlin P., A. Brody, D. Waltz, K. Mccoy, T.L. Williams, L. Molina: A safety and pharmacokinetic assessment of inhaled administration of Moli 1901 in cystic fibrosis patients. Pediatr. Pulmonol. Suppl. 24: 259 [abstract] (2002)

[103] Lindemann H., Schüler D., Ballmann M., Hebestreit A., Hofmann T., Kersting U., Mall M., Reinhardt D.: Klinischer Stellenwert der modernen elektrophysiologischen Diagnostik bei Mukoviszidose (zystische Fibrose). Monatsschr. Kinderheilkd. 149: 258-264 (2001)

[104] Knowles, M. R., Hohneker, K. W., Zhou, Z., Olsen, J. C., Noah, T. L., Hu, P.-C, Leigh, M. W., Engelhardt, J. F., Edwards, L. J., Jones, K. R., Grossman, M, Wilson, J. M., Johnson, L. G., Boucher, R. C.: A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis New Engl. J. Med. 333: 823-31 (1995)

[105] Derichs N, Rokahr C, Laabs U, Stolpe C, Siebert B, Tümmler B, Ballmann M.: Diagnosis cystic fibrosis?: comparison of nasal potential difference, intestinal current measurement and sweat chloride in patients with borderline sweat test and non-informative cftr mutation analysis. Pediatric Pulmonology, Vol. 37, Suppl. 26: 201-205 [abstract] (2004)

[106] Hentchel-Franks K, Lozano D, Eubanks-Tarn V, Cobb B, Fan L, Oster R, Sorscher E, Clancy Jp.: Activation of airway Cl^- secretion in human subjects by adenosine. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 31:140–146 (2004)

[107] Illek B, Zhang L, Lewis N.C., Moss R.B., Dong J.Y., Fischer H.: Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein. Am. J. Physiol. 277: C833–C839 (1999)

[108] Knowles M.R., Clarke L.L., Boucher R.C.: Extracellular ATP and UTP induce chloride secretion in nasal epithelia of cystic fibrosis patients and normal subjects in vivo. Chest 101: 60S–63S (1992)

[109] Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, Martin S, Corey M, Tsui L.C., Durie P.: Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and *in vivo* transepithelial potentials. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 174: 787–794 (2006)

[110] Fajac I, Hubert D, Guillemot D, Honore I, Bienvenu T, Volter F, Dall'ava-Santucci J, Dusser D.J..: Nasal airway ion transport is linked to the cystic fibrosis phenotype in adult patients. Thorax 59:971–976 (2004)

[111] Ho L.P, Samways J.M, Porteous D.J, Dorin J.R, Carothers A, Greening A.P, Innes J.A.: Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. Eur. Respir. J. 10: 2018–2022 (1997);

[112] Thomas S.R, Jaffe A, Geddes D.M, Hodson M.E, Alton E.W.: Pulmonary disease severity in men with ΔF508 cystic fibrosis and residual chloride secretion. Lancet 353: 984–985 (1999)

[113] Wallace H.L., Barker P.M., Southern K.W.: Nasal airway ion transport and lung function in young people with cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168: 594–600 (2003)

[114] Walker L.C., Venglarik C.J., Aubin G., Weatherly M.R., Mccarty N.A., Lesnick B., Ruiz F., Clancy J.P., Sorscher E.J.: Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155: 1684–1689 (1997)

[115] Drumm Mitchell, L.: Modifier genes and variation in cystic fibrosis. Respir. Res. 2: 1251-1254 (2001)

[116] Accurso, F.J. Sontag, M.K.: Seeking modifyer genes in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167: 289 (2003)

[117] Kerem E., Bistritzer T., Hanukoglu A., Hofmann T., Zhou Z., Bennett W., Maclaughlin E., Barker P., Nash M., Quittell L., Boucher R., Knowles M.: Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. New Engl. J. Med. 341: 156-62 (1999)

[118] Veeze, H.J., Halley, D.J.J., Bijman, J., De Jongste, J.C., De Jonge, H.R., Sinaasappel, M.: Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients.J. Clin. Invest. 93: 461-466 (1994)

[119] Zeitlin P.L., Boyle M.P., Guggino W.B., Molina L.: A phase I trial of intranasal Moli1901 for cystic fibrosis. Chest 125: 143–149 (2004)

[120] Middleton P.G., Pollard K.A., Wheatley J.R.: Hypertonic saline alters ion transport across the human airway epithelium. Eur. Respir. J. 17: 195–199. (2001)

[121] Zabner, J., Ramsey, B. W., Meeker, D. P., Aitken, M. L., Balfour, R. P., Gibson, R. L., Launspach, J., Moscicki, R. A., Richards, S. M., Standaert, T. A., Williams-Warren, J., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., Welsh, M. J.: Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. J. Clin. Invest. 97: 1504–1511 (1996)

