

Ansätze zur kausalen Pharmakotherapie bei Mukoviszidose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Juliane Hoeser, geb. Wagner

aus Herborn

Gießen 2010

**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

Funktionsbereich Pädiatrische Pneumologie und Allergologie

Leiter: Prof. Dr. Hermann Lindemann

Gutachter: Prof. Dr. H. Lindemann

Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Tag der Disputation: 18.03.2010

**für Marcus (†), Nina (†), Nicole und Wolfgang
stellvertretend für alle anderen Mukoviszidose-Patienten**

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	4
GLOSSAR	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 ALLGEMEINES	9
1.2 IONENTRANSPORTSTÖRUNG AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL BEI MUKOVISZIDOSE	11
1.3 THERAPIEOPTIONEN BEI MUKOVISZIDOSE	14
1.4 DIE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZ (PD)	15
1.5 ZIELSETZUNG	16
2 METHODIK	17
2.1 DIE NASALE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZ	17
2.1.1 PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	17
2.1.2 BLOCKADE DES NATRIUMEINSTROMS MIT AMILORID	18
2.1.3 CHLORIONENSEKRETION ÜBER ALTERNATIVE CHLORIDKANÄLE	20
2.1.4 CHLORIONENSEKRETION ÜBER CFTR-ABHÄNGIGE KANÄLE	20
2.2 MATERIAL- UND GERÄTEBESCHREIBUNG ZUR NASALEN TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	21
2.2.1 VERWENDETE MATERIALIEN	21
2.2.2 HERSTELLUNG DER AGARGELBRÜCKEN	22

2.2.3	AUFBAU DER MESSELEKTRODE	23
2.2.4	DIE SUBKUTANE REFERENZELEKTRODE	24
2.3	VERSUCHSANORDNUNG ZUR MESSUNG DER TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZ	24
2.4	MODIFIZIERTE VERSUCHSANORDNUNG ZUR PD-MESSUNG MITTELS SUPERFUSION	26
2.5	DIE MESSUNG DER TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZ	28
2.6	DIE MODIFIKATION DER PD-MESSUNG DURCH SUPERFUSION VON PHARMAKA	29
2.7	VERWENDETE PHARMAKA BEI DER SUPERFUSION	30
2.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR KAUSALEN PHARMAKOTHERAPIE BEI MUKOVISZIDOSE	31
2.8.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF ALTERNATIVE UND CFTR- ABHÄNGIGE CHLORIDKANÄLE AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL	31
2.8.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL	32
2.8.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID- PULVERS	35
2.8.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZMESSUNG IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN (FALLDARSTELLUNGEN)	37
2.9	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIVE	38
2.9.1	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV: „UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF ALTERNATIVE UND CFTR-ABHÄNGIGE CHLORIDKANÄLE AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL“	39

2.9.2	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV: „UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL“	40
2.9.3	UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV: „UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS“	40
2.9.4	PATIENTEN DER FALLDARSTELLUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZ IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN	41
2.10	STATISTISCHE METHODEN	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF DIE NASALE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZ	43
3.1.1	VERGLEICH DES EFFEKTS VON IPRATROPIUMBROMID MIT SALBUTAMOL AUF DIE NASALE PD NACH NATRIUMKANALBLOCKADE	43
3.2	EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL BEI CF	51
3.2.1	VERGLEICH: VOR UND NACH AZITHROMYCIN-THERAPIE	51
3.2.2	VERGLEICH: AZITHROMYCIN-EXPONIERTE SEITE – UNBEHANDELTE GEGENSEITE	53
3.3	WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS	56
3.3.1	INITIALER PD-ABFALL UNTER AMILORID	56
3.3.2	DOSISABHÄNGIGE WIRKUNGSDAUER DES AMILORIDS	58
3.4	FALLDARSTELLUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZ IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN	61
4	DISKUSSION	65

4.1	ALLGEMEINES ZUR TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	65
4.2	DER EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF ALTERNATIVE UND CFTR-ABHÄNGIGE CHLORIDKANÄLE AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL	66
4.4	DER EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL	67
4.5	DIE WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS	69
4.6	FALLDARSTELLUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZMESSUNG IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	SUMMARY	77
7	ANHANG	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	84
	ERKLÄRUNG	98
	LEBENS LAUF	99
	DANKSAGUNG	100

GLOSSAR

Δ PD bzw. Δ PD [%]	= Differenz der PD absolut bzw. prozentual
0Cl	= chloridfreie Lösung
abs.	= absolut
AgCl	= Silberchlorid
Ami	= Amilorid
apikal	= lumenwärtige Seite der Luftwegsmukosa
AZM	= Azithromycin
basal	= zur Submukosa gerichtete Seite der Luftwegsmukosa
Ca^{2+}	= 2fach positiv geladenes Calciumion
cAMP	= zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	= Cystische Fibrose
CFTR	= cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	= zyklisches Guaninmonophosphat
Cl^-	= negativ geladenes Chlorion
ET ₅₀	= Zeitpunkt, zu dem die PD-Werte 50% des Ausgangswertes wieder erreicht haben
exp.	= exponiert
Genta	= Gentamicin
H.	= Hub/Hübe
HeLa-Zellen	= Henrietta Lacks-Zellen; kultivierbare menschliche Cervixcarcinomzellen
Inh.	= Inhalation
IB	= Ipratropiumbromid
Ipra	= Ipratropiumbromid
K^+	= positiv geladenes Kaliumion
KBR	= Kaliumbromid
KCl	= Kaliumchlorid
Lsg.	= Lösung
m.	= männlich
Max.	= größte Merkmalsausprägung
Med.	= Median
min	= Minuten
Min.	= kleinste Merkmalsausprägung
Na^+	= positiv geladenes Natriumion
NaCl	= Natriumchlorid
nonCF	= gesunde/r Proband/in
PD	= Potentialdifferenz
Sal	= Salbutamol
SF	= Superfusion
w.	= weiblich
x	= arithmetischer Mittelwert

1 EINLEITUNG

1.1 ALLGEMEINES

Die Mukoviszidose (lat.: mucus = Schleim; viscidus = zäh), auch als Cystische Fibrose (CF) bezeichnet, ist mit einer Prävalenz von etwa 1 : 3000 aller Lebendgeborenen in Mitteleuropa und den USA eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen mit ernster Prognose [28, 70, 73, 92].

Der Erbgang bei der Mukoviszidose ist autosomal-rezessiv, die Häufigkeit der heterozygoten Merkmalsträger wird auf 5 % geschätzt [109]. Nur bei Homozygotie oder Compound-Heterozygotie entwickelt sich phänotypisch das charakteristische Krankheitsbild der CF.

Seit 1985 ist bekannt, dass der zugrunde liegende Gendefekt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert ist [64, 109].

1989 wurde die Position des CF-Gens von einer kanadischen Arbeitsgruppe präzisiert [89, 91].

Man kennt inzwischen über 1500 Mutationen, die mit Mukoviszidose einhergehen können [42, 104, 121].

Die in Mitteleuropa häufigste Mutation ist eine Deletion der Aminosäure Phenylalanin in der Position 508 des Genproduktes ($\Delta F508$) [42, 53, 93].

Folge des Gendefekts ist die fehlerhafte Synthese eines Eiweißkomplexes, des sogenannten CFTR-Membran-Transportproteins (CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), welches unter anderem den Chlor- und Natriumionen- sowie den Wassertransport durch Zellmembranen reguliert [5, 11, 22, 83, 89, 113].

Klinisch bedingt die fehlerhafte CFTR-Synthese eine Regulationsstörung mit einem ausgeprägten Wasserverlust und einer Viskositätszunahme des

Sekrets in vielen Organen mit exokrinen Drüsen (Abb. 1.1). Sie verursacht dadurch eine Sekretretention, die rezidivierende Entzündungen mit fortschreitender Gewebsschädigung und Fibrosierungsprozessen begünstigt [70].

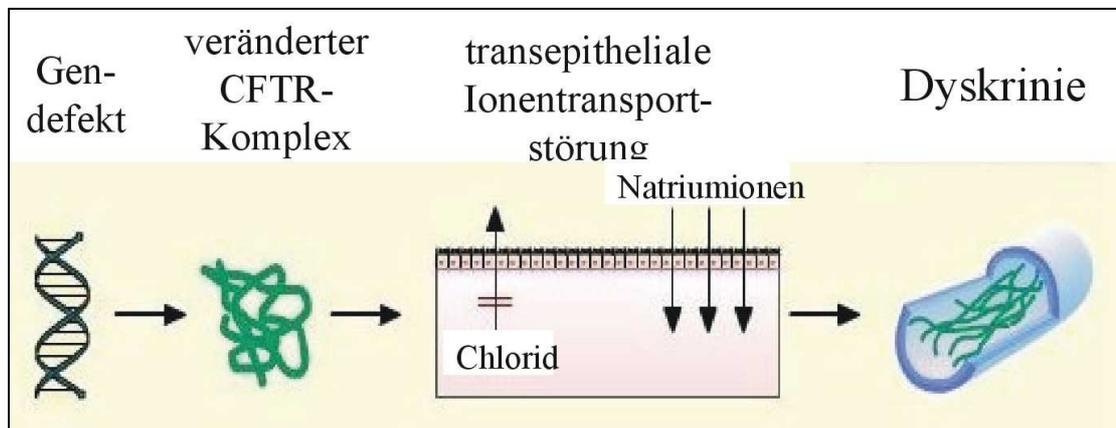


Abb. 1.1: Skizze zur Auswirkung des Gendefekts bei Mukoviszidose bis zur Dyskrie

Eine besondere Situation findet sich in den Schweißdrüsen: Hier unterbleibt die Rückresorption von NaCl aus dem salzhaltigen Primärschweiß in den Ausführungsgängen, was die für den Mukoviszidose-Patienten typische abnorme Elektrolytzusammensetzung des Schweißes erklärt.

Dieses wird in der Diagnostik der Mukoviszidose in der Pilocarpin-Iontophorese, dem so genannten „Schweißtest“ genutzt [28, 36, 61, 86].

1.2 IONENTRANSPORTSTÖRUNG AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL BEI MUKOVISZIDOSE

Nach heutigen Erkenntnissen fungiert das CFTR-Membranprotein als ein durch zyklisches Adenosinmonophosphat aktivierbarer Chlorid-Kanal [3].

Dieser Chloridkanal ist bei der Mukoviszidose gestört.

Abhängig von der jeweiligen Mutation unterbleibt die Bildung des Proteins oder der Transport zur Zellmembran, bzw. es wird ein nicht funktionierendes Protein eingebaut oder zu wenig Protein exprimiert. Je nach Gendefekt teilt man die CF-Mutationen inzwischen in 6 Defektklassen ein (*Abb. 1.2*) [35, 118].

Der *Klasse I (A)* werden die Mutationen zugeordnet, bei denen infolge Unterbrechung der genetischen Informationsübertragung zwischen Nucleus und Golgiapparat („Stoppmutationen“) kein intaktes Protein entsteht, z. B. R553X oder G542X. Bei *Klasse II (B)* kommt es zu einer fehlerhaften Faltung und Reifung des Proteins. Dazu zählt man die in Europa und USA mit Abstand häufigste Mutation Δ F508 (ca. 70 %). Defekte der *Klasse III (C)* zeigen eine gestörte Regulation und Aktivierung des CFTR-Komplexes. Dieser Gruppe ist beispielsweise die Mutation G551D zugeordnet. *Gruppe IV (D)* weist eine gestörte Ionenleitfähigkeit des CFTR-Kanals auf. Beispiele hierfür sind R117H oder R347P.

Die Störung bei *Klasse V (E)* liegt in einem inkorrekten Splicing, das für eine deutlich reduzierte Menge an intaktem Protein verantwortlich ist. *Klasse VI (F)* weist eine defekte Regulation anderer Ionenkanäle auf.

Durch den Einfluss der Mutationen erklären sich zumindest teilweise die unterschiedlichen Verlaufsformen der Mukoviszidose bei einzelnen CF-Patienten [35, 40].

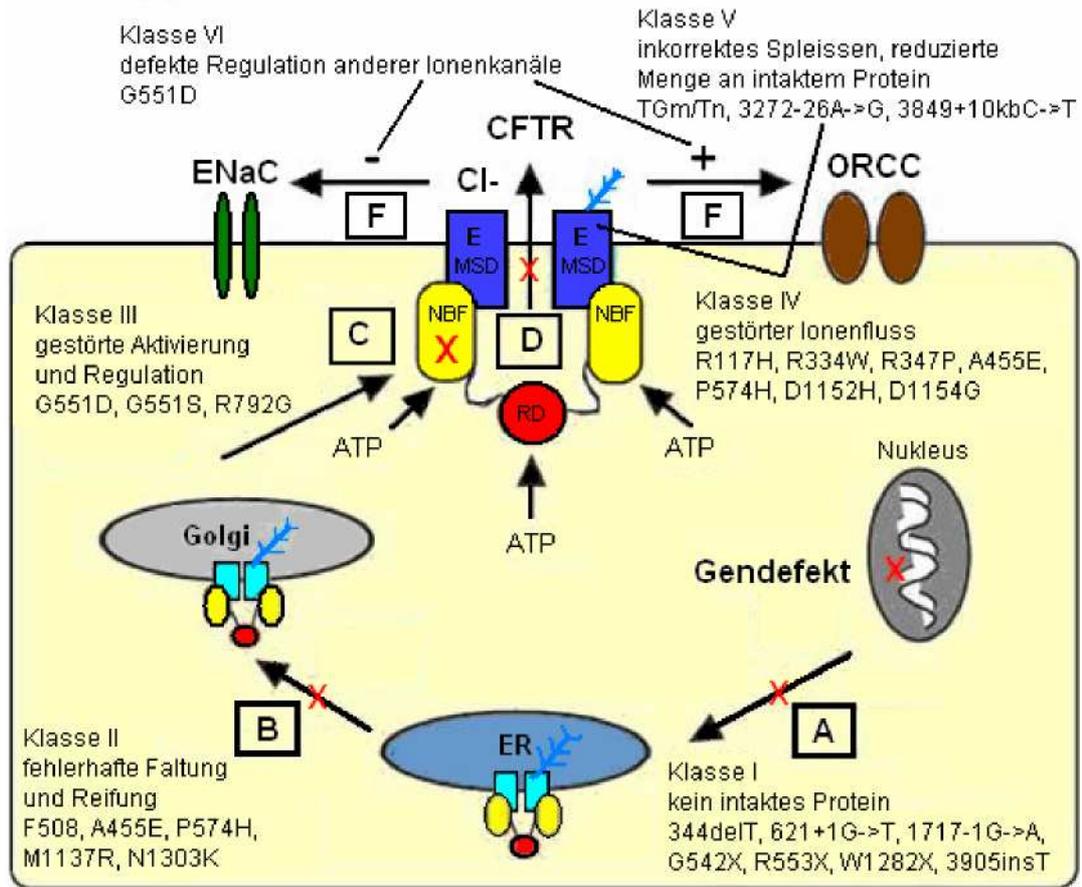


Abb. 1.2 : *CF-Mutationen mit 6 CFTR-Defektklassen (A bis F) der Synthese bzw. des CFTR-Processing (modif. nach Gallati [35]). Einzelheiten im Text.*

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

Am Beispiel der Mutation Δ F508, die mit sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen der Mukoviszidose einhergeht, lässt sich aber zeigen, dass es neben den CFTR-Mutationen wichtige andere genetische Einflüsse gibt, die sich auf den Schweregrad der Krankheit auswirken [30] (s. auch Abschnitt 1.3).

Wie erwähnt, wird der nach außen gerichtete Strom der Chlorionen an der apikalen Zellmembran in unterschiedlichem Ausmaß gestört. Daraufhin

kommt es zu einem exzessiv gesteigerten Einstrom von Natriumionen und Wasser in die Zelle [34, 100, 112] (Abb. 1.3).

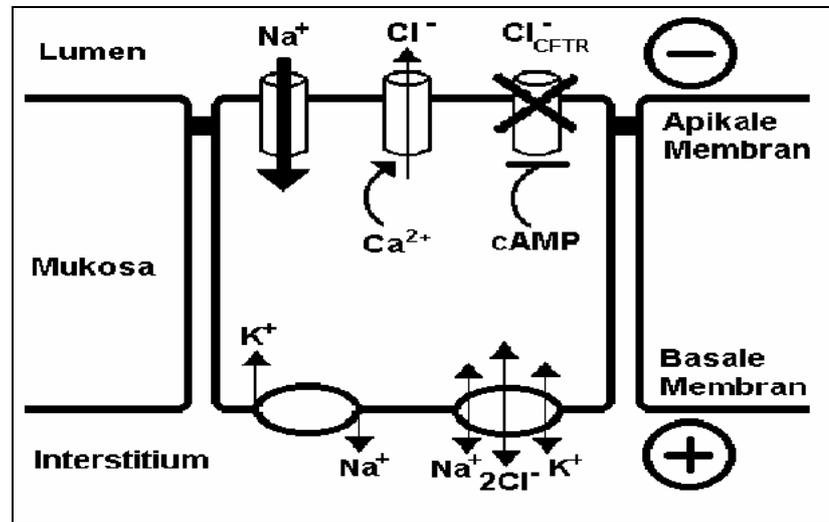


Abb. 1.3: Basisdefekt bei Mukoviszidose. Einzelheiten im Text.

An der basolateralen Zellmembran findet ein Ionentransport in das Interstitium statt. Dieser Prozess erfordert Energie, ist ein aktiver Vorgang, der mit Hilfe der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Pumpe geschieht [61, 63].

Das Sekret nimmt als Folge der apikalen Ionentransportstörungen und des Wasserverlusts an Viskosität zu, wird retiniert und führt zu chronischen Entzündungen und obstruktiven Veränderungen, was vor allem in Lunge und Pankreas zu Problemen führt [23, 62, 84].

Im Respirationstrakt kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion und zur chronischen Besiedlung mit Krankheitserregern wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* [87]. Die rezidivierenden Infektionen führen zu einer irreversiblen Schädigung der Bronchialwand mit Destruktion des Lungengewebes. Als Folge zeigen sich atelektatische, fibrotische und emphysematische Veränderungen der Lunge mit Hypoxie, pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzbelastung in der Spätphase [38, 71, 111].

1.3 THERAPIEOPTIONEN BEI MUKOVISZIDOSE

Bei der aktuellen Therapie der Mukoviszidose versucht man der Zerstörung der Atemwege durch Sekretelimination und Minderung der bakteriellen Kontamination entgegenzuwirken. Dies geschieht sowohl durch regelmäßige Physio- und Inhalationstherapie als auch durch medikamentöse Verflüssigung des Bronchialsekrets [25, 38, 69, 79]. Außerdem achtet man auf eine ausreichende Energie-, Enzym- und Vitaminzufuhr. Die Lungentransplantation stellt die ultima ratio dar [10].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist ein umfassendes Versorgungskonzept, das eine engmaschige intensive Betreuung der Patienten beinhaltet. Voraussetzung dafür ist ein Team aus kompetenten Ärzten, Pflegepersonal, Ernährungsberatern bzw. Ökotrophologen, Physio- und Familientherapeuten sowie eine gute psychosoziale Betreuung [70].

Die konsequente Verbesserung der bisherigen Therapieoptionen und die komplexe Betreuung der Patienten und Angehörigen haben bewirkt, dass die mittlere Lebenserwartung der Mukoviszidose-Patienten in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen ist. So schätzt man das mittlere Überlebensalter eines jetzt geborenen Patienten auf 40 Jahre [70].

Eine kausale Therapie der Mukoviszidose ist bislang nicht möglich. Ansätze dazu sind die Verringerung oder Behebung der Funktionsstörung des Chloridkanals mittels Pharmaka oder mittels Gen-Korrektur [70].

Zur Objektivierung potenzieller Erfolge hat sich die Bestimmung der transepithelialen Potenzialdifferenz als wertvoll erwiesen [17].

1.4 DIE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZ (PD)

Membranen und Epithelien tragen zur Regulation der Flüssigkeitskompartimente bei, indem sie als selektiv permeable Barrieren fungieren.

Durch aktive Ionentransportvorgänge und passive Ionenpermeabilität sowie parazelluläre Barrieren für passiven Ionenfluss (vgl. *Abb. 1.3*) wird die Elektrolytzusammensetzung der einzelnen Kompartimente bestimmt und so eine messbare elektrische Spannung erzeugt [68, 106].

Diese bezeichnet man als transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) [17].

Sie stellt ein durch verschiedene Ionen bedingtes Summenpotenzial dar und ist in Bezug auf die Mukosa des Respirationstrakts lumen negativ [56, 61].

Die PD am respiratorischen Epithel wird hauptsächlich durch die Sekretion von Chlorid- und der Absorption von Natrium-Ionen bestimmt [17, 18, 82]. Im Prinzip gleiche Verhältnisse gelten auch für das Darmepithel [75, 107, 108].

Im Vergleich zum Gesunden äußert sich die transepitheliale Potenzialdifferenz beim Mukoviszidose-Patienten wegen fehlendem Chloridaus- und gesteigertem Natriumeinstrom durch eine pathognomonisch erhöhte Spannung [98], die sich mit einer geeigneten Vorrichtung messen lässt. Durch Natriumkanal-blockierende Medikamente wie Amilorid kann die PD reduziert werden [56, 77].

Die zusätzliche Applikation von Chlorkanal-aktivierenden Substanzen wie zum Beispiel chloridfreier Lösung oder β -Sympathomimetika kann bei bestehender Restfunktion der Chlorkanäle einen Wiederanstieg der Potenzialdifferenz bewirken [78]. Dadurch wird die PD-Messung zu einem wertvollen Diagnostikum.

Bei den Untersuchungen zur kausalen Pharmakotherapie bei Mukoviszidose war sie in der vorliegenden Arbeit Mittel der Wahl zur Überprüfung der aufgestellten Hypothesen.

1.5 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der nasalen transepithelialen PD-Messung die Beeinflussung der Ionenkanalfunktion am respiratorischen Epithel durch verschiedene Medikamente zu überprüfen.

- Zunächst sollte geklärt werden, ob das Parasympatholytikum Ipratropiumbromid einen generellen Einfluss auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz hat. Außerdem sollte getestet werden, wie sich die Applikation einer anticholinergen bzw. adrenergen Substanz auf alternative und CFTR-abhängige Chloridkanäle am respiratorischen Epithel beim gesunden Probanden und beim Mukoviszidose-Patienten auswirkt.

- Ein zweiter Schwerpunkt waren die Untersuchungen zum Einfluss von Azithromycin auf den Ionentransport am respiratorischen Epithel.

Hierbei interessierte besonders, ob sich die nasale PD nach lokaler Anwendung von Azithromycin ändern würde, wie dies von einer Arbeitsgruppe postuliert wird [85].

- Außerdem sollte die Wirkung eines neuen Amilorid-Pulvers verifiziert werden.

- An drei Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen wurde darüber hinaus der mögliche Einfluss von Gentamicin auf die PD in vivo untersucht [49].

2 METHODIK

2.1 DIE NASALE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZ

2.1.1 PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz stellt wie in Kapitel 1.4 beschrieben den Spannungsunterschied zwischen dem Lumen und der Submukosa dar, der durch die Epithelbarriere zustande kommt [105].

Dabei ist die Submukosa der Luftwegsepithelien als isoelektrisch mit der Subkutis anzusehen, was die Ableitung der Potenzialdifferenz mit subkutaner Referenz möglich macht [58].

In Bezug auf die Submukosa ist die PD lumennegativ und bewegt sich in einem Bereich von 0 bis -100 mV. Am respiratorischen Epithel entsteht sie durch die Sekretion von Chlorionen und gleichzeitiger Reabsorption von Natriumionen [17].

Der Chloridtransport erfolgt über verschiedene Kanäle an der luminalen Seite der Zellmembran. Diese werden zum einen über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums aktiviert, zum anderen über cAMP-abhängige Phosphorylierung. Durch einen entsprechend hohen apikalen Gradienten kann demnach durch letztgenannten Aktivierungsweg die aktive Chloridsekretion in das Bronchiallumen induziert werden.

Diese cAMP-abhängigen Kanäle, sogenannte CFTR-assoziierte Kanäle, sind beim Mukoviszidose-Kranken defekt, was häufig eine Erhöhung der Potenzialdifferenz auf Werte ≥ -60 mV mit sich bringt. Die beim gesunden Probanden gemessenen Werte hingegen übersteigen selten -40 mV.

Knowles erklärt die Erhöhung der Potenzialdifferenz bei CF-Patienten mit der durch den defekten Chloridtransport gesteigerten Natriumabsorption und

beschreibt eine direkte Korrelation zwischen dieser und der PD-Erhöhung [57, 60].

Nach jüngsten Forschungsergebnissen ist die Natrium-Hyperabsorption aber nicht allein durch den elektrochemischen Gradienten zu erklären, sondern auch durch die Generierung zusätzlicher Natrium-Kanäle. Offenbar gibt es individuelle Unterschiede der epithelialen Natrium-Kanäle im Hinblick auf mRNA- und Proteinsynthese [7, 8].

Durch den Einsatz verschiedener Medikamente kann man sowohl Einfluss auf die Natriumkanalfunktion als auch auf die Funktion der verschiedenen Chloridkanäle nehmen und erhält dadurch die Möglichkeit, die Potenzialdifferenz auf unterschiedliche Weise zu verändern.

Dieses wird in den nachfolgenden Kapiteln näher ausgeführt.

2.1.2 BLOCKADE DES NATRIUMEINSTROMS MIT AMILORID

Durch Amilorid lassen sich die Natriumkanäle reversibel blockieren, die Natriumrückresorption wird somit gehemmt (Abb. 2.1).

Als kaliumsparendes Diuretikum ist Amilorid schon länger bekannt. Es findet als Kombinationspräparat zusammen mit anderen Diuretika Anwendung in der Therapie von arterieller Hypertonie, Herzinsuffizienz und Ödemen.

Durch Blockade der Natriumreabsorption in den distalen Tubulusabschnitten wird die Natrium- und Wasserausscheidung erhöht, die Kaliumausscheidung konsekutiv verringert [31, 50, 55].