[122] Hay J.G., Mcelvaney N.G., Herena J., Crystal R.G. Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. Hum. Gene Ther. 6: 1487–1496 (1995)

[123] Flotte T.R., Zeitlin P.L., Reynolds T.C., Heald A.E., Pedersen.P., Beck S., Conrad C.K., Brass-Ernst L., Humphries M., Sullivan K., Wetzel R., Taylor G., Carter B.J., Guggino W.B.: Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. Hum. Gene Ther. 14: 1079–1088 (2003)

[124] Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E: Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. New Engl. J. Med. 349: 1433–1441 (2003)

[125] Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, Kerem B, Kerem E.: A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161: 860–865 (2000)

[126] Clancy Jp, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene, R., Sorscher, E. J., Bedwell, D. M.: Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163: 1683–1692 (2001)

[127] Welch E.M, Barton E.R., Zhuo J., Tomizawa Y., Friesen W.J., Trifillis P., Paushkin S. Patel M., Trotta C.R., Hwang S., Wilde R.G., Karp G., Takasugi J., Chen G., Jones S., Ren H., Moon Y.C., Corson D., Turpoff A.A., Campbell J.A., Conn M.M., Khan A., Almstead N.G., Hedrick J., Mollin A., Risher N., Weetall M., Yeh S., Branstrom A.A., Colacino J.M., Babiak J., Ju W.D., Hirawat S., Northcutt V.J., Miller L.L., Spatrick P., He F., Kawana M., Feng H., Jacobson A., Peltz S.W., Sweeney H.L.: PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. Nature 447 (7140): 87-91 (2007)

[128] Hirawat S., Welch E.M., Elfring G.L., Northcutt V.J., Paushkin S., Hwang S., Leonard E.M., Almstead N.G., Ju W., Peltz S.W., Miller L.L.: Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. J. Clin. Pharmacol. 47: 430-44 (2007)

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Lindemann bedanken, der mir immer mit Rat und Tat bei allen Fragen und Problemen zur Seite gestanden hat.
Weiterhin gilt mein besonderer Dank allen Mukoviszidose Patienten und Probanden, die sich für Messungen zur Verfügung gestellt haben, und damit diese Arbeit erst möglich gemacht haben.
Bedanken möchte ich mich auch bei dem Team der Lungenfunktionsabteilung (Achim Boldt, Heike Hinkelthein, Gerd Hüls, Monika Johnson, Holger Keller, Renate Pe Lindemann, Christian Mai, Barbara Munckwitz-Almstedt, Daniel Schüler, Jens Steiß, Annette Simon, Christine Seip und Marlene Wrobel) und meinen Mit-und „Vor-“ Doktoranden Thomas Hofmann, Andreas Krahl, Wiebke Moerkerk, Andreas Ziersch, durch deren Unterstützung der Messaufbau, die Herstellung der Pharmaka und die Durchführung der Messungen neben Arbeit auch viel Freude bereitete.
Außerdem gilt mein Dank der Eigenherstellungsabteilung der Apotheke der Uniklinik Gießen, allen voran Martina Auringer und Hannelore Kreckel.
Zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Christian Geidel
geboren am:	08. Oktober 1970 in Gießen
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	evangelisch
Eltern:	Dr. Klaus Geidel, Orthopäde
	Irmin Charlotte Geidel, Lehrerin, Hausfrau
Bruder:	Sebastian Geidel, Koch, Betriebswirt
Kinder:	Emma und Ida Geidel

Ausbildungsdaten:

Schulausbildung:

August 1977 - Juli 1981	Grundschule Grünberg
August 1981 - Juni 1990	Theo – Koch – Schule Grünberg; Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

Juli 1990 - Juni 1991	Sanitätssoldat im Panzergrenadier - Bataillon Wetzlar
Juli 1991 - September 1992	Tätigkeiten als Krankenpflegehelfer in den Universitätskliniken von Gießen und Marburg

Hochschulausbildung:

November 1992 - März 1995	Vorklinisches Studium an der FU Berlin und der JLU Gießen
April 1995 - März 1999	Hauptstudium an der JLU Gießen

April 1999 - März 2000	Praktisches Jahr an der JLU Gießen, Wahlfach: Kinderheilkunde
Seit Dezember 1995	Erste Messungen zu dieser Doktorarbeit
Mai 2000	Abschluss des Studiums mit dem dritten Staatsexamen
Juni 2000 – Dezember 2001	Arzt im Praktikum in der Kinderklinik Gießen auf Infektionsstation, Tagesstation und in der Neuropädiatrie
Seit Januar 2002	Assistenzarzt der Abteilung Allgemeinpädiatrie und Neonatologie der Kinderklinik Gießen

Grünberg, 08.10.2007