Am respiratorischen Epithel kommt es nach lokaler Gabe von Amilorid zu einer Konzentrationserhöhung der Natriumionen im Lumen, was einen messbaren Abfall der Potenzialdifferenz bewirkt, der beim Mukoviszidose-Kranken mehr als 75 % des Ausgangswertes beträgt. Dieser Amilorideffekt wird vor allem bei Patienten mit nicht eindeutigen PD-Basiswerten im

Übergangsbereich von -30 bis -50 mV zusätzlich zu diesen als weiteres diagnostisches Abgrenzungskriterium genutzt [37].

Neben der diagnostischen Nutzung ist die Auswirkung des Medikaments auf das Bronchialsekret von klinischer Bedeutung.

Durch die Blockade des Natriumkanals steigt im Lumen der Natrium- und dadurch bedingt auch der Wassergehalt an. Dieser Vorgang bewirkt eine Verflüssigung des Bronchialsekrets und gewährleistet eine verbesserte mukoziliäre Clearance [6, 59, 65, 69, 77].

Außerdem erhöht Amilorid die Zilienschlagfrequenz am Flimmerepithel und besitzt einen antimikrobiellen Effekt [13, 25].

Der präventive Einsatz von Amilorid ist bisher allerdings noch nicht etabliert.

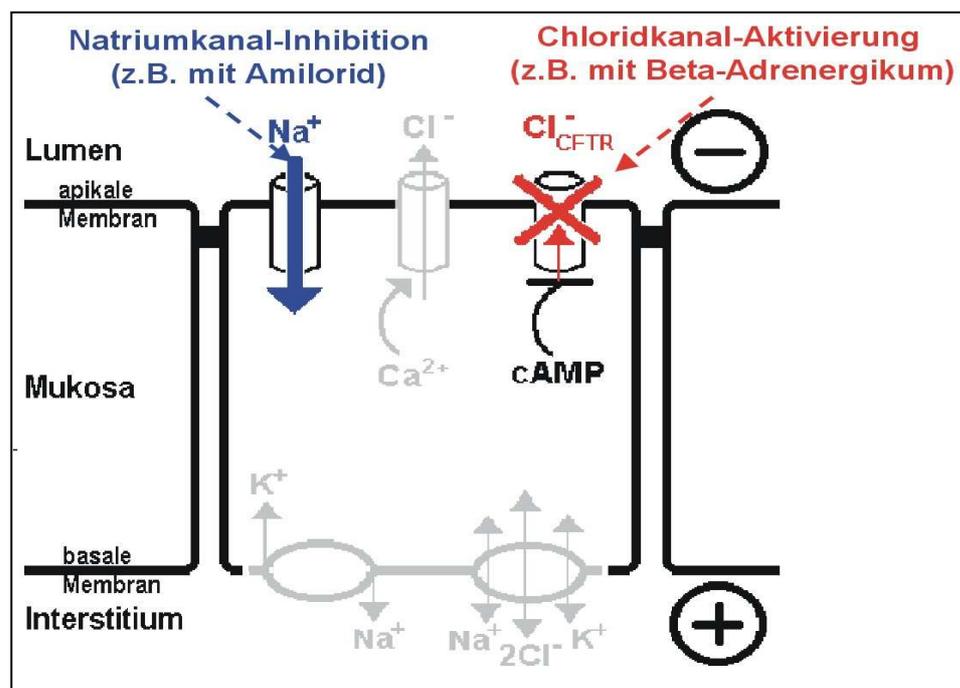


Abb. 2.1: Skizze zur medikamentösen Beeinflussung der Potenzialdifferenz. Einzelheiten im Text (s. auch Erläuterung zu Abb. 1.3)

2.1.3 CHLORIONENSEKRETION ÜBER ALTERNATIVE CHLORIDKANÄLE

Die Chlorionensekretion an der apikalen Membran des respiratorischen Epithels erfolgt sowohl über alternative als auch über CFTR-abhängige Chloridkanäle.

Die lokale Gabe einer chloridfreien Pufferlösung, die durch Austausch von Natriumchlorid durch Natrium-Glukonat hergestellt wird, bewirkt ein Konzentrationsgefälle im Lumen und somit bei erhaltener (Rest-)Funktion der Chlorkanäle einen gesteigerten passiven Ausstrom von Chlorionen aus der Zelle. Es kommt daher im Anschluss an das Absinken der PD nach Natriumblockade zum Wiederanstieg der Potenzialdifferenz [78].

Der Nutzen der Testung "alternativer Chloridkanäle" für die klinische Diagnosestellung der Mukoviszidose sollte in der vorliegenden Arbeit noch einmal überprüft werden.

Ein weiterer Mechanismus ist die Verbesserung des Chloridtransports durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration. In vivo wird diese Option wegen unerwünschter Wirkungen nicht genutzt [5].

2.1.4 CHLORIONENSEKRETION ÜBER CFTR-ABHÄNGIGE KANÄLE

Durch β -Mimetika wie Isoproterenol oder Salbutamol kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und dadurch bedingt zu einer cAMP-abhängigen Phosphorylierung des CFTR-Kanal-Regulators mit nachfolgender Öffnung des CFTR-Kanals [4, 78, 97]. Ein β -Mimetikum kann also nach lokaler Applikation beim Gesunden eine Öffnung der CFTR-abhängigen Chlorkanäle und somit einen weiteren PD-Anstieg bis auf die Ausgangswerte bewirken.

Diese Stimulation der Chloridkanäle ist beim CF-Kranken durch einen Defekt des CFTR-Gens nicht oder nur bedingt möglich, deshalb bleibt hier der Wiederanstieg der PD auf die ursprünglich gemessenen Ausgangswerte aus.

Die Höhe des Wiederanstiegs kann demnach als Grad für die noch bestehende Restfunktion der CFTR-Kanäle gesehen werden und ermöglicht auch die Diagnosefindung bei atypischen CF-Fällen mit nur leicht erhöhter oder normaler basaler Potenzialdifferenz [19, 44].

Anderen Substanzen wie Azithromycin und Gentamicin wird darüber hinaus ein Effekt bei nachgewiesener Funktionsstörung der CFTR-abhängigen Chlorkanäle zugeschrieben [49, 85]. Beide sind kommerziell verfügbare Antibiotika. Sie wurden daher in die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit einbezogen.

2.2 MATERIAL- UND GERÄTEBESCHREIBUNG ZUR NASALEN TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG

Zur Durchführung der nasalen transepithelialen PD-Messung wurden nachfolgend beschriebene Geräte und Materialien benötigt.

2.2.1 VERWENDETE MATERIALIEN

- Millivoltmeter der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten GmbH, WTW PH 530, Weilheim
- 2 Silberchloridelektroden: Standardbezugselektrode Typ 373 von Ingold GmbH, pH-Messtechnik, Steinbach i. Taunus
- 5 Infusionspumpen Typ Injektomat der Firma Fresenius
- 50 ml Injektomat-Pumpen
- Injektomat-Leitungssysteme
- bakteriendichte Infusionsflachfilter
- Drei-Wege-Hähne
- Venenverweilkanüle, Typ Surflo 24G
- Nabelarterienkatheter, Typ Argyle 3,5 Ch.
- Polyethylen PE50 Schlauch, mittels Epoxydharzkleber auf s.c.-Kanülen (Außendurchmesser 0,45 mm) befestigt

- 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 verdunstungsdichte Gummistopfen mit Bohrungen
- 2 Erlenmeyerkolben (Weithals), 100 ml, mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt, passende verdunstungsdichte Gummistopfen mit Bohrungen
- Pflaster zur Fixierung der Verweilkanüle
- Kaltlichtquelle der Firma Karl Storz, Halogen 150, 20112120
- Glasfaserkabel der Firma Karl Storz
- konnektierbares Nasenspekulum mit Fiberglas-Lichtträger, 13,5 cm

2.2.2 HERSTELLUNG DER AGARGELBRÜCKEN

Das Vorgehen zur Herstellung der Agargelbrücken entsprach der von einer Freiburger Arbeitsgruppe entwickelten Vorgehensweise [105]:

2,5 mg Agar wurden zu 50 ml isotonischer NaCl- oder 3-molarer KCl-Lösung hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde bei ca. 200 W in einem Mikrowellengerät erhitzt, bis es dickflüssig war. Durch Ansaugen des Gemisches mit einer Perfusionspritze konnten dann die Plastikschläuche oder U-förmigen Glasröhrchen mit dem noch flüssigen Agar befüllt und anschließend zum Abkühlen in die jeweilige Elektrolytlösung gestellt werden.

Dadurch war die vollständige Sättigung der Agargellösung gewährleistet, und es wurde vermieden, dass sich die Gelbrücken beim Herausnehmen aus den Glasröhrchen bzw. Plastikschläuchen herauszogen.

Nach Abkühlung war dann der Einbau in die Messvorrichtung möglich (*Abb. 2.2*).

Bei korrekter luft- und rissfreier Herstellung zeigte das in das System eingebaute Voltmeter eine Spannung von ± 0 mV an.

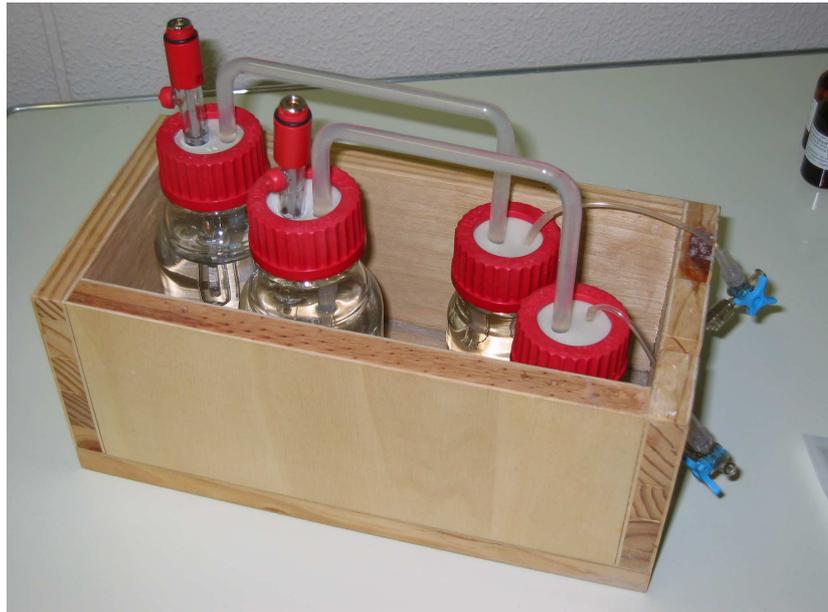


Abb. 2.2: *Gelbrücken und Silberchloridelektroden in den KCl- und NaCl-Lösungen vor Einbau in die Messeinheit. Erläuterungen im Text.*

2.2.3 AUFBAU DER MESSELEKTRODE

Die Messelektrode sollte ein direktes Aufbringen der Testlösungen am Ort der Messung ermöglichen. Damit dies gewährleistet war, wurde ein Polyethylen PE50 Schlauch, der mittels Epoxydharzkleber auf s.c.-Kanülen (Außendurchmesser 0,45 mm) befestigt wurde, verwendet.

Über die Steckverbindung der Kanüle war der Anschluss an das Messsystem und die Fixation an der Hand des Untersuchenden möglich (Abb. 2.3).

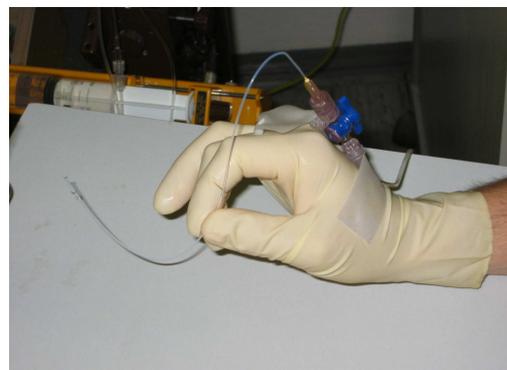


Abb. 2.3: *Messelektrode ohne (links) und mit Anschluss (rechts) an das Messsystem*

2.2.4 DIE SUBKUTANE REFERENZELEKTRODE

Als Referenzelektrode diente eine kleinkalibrige Venenverweilkanüle, die subkutan an der Außenseite des linken Oberarms platziert und nach Entfernen der Nadel mit einem Pflaster fixiert wurde [57].

Die Elektrode wurde über die mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Infusionsleitungen blasenfrei mit der Messeinrichtung verbunden.

Mit der zugehörigen Injektomatpumpe wurde nun mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 3ml/h für den Zeitraum der Messung 0,9-prozentige NaCl-Lösung subkutan infundiert.

2.3 VERSUCHSANORDNUNG ZUR MESSUNG DER TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZ

Zur Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz wurde das Millivoltmeter mit den beiden Silberchloridelektroden verkabelt.

Die beiden Silberchloridelektroden waren jeweils in einen mit 3-molarer Kaliumchloridlösung gefüllten Erlenmeyerkolben eingeführt und mit entsprechend gebohrten, verdunstungsdichten Gummistopfen fixiert.

Zudem mündete je ein Schenkel der mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllten U-förmigen Agargelbrücken in die Erlenmeyerkolben.

Der andere Schenkel der Gelbrücken mündete ebenso wie die mit isotoner Kochsalzlösung gefüllten Gelbrücken in Plastikschläuchen in jeweils einem Kolben mit 100 ml NaCl-Lösung (*Abb. 2.2*). Diese mündeten in den Seitanschluss eines 3-Wege-Hahns, welcher über seine anderen beiden Anschlüsse mittels der kochsalzgefüllten Injektomat-Leitungssysteme die Verbindung zu den Injektomatpumpen und zur Mess- bzw. Referenzelektrode herstellte. In das Leitungssystem waren außerdem zwei bakteriendichte Filter integriert.

Dieser Versuchsaufbau geht in seiner Anordnung auf die Arbeitsgruppe um Boucher zurück [17] (*Abb. 2.4*).

Für die subkutan platzierte Referenzelektrode, eine Venenverweilkanüle, betrug die Infusionsgeschwindigkeit der isotonischen Kochsalzlösung 3,5 ml/h, für die intranasal applizierte Messelektrode, ein Nabelarterienkatheter, der länger war und einen größeren Durchmesser als die Venenverweilkanüle aufwies, 7ml/h.

Zur Dokumentation der Messergebnisse war das Voltmeter mit einem Computer verschaltet.

Die Aufzeichnung der Messkurven erfolgte über das Programm DasyLab 3® (Hersteller: Dasytec GmbH) in Echtzeit.

Die Datenverwaltung wurde über das auf MS Access® basierende Programm PD-Master® durchgeführt.

2.4 MODIFIZIERTE VERSUCHSANORDNUNG ZUR PD-MESSUNG MITTELS SUPERFUSION

Bei der Superfusionsmessung entsprach die Versuchsanordnung derjenigen der Grundmessung der PD. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, Testlösungen während der PD-Messung auf die nasale Mucosa zu applizieren.

Die Lösungen, die sich ebenfalls in 50 ml-Perfusorspritzen in weiteren Injektomatpumpen befanden, erhielten über zusätzliche 3-Wege-Hähne Anschluss an das Infusionssystem zur Messelektrode und wurden mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 100 ml/h superfundiert (Abb. 2.4 und 2.5).



Abb. 2.4: Messanordnung zur PD-Messung mittels Superfusionstechnik im PD-Labor des Zentrums für Kinderheilkunde Gießen

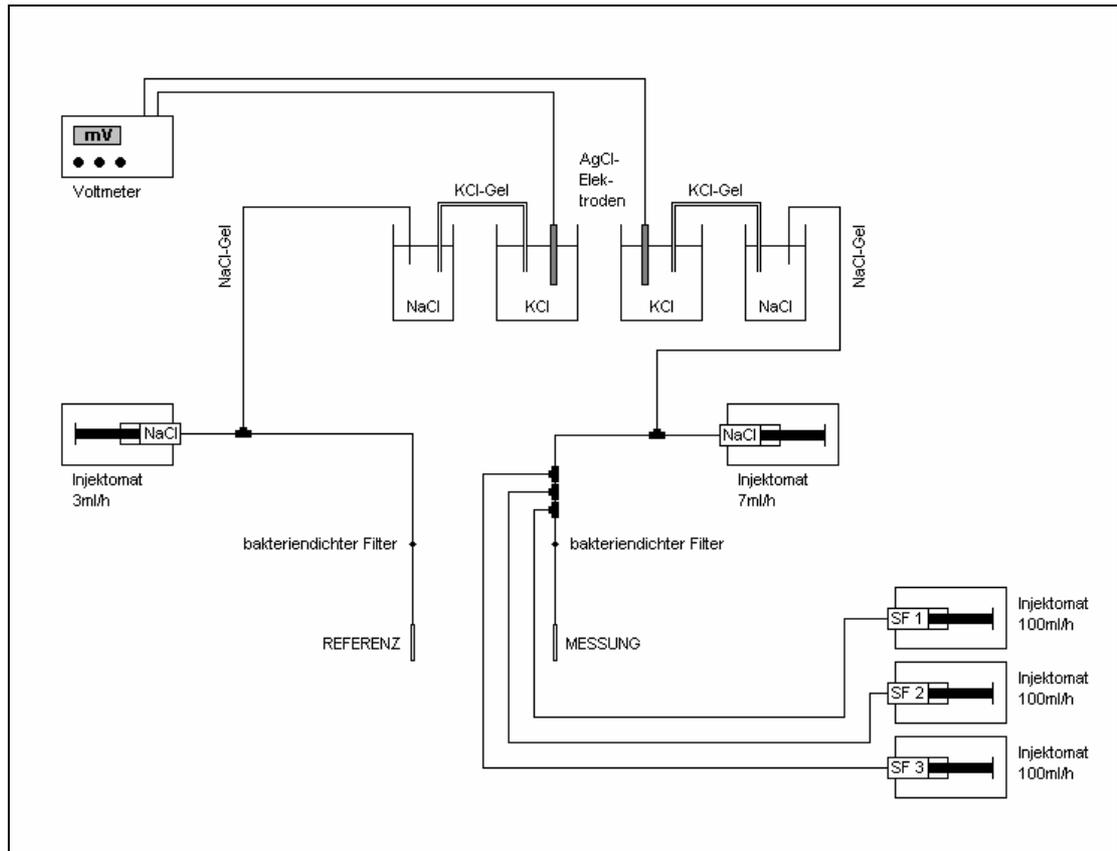


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur PD-Messung mittels Superfusion

- | | |
|-------------------------|---|
| KCl: | 3-molare Kaliumchloridlösung |
| NaCl: | isotonische Kochsalzlösung |
| KCl-Gel: | Agargelbrücken gefüllt mit 3-molarer KCl-Lösung |
| NaCl-Gel: | Agargelbrücken gefüllt mit isotoner Kochsalzlösung |
| AgCl-Elektroden: | Silberchloridelektroden |
| SF1/2/3: | Superfusionslösung 1, 2 od. 3 |

2.5 DIE MESSUNG DER TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZ

Die Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz erfolgte nach dem sogenannten „Nullabgleich“, bei dem ein Kurzschluss zwischen Mess- und Referenzelektrode zur Überprüfung des korrekten Messaufbaus hergestellt wurde.

Die angezeigte Spannung bewegte sich hierbei nach sachgemäß erstelltem Gelbrückensystem und luftblasenfreiem Befüllen der Infusionsschläuche in einem Toleranzbereich von ± 1 mV.

Zur Messung war der Kopf des Patienten auf eine ophthalmologische Kopfstütze positioniert, so dass der Untersucher guten Zugang zu den Nasenöffnungen hatte (*Abb. 2.6*).



Abb. 2.6: Lagerung des Kopfes einer CF-Patientin auf einer ophthalmologischen Kopfstütze zur Bestimmung der nasalen Potenzialdifferenz

Die Referenzelektrode wurde über die Venenverweilkanüle subkutan an der Außenseite des Oberarms des Patienten platziert und nach Entfernen der Nadel mit einem Pflaster fixiert. Durch die mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Infusionsleitungen war sie wie oben beschrieben mit der Messeinrichtung verbunden.

Die Messelektrode, die ebenfalls über ein Infusionssystem mit der Messeinrichtung verbunden war, wurde unter Zuhilfenahme eines an eine Kaltlichtquelle angeschlossenen Nasenspekulums unter Sicht ca. 3-5 cm tief bis unter die Concha nasalis inferior eingeführt.

Der eigentliche Messort war dabei nicht direkt einzusehen, zeigte sich aber am Voltmeter als wiederholt auffindbare Stelle mit dem höchsten Messwert, den man mehr als 5 Sekunden stabil halten konnte.

Bei korrekter Lage wies die PD Werte zwischen 0 und -80 mV auf, bei Abweichungen der Werte von dieser Spanne wurde eine fehlerhafte Positionierung der Messelektrode angenommen.

Um die Verlässlichkeit der Messergebnisse zu verbessern, fand die Bestimmung der Grundwerte zweimal pro Nasenöffnung statt. Der Mittelwert wurde den weiteren Berechnungen zugrunde gelegt.

2.6 DIE MODIFIKATION DER PD-MESSUNG DURCH SUPERFUSION VON PHARMAKA

Im Rahmen dieses Vorgehens bei der PD-Messung wurden zunächst ebenfalls die Grundwerte ermittelt. Am Ort des höchsten Messwerts wurden dann nacheinander durch Aktivierung der Injektomaten mit Hilfe der Drei-Wege-Hähne die Superfusionslösungen, auf die in Kapitel 2.7 noch näher eingegangen wird, appliziert und nach Beendigung der Superfusion die Potenzialdifferenzen abgelesen.

Die Applikationsdauer betrug dabei jeweils drei Minuten.

Die Aufzeichnung der Messkurven in Echtzeit über den Computer ermöglichte außerdem eine kontinuierliche Dokumentation des Kurvenverlaufs (s. *Abb. 3.2* und *3.3*) und ein nachträgliches Auswerten der Messergebnisse.

2.7 VERWENDETE PHARMAKA BEI DER SUPERFUSION

Zur Durchführung der Superfusionsmessung wurden die in Tabelle 2.1 beschriebenen pharmakologischen Lösungen verwendet.

Die Lösungen wurden in der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen hergestellt und in lichtgeschützten Flaschen gelagert.

Tabelle 2.1: Bei der PD-Messung verwendete Superfusionslösungen

1. Amiloridlösung in aqua dest. u. chlorid <u>haltigem</u> KBR-Puffer (1000 ml)		2. Amiloridlösung in aqua dest. u chlorid <u>freiem</u> Puffer (1000 ml)		3. Amiloridlösung in aqua dest. u chlorid <u>freiem</u> Puffer + Salbutamol bzw. Ipratropiumbromid (1000 ml)	
K ₂ HPO ₄	418 mg	K ₂ HPO ₄	418 mg	K ₂ HPO ₄	418 mg
KH ₂ PO ₄	55 mg	KH ₂ PO ₄	55 mg	KH ₂ PO ₄	55 mg
NaCl	6,721 g	Na-Glukonat	25,081 g	Na-Glukonat	25,081 g
Na CO ₃	2,10 g	Na CO ₃	2,10 g	NaCO ₃	2,10 g
MgCl ₂	244 mg	MgSO ₄	296 mg	MgSO ₄	296 mg
CaCl ₂	133 mg	Ca-Glukonat	533 mg	Ca-Glukonat	533 mg
Amilorid	10 ⁻⁴ Mol	Amilorid	10 ⁻⁴ Mol	Amilorid	10 ⁻⁴ Mol
= 30 mg		= 30 mg		= 30 mg	
= 0,03 mg / ml = 0,003 %					
				Salbutamol	10 ⁻⁵ Mol
				= 2,9 mg	
				<u>oder</u>	
				Ipratropiumbromid	10 ⁻⁵ Mol
				= 4,1 mg	

Bei den Untersuchungen zur medikamentösen Therapie bei Mukoviszidose wurden teilweise weitere pharmakologische Lösungen und Pharmaka verwendet.

Diese sind jeweils in den einzelnen Unterkapiteln aufgeführt.

2.8 UNTERSUCHUNGEN ZUR KAUSALEN PHARMAKOTHERAPIE BEI MUKOVISZIDOSE

Die Untersuchungen zur kausalen Pharmakotherapie bei Mukoviszidose befassten sich mit der Beeinflussung der Ionenkanalfunktion an der apikalen Membran des respiratorischen Epithels durch verschiedene Medikamente. Methode der Wahl zur Erfassung der Ionen-transportvorgänge in vivo war die in den vorherigen Kapiteln beschriebene nasale transepitheliale Potenzialdifferenzmessung.

Einzelheiten zu den Untersuchungen sind nachfolgend dargestellt.

2.8.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF ALTERNATIVE UND CFTR-ABHÄNGIGE CHLORIDKANÄLE AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL

Das Anticholinergikum Ipratropiumbromid wird als quarternäres Atropinderivat alleine und in Kombination mit Sympathomimetika wie beispielsweise Salbutamol in der Behandlung von obstruktiven Lungenerkrankungen eingesetzt [26, 31, 117].

Dabei entfaltet es seine Wirkung über den cGMP-Transduktionsweg und ist etwa 1,4- bis 2-mal stärker als Atropin [10].

Es gilt als ein effektiver Bronchodilatator, der den Atemwegswiderstand nach inhalativer Gabe wirksam reduzieren kann [74]. Ipratropiumbromid wird insbesondere in der Behandlung von Säuglingen wegen seiner dort im Vergleich zu Salbutamol besseren Wirksamkeit und geringeren Rate an unerwünschten Wirkungen geschätzt [20, 88, 95].

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Ipratropiumbromid auf alternative und CFTR-abhängige Chloridkanäle am respiratorischen Epithel wurde

zunächst die basale PD bei gesunden Probanden und Mukoviszidose-Patienten ermittelt.

Unter Hemmung der apikalen Natriumabsorption mittels Amilorid wurde dann die nasale Mukosa aufeinander folgend - wie in Kapitel 2.6 beschrieben - jeweils drei Minuten lang superfundiert mit (1) chloridhaltiger, (2) chloridfreier und (3) chloridfreier Lösung unter Zusatz eines β -Sympathomimetikums (Salbutamol) oder des Parasympatholytikums Ipratropiumbromid (*Tab. 2.2*). Anschließend konnte dann die Reaktion der PD auf Salbutamol mit der Reaktion auf Ipratropiumbromid verglichen werden.

Tab. 2.2: *Studiendesign zum Vergleich von Ipratropiumbromid mit Salbutamol*

Amilorid Chloridlsg. (1)	Amilorid chloridfreie Lsg. (2)	Amilorid chloridfreie Lsg. Salbutamol (3)
		Amilorid chloridfreie Lsg. Ipratropiumbromid (3)

Um eine Beeinflussung der zweiten Messung durch die Superfusionslösungen der ersten Messung sicher auszuschließen, wurde ein zeitliches Intervall von mindestens 24 Stunden zwischen den beiden Messungen eingehalten.

Die verwendete Konzentration des Ipratropiumbromids von 10^{-5} mol entsprach dabei der bei der diagnostischen PD-Messung normalerweise verwendeten Konzentration von Salbutamol (s. Kapitel 2.7 und *Tab. 2.1*).

2.8.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL

Azithromycin, ein Derivat des Erythromycins, gehört als Makrolid-Antibiotikum zu einer Gruppe von Antibiotika, über die nicht nur wegen ihrer

antibakteriellen Eigenschaften in den letzten Jahren in der Therapie der Mukoviszidose lebhaft diskutiert wurde.

Das initiale Interesse an den Makroliden erwachte durch Beobachtungen von Patienten mit diffuser Panbronchiolitis, einer vor allem bei Erwachsenen in Ostasien beobachteten Erkrankung, die der Cystischen Fibrose sehr ähnlich ist [49]: Durch eine niedrig dosierte Erythromycin-Therapie konnte die 10-Jahres-Überlebensrate von 20 % auf 90% gesteigert werden, obwohl die Therapiedosen deutlich unterhalb der minimalen Hemmkonzentration für die üblichen Erreger (*Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*) lag [81].

Dafür wurde vor allem ein antiinflammatorischer und weniger der antibakterielle Effekt verantwortlich gemacht [66]. Weitere Untersuchungen bezüglich dieses Effektes der Makrolide erbrachten ähnliche Ergebnisse [52]. Außerdem wurden noch zahlreiche andere Wirkungen dieser Substanzgruppe postuliert, wie zum Beispiel ein Effekt auf den Biofilm bei *Pseudomonas aeruginosa* [51, 116], eine vorteilhafte Modulation der Schleimviskosität [102] oder die Steigerung der Aktivität anderer ATP-bindender Kanäle [1].

Gegenüber dem Erythromycin zeichnet sich Azithromycin durch eine höhere Säurestabilität und verbesserte Absorption sowie ein erweitertes Wirkspektrum gegen gramnegative Bakterien aus. Durch die längere Halbwertszeit im Serum und Gewebe wird eine einmal tägliche Applikation ermöglicht [2].

Eine Studie aus Verona, Italien, legte nach einer vierwöchigen Therapie mit 500 mg Azithromycin p.o. täglich bei 4 von 7 CF-Patienten eine Stimulierbarkeit der CFTR-abhängigen Chloridsekretion nahe [85].

Um zu klären, ob Azithromycin sich auf Ionentransportvorgänge am respiratorischen Epithel bei Cystischer Fibrose auswirkt, untersuchten wir den Einfluss von Azithromycin auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz nach lokaler Anwendung.

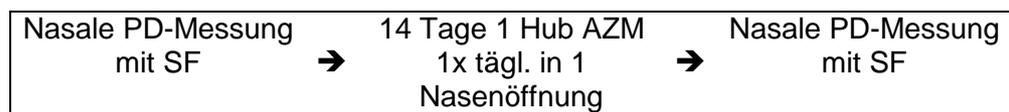
Zur Klärung des möglichen Wirkungsmechanismus war von Interesse, ob sich unter Salbutamol das Ausmaß der Repolarisation durch die lokale AZM-Therapie signifikant verbessern lässt.

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Gießen und der Zustimmung der Mukoviszidose-Patienten bzw. deren Eltern wurde 14 Tage lang einmal täglich mittels Nasenspray 1 Hub Azithromycin (AZM), entsprechend einer Dosis von 15 mg AZM (gelöst in 0,1 ml aqua inject.), in eine Nasenöffnung appliziert. Vor der AZM-Applikation und 14 Tage danach wurde jeweils die PD vor und nach Superfusion von Amilorid, chloridfreier Lösung und Salbutamol gemessen und auf eventuelle Änderungen hin untersucht.

Außerdem wurden - sofern die Messung an beiden Nasenöffnungen akzeptiert wurde - die PD-Werte der exponierten Seite mit denen der Gegenseite verglichen (*Tab. 2.3*).

Das AZM-Nasenspray wurde von der Löwen-Apotheke in Gießen hergestellt.

Tab. 2.3: Studiendesign zum Einfluss des Azithromycin (AZM) auf die PD



2.8.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS

Wie schon in Kapitel 2.1.2 beschrieben, kann durch lokale Anwendung des Natrium-Kanal-Blockers Amilorid die bei CF typischerweise erhöhte PD reduziert und die Viskosität des Bronchialsekrets gesenkt werden, wodurch auch eine verbesserte mukoziliäre Clearance gewährleistet wird [6, 59, 65, 69, 77].

Deshalb wird die Inhalation mit Amilorid als ergänzende Option in der Therapie der Mukoviszidose diskutiert.

Bisher war dazu allerdings die zeitlich aufwändige Verabreichung der Amiloridlösung per Düsen- oder Ultraschallvernebler nötig. Außerdem musste diese Inhalationslösung nach Verordnung speziell von einer dazu befugten Apotheke hergestellt werden, weil eine Amiloridlösung zur inhalativen Applikation nicht kommerziell zur Verfügung steht. Eine vereinfachte Applikationsform war daher wünschenswert.

Der Vorschlag einer australischen Arbeitsgruppe, Amilorid via Pulverinhalation zu verabreichen [32], wurde in Gießen aufgegriffen und Amilorid über den so genannten MAGhaler™, einen treibgasfreien Pulverinhalator, der von der Gesellschaft für Gesundheit und Umwelt (GGU) entwickelt worden war, appliziert [94].

Von besonderem Vorteil ist bei diesem Gerät, dass unmittelbar vor der Inhalation mit einer robusten Keramikfräse ein feines Trockenaerosol von einer Ringtablette abgerieben wird, das wenig agglomeriert, weil es sofort inhaliert wird (*Abb.2.7*). Der MAGhaler™ ist wieder benutzbar. Lediglich der Medikamentenkopf muss nach Aufbrauchen erneuert werden.

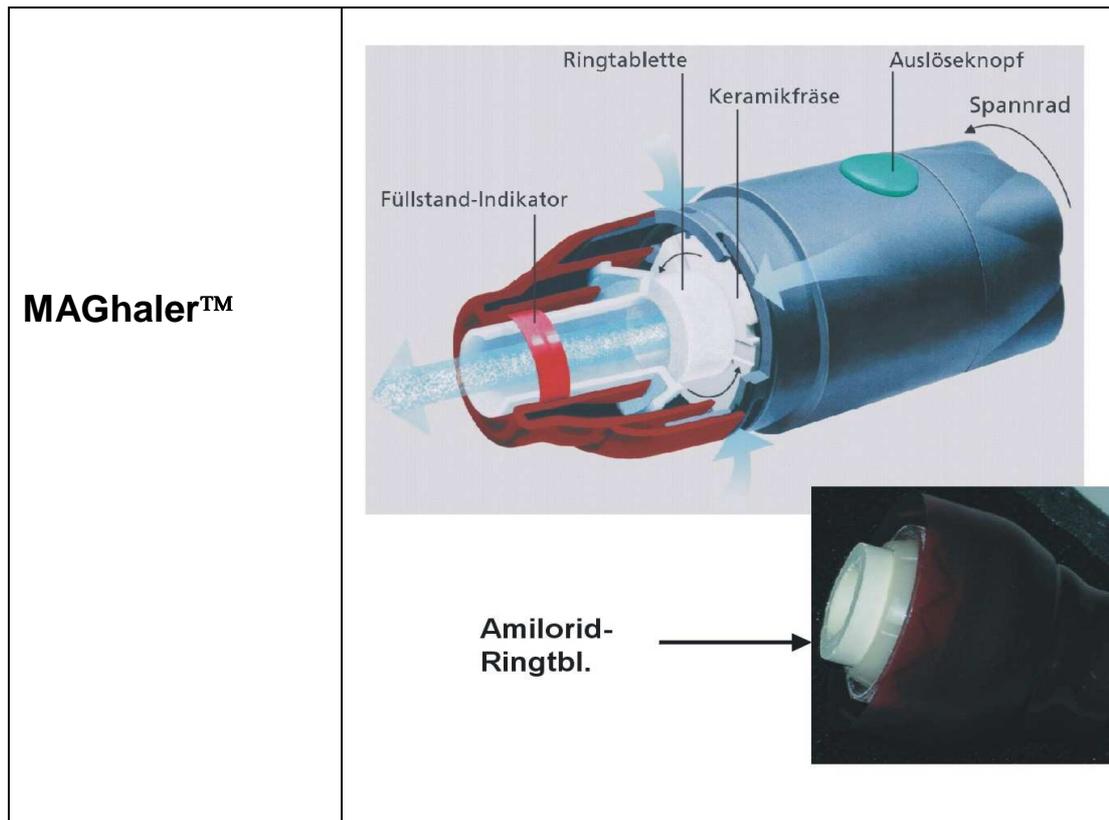


Abb. 2.7: Skizze zum MAGhaler™: Durch Rotation einer Ringfräse wird von einer Ringtablette Aerosol abgerieben

Anhand der aktuellen Untersuchungen wurde versucht, mit Hilfe der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung die Wirkung eines neu entwickelten Amilorid-Inhalationspulvers zu ermitteln.

Dazu wurde der initiale Abfall der PD nach Inhalation des neuen Präparats und dessen dosisabhängige Wirkungsdauer bestimmt.

Zur Ermittlung des initialen Abfalls der PD unter Amilorid wurde die PD vor und nach Inhalation von Amilorid-Pulver in unterschiedlichen Dosierungen bei insgesamt 23 CF-Patienten gemessen.

3 Patienten erhielten 3 Hübe Amilorid, 4 Patienten 4 Hübe, 6 Patienten 5 Hübe und 10 Patienten 6 Hübe Amilorid-Pulver, wobei 1 Hub 140 µg Amilorid (und 1,5 mg Lactose) entsprach.

Anschließend konnte der jeweilige prozentuale Abfall der Potenzialdifferenz bestimmt und die ermittelten Werte miteinander verglichen werden.

Bei den Untersuchungen zur Ermittlung der Wirkungsdauer des neuen Amilorid-Pulvers wurde bei den gleichen Patienten die PD in 15-minütigen Abständen bis zum Zeitpunkt der Rückkehr der PD auf $\geq 50\%$ des Ausgangswertes (ET_{50}) bestimmt. War der 50 %-Wert überschritten, so wurde der genaue ET_{50} -Wert zeichnerisch extrapulatorisch ermittelt.

2.8.4 UNTERSUCHUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZMESSUNG IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN (FALLDARSTELLUNGEN)

Nonsense-Mutationen enthalten ein prämaures Terminationssignal, welches für die Bildung eines verkürzten oder unstabilen CFTR-Proteins verantwortlich ist (betrifft etwa 25 % der CF-Mutationen). Dadurch produzieren sie nur noch wenige oder keine CFTR-abhängigen Chlorid-Kanäle [12, 41, 49].

Durch Aminoglykoside kann die Frequenz fehlerhafter Insertionen der Nonsense-Kodons erhöht werden, was die Fortsetzung der CFTR-Translation bis zum normalen Ende erlaubt [27, 76, 99].

So induzierte Gentamicin in kultivierbaren Cervixcarcinom-Zellen („HeLa-Zellen“), die mit einem eine CFTR-Nonsense-Mutation tragenden Plasmidvektor transfiziert wurden, eine dosisabhängige Erhöhung der CFTR-Expression [49] und stellte in einer CF-Bronchialepithelzelllinie, die die Stoppmutation W1282X trug, die CFTR-Expression an der apikalen Membran wieder her [12].

Nach Erkenntnissen der Arbeitsgruppe um Clancy ist es außerdem möglich, durch systemische Gabe von Gentamicin das vorzeitige Stopp-Signal bei CF-Patienten mit Nonsense-Mutationen in vivo zu unterdrücken [24].

Wilschanski und seine Mitarbeiter postulierten den gleichen Effekt für eine lokale Gentamicin-Applikation [114, 115].

In Anlehnung an deren Studien wurde bei drei CF-Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen der Einfluss einer 14tägigen Gentamicin-Anwendung auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz nach lokaler nasaler Applikation von Gentamicin in eine Nasenöffnung untersucht.

Dabei kam ein im Handel erhältliches Gentamicin-Präparat (Refobacin®-Augentropfen) in der Konzentration von 3 mg/ml als Nasenspray zum Einsatz. Zur Beurteilung des Gentamicin-Effektes wurden die Absolutwerte der PD unter Superfusionsbedingungen und der jeweilige prozentuale Abfall bzw. Anstieg der PD vor und nach Gentamicin-Anwendung ermittelt.

2.9 UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIVE

Insgesamt nahmen 83 Probanden an den Untersuchungen teil, davon waren 55 CF-Patienten und 28 gesunde Probanden.

Die CF-Patienten waren alle Patienten des Zentrums für Kinderheilkunde oder des Zentrums für Innere Medizin der JLU-Gießen.

Die Diagnose der Mukoviszidose wurde durch reproduzierbar pathologische Schweißtests oder/und positive PD-Messungen sowie eine CF-typische Symptomatik gestellt und war meist auch durch eine Genanalyse gesichert.

Dabei fanden sich folgende Mutationen des CFTR-Gens:

- $\Delta F508/\Delta F508$ (21x)
- $\Delta F508$ /unbekannt (10x)
- $\Delta F508/T1234V$ (1x)
- $\Delta F508/R553X$ (3x)
- $\Delta F508/G542$ (2x)
- nicht identifiziert (18x)

Die gesunden Probanden wurden hauptsächlich aus der Studentenschaft der Justus-Liebig-Universität rekrutiert.

Alle Studienteilnehmer waren über den Sinn der Untersuchungen aufgeklärt. Die PD-Messungen erfolgten mit deren Einverständnis bzw. mit dem

Einverständnis ihrer Erziehungsberechtigten. Die Ethikkommission der JLU Gießen hatte den Medikamentenanwendungen zugestimmt.

Als allgemeine Ausschlusskriterien für die Studien galten:

- Inhalation von Amilorid, eines Sympathomimetikums (Salbutamol) oder Parasympatholytikums (Ipratropiumbromid) in einem Zeitraum von acht Stunden vor der Untersuchung
- akute Erkrankungen, insbesondere eine akute Rhinitis oder schwere Allgemeinerkrankung zum Zeitpunkt der Untersuchung
- ausgeprägte Nasenpolypen oder wiederholte Polypektomien, wenn dadurch eine exakte Lokalisation des Messortes nicht mehr möglich war
- Patientenalter unter sechs Jahren

Als wichtigste Bedingungen, die für eine Messung erfüllt sein mussten, galten eine reizfreie, nicht entzündete Nasenschleimhaut und eine ausreichende Compliance.

2.9.1 UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV: „UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF ALTERNATIVE UND CFTR-ABHÄNGIGE CHLORIDKANÄLE AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL“

An dieser Untersuchung nahmen 22 gesunde Probanden zwischen 16 und 47 Jahren ($x = 25$, Med. = 24) teil, davon waren 15 Teilnehmer weiblich und sieben männlich.

Außerdem wurden elf Mukoviszidose-Patienten im Alter von 13 bis 39 Jahren ($x = 26$) (drei weibl., acht männl.) gemessen.

Bei den CF-Patienten fanden sich folgende Genmutationen:

- $\Delta F508/\Delta F508$ (3x)
- $\Delta F508$ /unbekannt (2x)
- $\Delta F508/R553X$ (1x)

- $\Delta F508/G542$ (1x)
- nicht identifiziert (4x)

2.9.2 UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV: „UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL“

An dieser Untersuchung mit 14tägiger Anwendung von Azithromycin nahmen 18 CF-Patienten (sieben weibl., elf männl.) im Alter von 16 bis 39 Jahren ($x = 27$) und den Genmutationen $\Delta F508/\Delta F508$ (5x), $\Delta F508$ /unbekannt (5x) und $\Delta F508/T1234V$ (1x) teil. Bei sieben Patienten war die Mutation nicht identifiziert worden.

15 dieser Patienten stimmten außerdem einem Vergleich zwischen exponierter und nicht exponierter Nasenseite zu.

Neben den allgemeinen Ausschlusskriterien galt eine Therapie mit Makroliden zum Zeitpunkt der Untersuchungen als zusätzliches Ausschlusskriterium.

2.9.3 UNTERSUCHUNGSKOLLEKTIV: „UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS“

An diesen Untersuchungen nahmen insgesamt 23 CF-Patienten zwischen 6 und 43 Jahren ($x = 17$) teil. Davon waren zwölf weiblich und elf männlich.

Bei ihnen fand sich in 13 Fällen die Mutation $\Delta F508/\Delta F508$ und in drei Fällen $\Delta F508$ /unbekannt. Bei sieben Patienten war die Mutation gar nicht identifiziert worden.

Zur Ermittlung des Ausmaßes der Polarisierung und der Wirkungsdauer des Amilorid-Pulvers in verschiedenen Dosierungen wurde die nasale PD bei drei Patienten nach drei Hüben Amilorid, bei vier Patienten nach vier, bei sechs

Patienten mit fünf und bei zehn Patienten mit sechs Hüben bestimmt. Die Zuteilung zu den einzelnen Dosierungs-Gruppen erfolgte zufällig.

2.9.4 PATIENTEN DER FALLDARSTELLUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZ IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN

Diese Untersuchungen wurden bei drei Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen durchgeführt:

Tab. 2.3: *Charakteristika der Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen*

Initialen der Patienten	Alter	Mutation	Keimbesiedlung der Bronchien
D.F.	13 J.	m. Δ F508/R553X	Pseudomonas aeruginosa
P.M.	7 J.	m. Δ F508/R553X	Keine Keime nachweisbar
T.S.	39 J.	m. Δ F508/G542X	Pseudomonas aeruginosa

Alle drei Patienten erhielten außer Gentamicin für den Zeitraum der Studie keine weitere nasale Medikation.

Zusätzliches Gentamicin (parenteral/oral) war spätestens ab einem Zeitpunkt von vier Wochen vor Studienbeginn nicht mehr verabreicht worden.

2.10 STATISTISCHE METHODEN

Bei der Berechnung der statistischen Parameter und beim Erstellen der meisten statistischen Abbildungen wurde das Statistikprogramm WinStat 3.1 für Windows verwendet. Ein kleinerer Teil der Grafiken wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2000 erstellt.

Bei der deskriptiven Statistik dienten Mittelwert (**x**), Median (**Med.**), Standardabweichung (**s**) sowie die größte und kleinste Merkmalsausprägung (**Max./Min.**) der Darstellung der jeweiligen Zielgrößen.

Die Unterschiedshypothesen wurden mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben untersucht, da bei keiner der Studien von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte.

Dabei wurde die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen zwei Gruppen besteht, bei einem p von $< 0,05$ verworfen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (α) betrug demnach 0,05.

3 ERGEBNISSE

3.1 EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF DIE NASALE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZ

Die Blockade der Natriumkanäle durch Amilorid hat eine Depolarisation zur Folge, wodurch die nasale PD sinkt (*siehe Kap. 2.6, 2.8.1*).

Von diesem PD-Niveau aus lässt sich am besten verifizieren, wie sich die anschließende Applikation einer adrenergen Substanz (Salbutamol) bzw. einer anticholinergen (Ipratropiumbromid) auf die nasale PD bei gesunden Probanden und bei Mukoviszidose-Patienten auswirkt.

3.1.1 VERGLEICH DES EFFEKTS VON IPRATROPIUMBROMID MIT SALBUTAMOL AUF DIE NASALE PD NACH NATRIUMKANALBLOCKADE

3.1.1.1 Gesunde Probanden

Die basalen PD-Werte betragen im Mittel $-18,2 \pm 5,4$ mV in der Salbutamol-Gruppe bzw. $-18,7 \pm 5,4$ mV in der Ipratropiumbromid-Gruppe (*Tab. 3.1; Abb. 3.1*). Nach Natriumblockade sank die PD gegenüber dem Ausgangsniveau um durchschnittlich 67,5 % (Salbutamol-Gruppe) bzw. 71,7 % (Ipratropiumbromid-Gruppe).

Unter Salbutamol zeigte sich ein hochsignifikanter Wiederanstieg der nasalen PD mit $11,7 \pm 5,4$ mV, entsprechend $97,0 \pm 28,4$ % (Wilcoxon-Test: $p < 0,001$).

Ipratropiumbromid führte bei den gesunden Probanden zu einer ebenbürtigen Repolarisation der nasalen PD von $11,8 \pm 7,0$ mV, was einem Prozentwert von $92,3 \pm 63,2$ % entspricht ($p < 0,001$; *Tab. 3.2, Einzeldaten im Anhang Tab. 7.1, 7.2*).

Ein signifikanter Unterschied im Ausmaß beider Anstiege bestand nicht ($p = 0,21$).

Auch der Kurvenverlauf der Potenzialdifferenz während der Ipratropiumbromid-Applikation entsprach dem einer Superfusion mit Salbutamol (Abb. 3.3, 3.2).

Tab. 3.1: *Deskriptive Statistik zur PD-Messung am respiratorischen Epithel der Nase vor und nach Amilorid vor chloridfreier Lösung (0Cl) bei gesunden Probanden (n = 22), bevor Salbutamol (Sal) bzw. Ipratropiumbromid (IB) appliziert wurde*

Δ = Differenz

x: Mittelwert; Med.: Median; s: Standardabweichung; Min.: Minimum; Max.: Maximum

	PD-Ausgangswert	PD-Ausgangswert	PD-Differenzen nach Amilorid	Δ PD Ami	PD-Differenzen nach Amilorid	Δ PD Ami
	[mV] Sal-Gruppe	[mV] IB-Gruppe	[mV] Sal-Gruppe	[%] Sal-Gruppe	[mV] IB-Gruppe	[%] IB-Gruppe
x	-18,2	-18,7	-12,3	67,5	-13,4	71,7
Med.	-18,0	-18,0	-11,5	68,0	-13,0	71,9
s	5,4	5,4	3,7	8,2	3,1	10,2
Min.	-10,0	-14,0	-19,0	47,1	-23,0	50,0
Max.	-32,0	-28,0	-6,0	82,6	-10,0	87,5

Tab. 3.2: *Deskriptive Statistik zur PD-Messung am respiratorischen Epithel der Nase mit Salbutamol (Sal) bzw. Ipratropiumbromid (IB) unter Natriumkanalblockade mittels Amilorid bei gesunden Probanden (n=22)*

Abkürzungen s. Legende zu Tab. 3.1

	PD-Anstieg unter Ami, 0Cl + Sal	PD-Anstieg unter Ami, 0Cl + IB
x	11,9 mV (97,0 %)	11,8 mV (92,3 %)
Med.	11,0 mV (97,4 %)	10,0 mV (66,8 %)
s	5,4 mV (28,4 %)	7,0 mV (63,2 %)
Min.	5,0 mV (50,0 %)	3,0 mV (27,3 %)
Max.	25,0 mV (147,1 %)	30,0 mV (250,0 %)

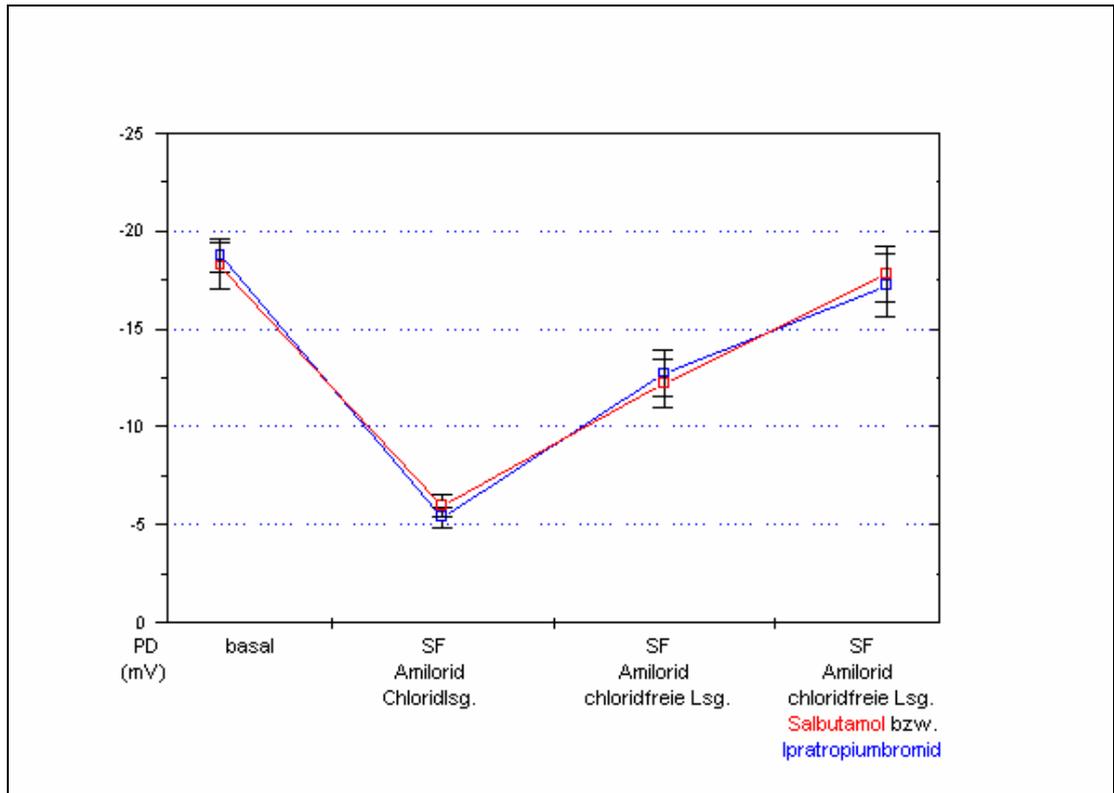


Abb. 3.1: *Nasale PD vor und unter Zusatz von Amilorid, chloridhaltiger bzw. chloridfreier Lösung und Salbutamol bzw. Ipratropiumbromid bei je 22 gesunden Probanden*

Die Markierungen entsprechen Mittelwert und Standardabweichung.

Anhand von zwei Originalregistrierungen wird der Effekt von Salbutamol und Ipratropiumbromid exemplarisch dargestellt (Abb. 3.2, 3.3).

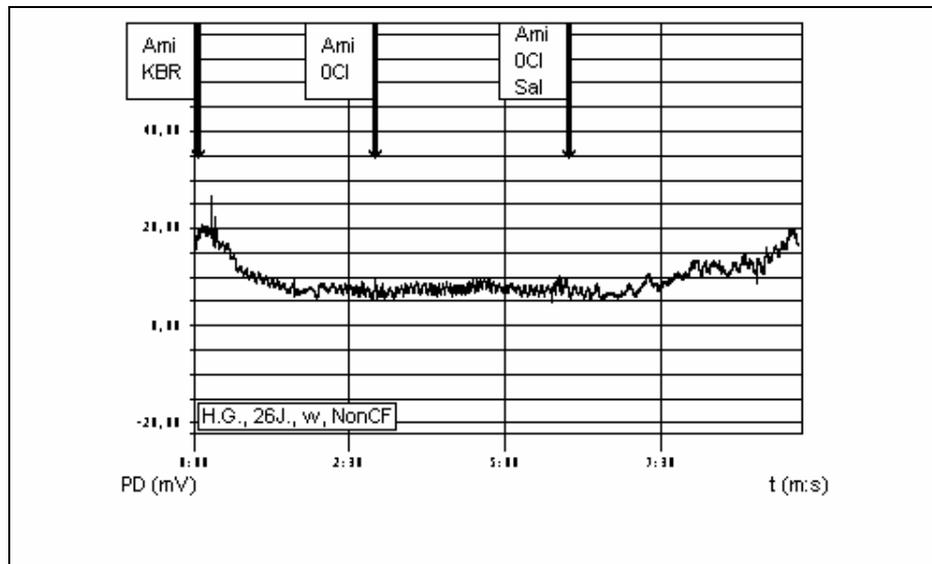


Abb. 3.2: *Typischer Kurvenverlauf einer nasalen PD-Messung unter Superfusion von Salbutamol bei einer 26jährigen gesunden Probandin:*
Basiswert der nasalen PD: -20 mV, unter Amilorid (Ami/KBR): Absinken auf -6 mV; unter Amilorid und chloridfreier Lösung (Ami/OCl) keine signifikante Änderung (-8mV); bei Zusatz von Salbutamol (Ami/OCl/Sal) signifikanter Anstieg auf -17 mV

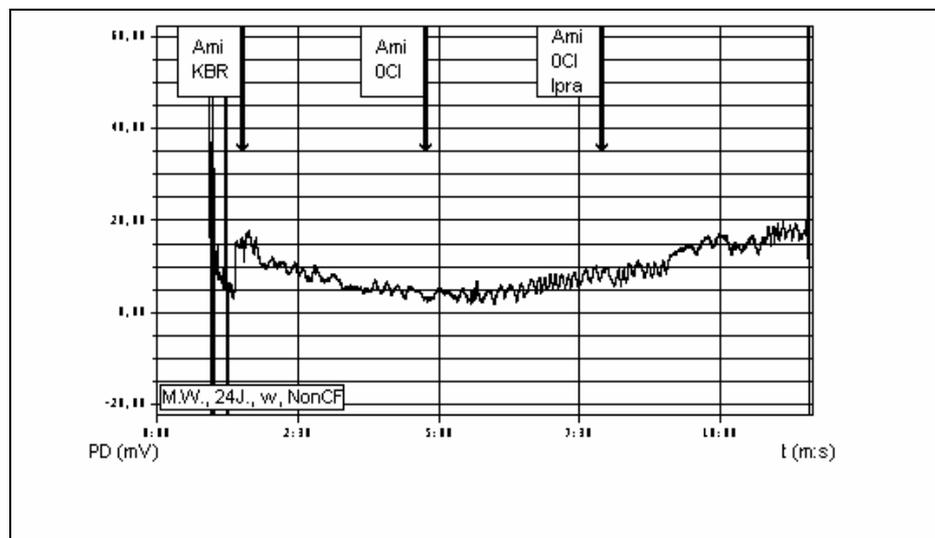


Abb. 3.3: *Kurvenverlauf einer nasalen PD-Messung unter Superfusion von Ipratropiumbromid bei einer 24jährigen gesunden Probandin:*
Basiswert der nasalen PD: -17 mV, unter Ami/KBR: Absinken auf -4 mV; unter Ami/OCl angedeuteter Anstieg auf -9mV; bei Zusatz von Ipratropiumbromid (Ami/OCl/IB) signifikanter Anstieg auf -19 mV

3.1.2.2 Mukoviszidose-Patienten

Das unter Kap. 3.1.1 beschriebene diagnostische Prozedere wurde anschließend bei elf Mukoviszidose-Patienten angewandt (Tab. 3.3).

Die Ausgangswerte waren mit durchschnittlich $-39,8 \pm 16,8$ mV (Salbutamol-Gruppe) bzw. $-35,4 \pm 10,8$ mV (Ipratropiumbromid-Gruppe) deutlich höher als bei den gesunden Probanden (Tab. 3.4). Das prozentuale Absinken der PD gegenüber dem Ausgangsniveau nach Natriumblockade durch Amilorid lag in gleicher Größenordnung wie bei den gesunden Probanden ($64,0 \pm 13,9$ bzw. $63,1 \pm 8,4$ %; vgl. Tab. 3.1).

Tab. 3.3: Resultate der PD-Messung nach chloridhaltigem Amilorid (Ami) und chloridfreiem Amilorid (OCl) sowie nach Applikation der chloridfreien Lösung mit Salbutamol (Sal) bzw. Ipratropiumbromid (IB) bei CF-Patienten (n=11). Angaben in mV, sofern nicht anders gekennzeichnet.

Δ = Differenz

Salbutamol									
PD vor SF	PD Ami	Δ PD Ami	Δ PD Ami %	PD Ami/OCl	Δ PD Ami/OCl	Δ PD Ami/OCl %	PD Ami/OCl/Sal	Δ PD Ami/OCl/Sal	Δ PD Ami/OCl/Sal %
-34	-7	-27	79,4	-8	1	3,7	-9	2	7,4
-25	-7	-18	72,0	-5	-2	-11,1	-5	-2	-11,1
-58	-25	-33	56,9	-27	2	6,1	-28	3	9,1
-37	-15	-22	59,5	-9	-6	-27,3	-8	-7	-31,8
-40	-8	-32	80,0	-8	0	0,0	-7	-1	-3,1
-74	-33	-41	55,4	-21	-12	-29,3	-20	-13	-31,7
-56	-15	-41	73,2	-22	7	17,1	-18	3	7,3
-35	-8	-27	77,1	-13	5	18,5	-15	7	25,9
-38	-25	-13	34,2	-24	-1	-7,7	-23	-2	-15,4
-18	-8	-10	55,6	-5	-3	-30,0	-7	-1	-10,0
-23	-9	-14	60,9	-8	-1	-7,1	-5	-4	-28,6
Ipratropiumbromid									
PD vor SF	PD Ami	Δ PD Ami	Δ PD Ami %	PD Ami/OCl	Δ PD Ami/OCl	Δ PD Ami/OCl %	PD Ami/OCl/IB	Δ PD Ami/OCl/IB	Δ PD Ami/OCl/IB %
-31	-15	-16	51,6	-19	4	25,0	-19	4	25,0
-53	-19	-34	64,2	-16	-3	-8,8	-14	-5	-14,7
-36	-16	-20	55,6	-17	1	5,0	-14	-2	-10,0
-28	-8	-20	71,4	-6	-2	-10,0	-5	-3	-15,0
-40	-11	-29	72,5	-8	-3	-10,3	-8	-3	-10,3
-45	-13	-32	71,1	-10	-3	-9,4	-10	-3	-9,4
-34	-10	-24	70,6	-9	-1	-4,2	-8	-2	-8,3
-48	-14	-34	70,8	-12	-2	-5,9	-14	0	0,0
-34	-15	-19	55,9	-17	2	10,5	-21	6	31,6
-16	-7	-9	56,3	-8	1	11,1	-10	3	33,3
-24	-11	-13	54,2	-5	-6	-46,2	-4	-7	-53,9

Tab. 3.4: *Deskriptive Statistik zur PD-Messung am respiratorischen Epithel der Nase vor und nach Amilorid vor chloridfreier Lösung (0Cl), bevor Salbutamol (Sal) bzw. Ipratropiumbromid (IB) bei CF-Patienten (n=11) appliziert wurde.*

Abkürzungen: s. Legende zu Tab. 3.1

	PD-Ausgangswert	PD-Ausgangswert	PD-Differenzen nach Amilorid	Δ PD Ami	PD-Differenzen nach Amilorid	Δ PD Ami
	[mV] Sal-Gruppe	[mV] IB-Gruppe	[mV] Sal-Gruppe	[%] Sal-Gruppe	[mV] IB-Gruppe	[%] IB-Gruppe
x	-39,8	-35,4	-25,3	64,1	-22,7	63,1
Med.	-37,0	-34,0	-27,0	60,9	-20,0	64,2
s	16,8	10,8	10,9	13,9	8,6	8,4
Min.	-18,0	-16,0	-41,0	34,2	-34,0	51,6
Max.	-74,0	-53,0	-10,0	80,0	-9,0	72,5

Tab. 3.5: *Deskriptive Statistik zur PD-Messung am respiratorischen Epithel der Nase mit Superfusion von Salbutamol (Sal) bzw. Ipratropiumbromid (IB) unter Natriumkanalblockade mittels Amilorid (Ami) und chloridfreier Lösung (0Cl) bei CF-Patienten (n=11)*

Abkürzungen: s. Legende zu Tab. 3.1

	PD-Anstieg unter Ami, 0Cl + Sal	PD-Anstieg unter Ami, 0Cl + IB
x	-1,4 mV (-7,5%)	-1,1 mV (-2,9%)
Med.	-1,0 mV (-10,0%)	-2,0 mV (-9,4%)
s	5,4 mV (18,9%)	4,0 mV (25,2%)
Min.	-13,0 mV (-31,8%)	- 7,0 mV (-53,9%)
Max.	7,0 mV (25,9%)	6,0 mV (33,3%)

Bei Mukoviszidose-Patienten blieb – anders als bei gesunden Probanden (vgl. Tab. 3.2) – ein signifikanter Anstieg der PD sowohl unter Superfusion von Salbutamol als auch unter Superfusion von Ipratropiumbromid aus (Abb. 3.4). Im Gegenteil, es fand sich meist ein leichter, nicht signifikanter Abfall der Potenzialdifferenz (Wilcoxon-Test: p jeweils > 0,05).

Er betrug bei der Superfusion von Salbutamol im Mittel $-1,4 \pm 5,4$ mV, bei der SF von Ipratropiumbromid $-1,1 \pm 4,0$ mV, entsprechend $-7,5 \pm 18,9$ % für Salbutamol bzw. $-2,9 \pm 25,2$ % für Ipratropiumbromid; Tab. 3.4, 3.5).

Die gemessenen Potenzialdifferenz-Werte nach Superfusion von Salbutamol bzw. Ipratropiumbromid zeigten keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon-Test: $p = 0,20$).

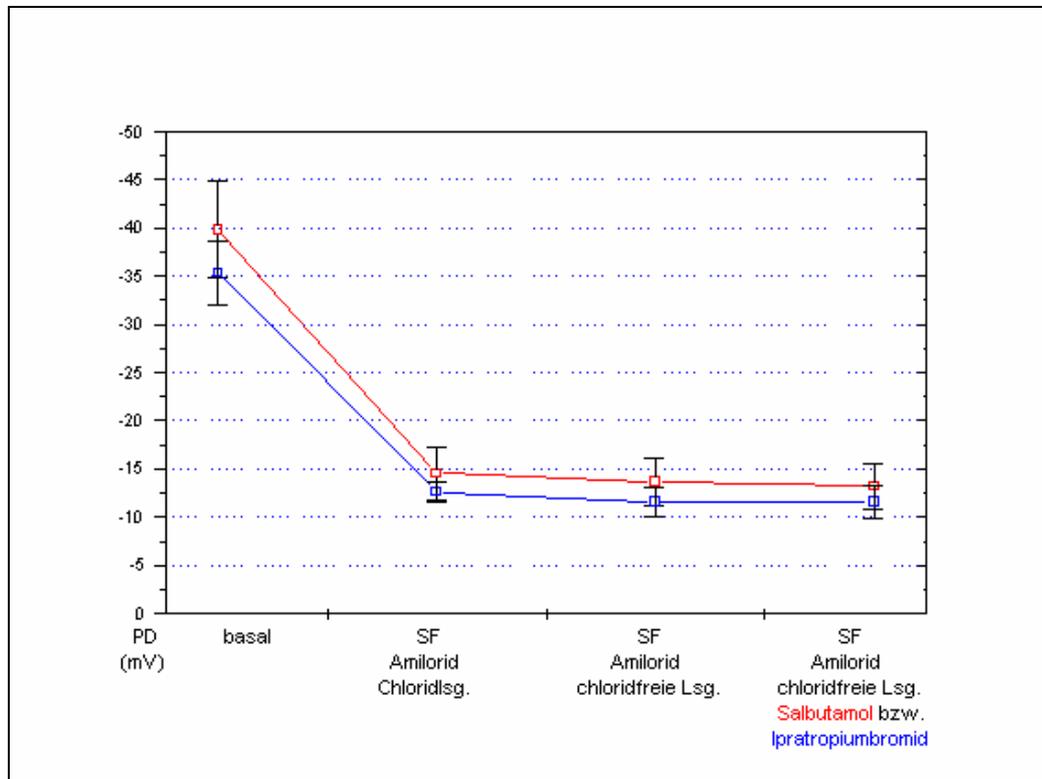


Abb. 3.4: Nasale PD vor und unter Zusatz von Amilorid, chloridhaltiger bzw. chloridfreier Lösung und Salbutamol bzw. Ipratropiumbromid bei je 11 CF-Patienten

Exemplarisch ist ein repräsentativer Kurvenverlauf unter Superfusion von Ipratropiumbromid dargestellt (Abb.3.5).

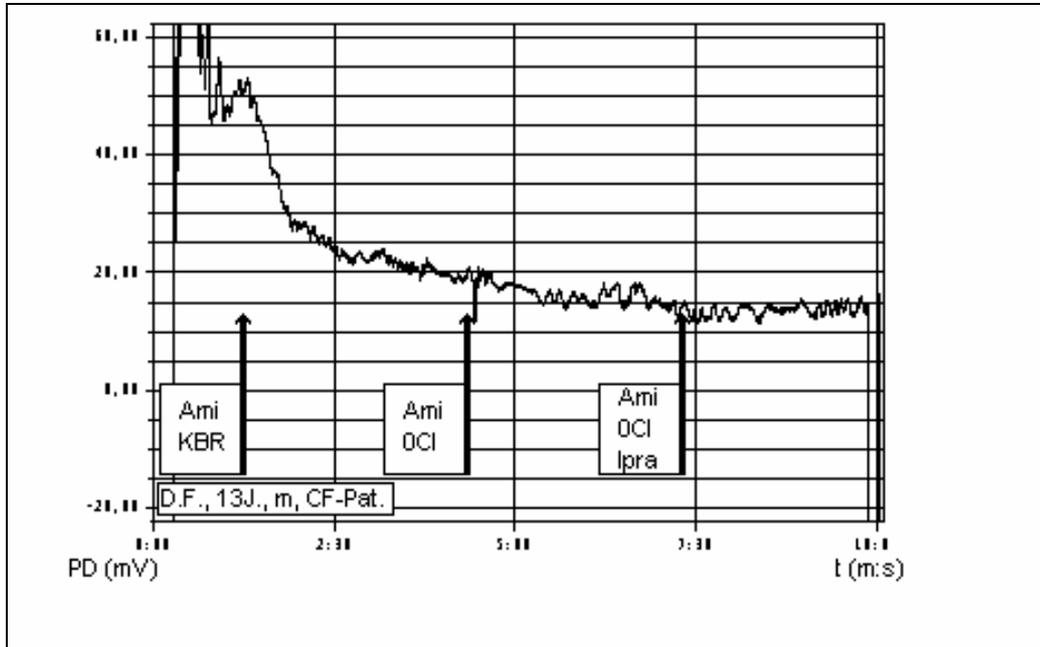


Abb. 3.5: *Kurvenverlauf einer nasalen Superfusionsmessung mit Ipratropiumbromid bei einem 13jährigen CF-Patienten:*

Basiswert der nasalen PD: -53 mV; unter Amilorid (Ami/KBR): Absinken auf -19 mV; unter Amilorid in chloridfreier Lösung (Ami/OCl): -16mV; bei Zusatz von Ipratropiumbromid (Ami/OCl/IB): -14 mV

3.2 EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL BEI CF

Um die Frage zu klären, ob und wie Azithromycin (AZM) die Ionentransportvorgänge am respiratorischen Epithel bei Mukoviszidose beeinflusst, wurden die Auswirkungen einer 14tägigen lokalen Azithromycin-Therapie auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenzmessung bei 18 CF-Patienten untersucht.

3.2.1 VERGLEICH: VOR UND NACH AZITHROMYCIN-THERAPIE

Die vor Azithromycin-Applikation gemessenen PD-Werte lagen im Mittel bei $-35,8 \pm 10,7$ mV, nach Azithromycin-Therapie betrug sie $-33,9 \pm 8,4$ mV (*Tab. 3.6, 3.7, Einzeldaten im Anhang Tab. 7.3*).

Es fand sich kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test: $p = 0,20$). Die Natriumleitfähigkeit nach Blockade der Natriumkanäle durch Amilorid (vor AZM: $-13,2 \pm 6,1$ mV, nach AZM: $-13,8 \pm 5,2$ mV), wurde nur marginal beeinflusst ($p = 0,05$).

Eine signifikante Steigerung der CFTR-unabhängigen („alternativen“) Chloridsekretion durch chloridfreie Lösung (vor AZM: $-15,7 \pm 7,8$ mV, nach AZM: $-15,7 \pm 7,6$ mV) bzw. der CFTR-spezifischen Chloridkanalaktivierung durch chloridfreie Salbutamol-Lösung unter weiterbestehender Natriumkanalblockade (vor AZM: $-14,1 \pm 6,7$ mV, nach AZM: $-15,4 \pm 9,4$ mV) konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Wilcoxon-Test: $p = 0,29$ bzw. $0,23$).

Somit ließen sich die Ionentransportvorgänge an der apikalen Membran des respiratorischen Epithels der Nase durch Applikation eines AZM-Nasensprays in der Gesamtbilanz nicht beeinflussen.

Bei einigen Patienten war allerdings nach Salbutamol eine Restfunktion der CFTR-abhängigen Chloridkanäle zu erzielen (PD-Wiederanstieg um $\geq 20\%$), die in Einzelfällen durch die lokale AZM-Therapie anscheinend verbessert werden konnte (Abb. 3.6).

So war bei den Patienten Nr. 3, 8, 16, und 18 bereits vor AZM-Applikation eine Restfunktion nachweisbar, die sich für den Patienten Nr. 3 reproduzieren und für Pat. Nr. 18 signifikant steigern ließ. Bei den Patienten Nr. 1, 12 und 13 war nach AZM eine zusätzliche Aktivierung der Chloridkanäle nachweisbar.

Bei den Patienten Nr. 8 und 16 gab es konträre Resultate (Anhang Tab. 7.3).

Tab. 3.6: *Deskriptive Statistik zur PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami), chloridfreier Lösung (OCI) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) vor Applikation eines Azithromycin-haltigen Nasensprays bei 18 CF-Patienten*

Δ = Differenz

x: Mittelwert; Med.: Median; s: Standardabweichung; Min.: Minimum; Max.: Maximum

	PD-Ausgangswert [mV]	PD [mV] nach Ami	PD [mV] na. Ami/OCI	PD [mV] na. Ami/OCI/Sal
x	-35,8	-13,2	-15,7	-14,1
Med.	-35,5	-15,0	-14,5	-12,0
s	10,7	6,1	7,8	6,7
Min.	-16,0	-3,0	-5,0	-4,0
Max.	-56,0	-28,0	-30,0	-28,0

Tab. 3.7: *Deskriptive Statistik zur PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami), chloridfreier Lösung (OCI) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) nach 14tägiger Applikation eines Azithromycin-haltigen Nasensprays bei 18 CF-Patienten*

Abkürzungen: s. Legende zu Tab. 3.6

	PD-Ausgangswert [mV]	PD [mV] nach Ami	PD [mV] na. Ami/OCI	PD [mV] na. Ami/OCI/Sal
x	-33,9	-13,8	-15,7	-15,4
Med.	-35,5	-13,0	-14,5	-15,0
s	8,4	5,2	7,6	9,4
Min.	-20,0	-5,0	-5,0	0,0
Max.	-60,0	-25,0	-30,0	-41,0

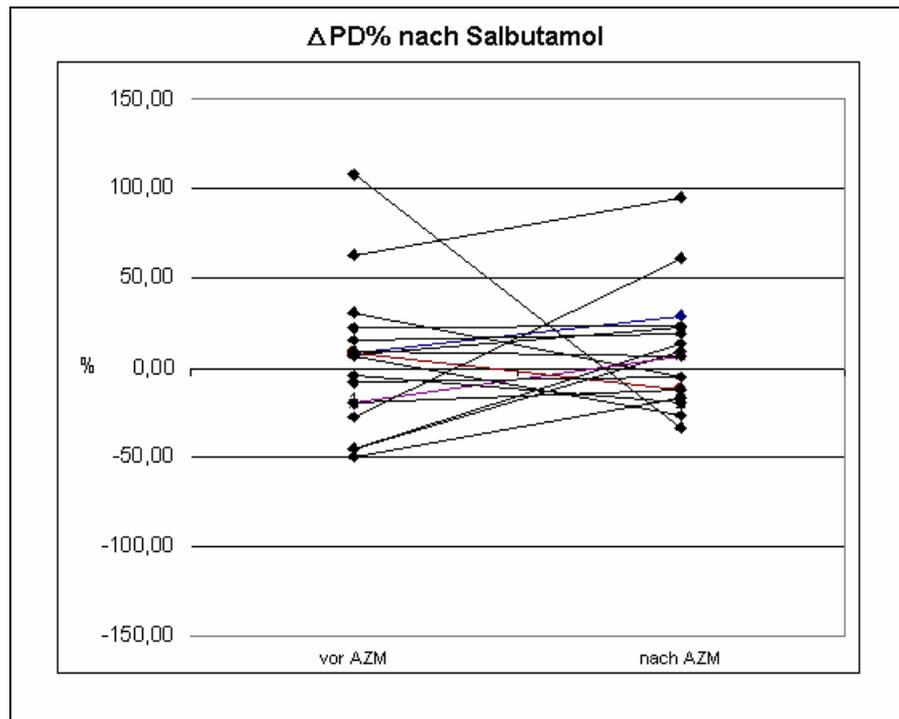


Abb. 3.6: *Prozentualer Wiederanstieg der PD nach Stimulation des Chloridtransports mit chloridfreier Lösung und Salbutamol unter Natriumkanalblockade mit Amilorid vor und nach Applikation von Azithromycin bei 18 CF-Patienten*

$\Delta PD \% =$ *Prozentuale PD-Differenz bezogen auf die Differenz von Basiswert zu Amilorid-Niveau der PD*

3.2.2 VERGLEICH: AZITHROMYCIN-EXPONIERTE SEITE – UNBEHANDELTE GEGENSEITE

PD-Messungen an beiden Nasenöffnungen wurden wegen des erhöhten Zeitaufwandes nicht von allen Patienten akzeptiert. Von 18 Patienten ließen sich nur 15 vor und nach der AZM-Exposition dazu motivieren (*Einzeldaten im Anhang Tab. 7.4, 7.5*).

Bei den PD-Ausgangswerten vor Azithromycintherapie auf einer Nasenseite zeigten sich zwar signifikante Unterschiede (Wilcoxon-Test: $p < 0,05$), nach 14tägiger Azithromycintherapie waren im Seitenvergleich jedoch keine zusätzlichen Veränderungen nachweisbar (p ebenfalls $< 0,05$).

Der durchgeführte Wilcoxon-Test erbrachte weder im prozentualen Abfall der Potenzialdifferenz nach Natriumkanalblockade mit Amilorid ($p = 0,11$), noch im Verhalten der PD nach ergänzender Stimulation der Chloridkanäle durch chlorfreie Lösung alleine (exponierte Seite: $-15,3 \pm 8,3$ mV, nicht exponierte Seite: $-12,2 \pm 10,9$ mV) bzw. mit Salbutamol (exponierte Seite: $-14,9 \pm 10,2$ mV, nicht exponierte Seite: $-11,2 \pm 9,5$ mV) signifikante Unterschiede ($p = 0,29$ bzw. $0,46$).

Einzig die Unterschiede der absoluten Differenz zwischen Basalwerten und Werten nach Amilorid-Superfusion waren signifikant (exponierte Seite: $-13,9 \pm 5,6$ mV, nicht exponierte Seite: $-10,1 \pm 6,4$ mV) (Wilcoxon-Test: $p = 0,04$), (Tab. 3.8, 3.9).

Tabelle 3.8: *PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami), chloridfreier Lösung (OCI) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) nach 14tägiger Applikation eines AZM-haltigen Nasensprays bei CF-Patienten auf exponierter Seite (n=15)*

Abkürzungen: s. Legende zu Tab. 3.6

	PD-Ausgangswert [mV]	PD [mV] nach Ami	PD [mV] na. Ami/OCI	PD [mV] na. Ami/OCI/Sal
x	-34,5	-13,9	-15,3	-14,9
Med.	-33,0	-13,0	-15,0	-14,0
s	8,9	5,6	8,3	10,2
Min.	-60,0	-25	-35	-41
Max.	-20,0	-5	-3	0

Tabelle 3.9: *PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami), chloridfreier Lösung (OCI) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) nach 14tägiger Applikation eines AZM-haltigen Nasensprays bei CF-Patienten auf nicht exponierter Seite (n=15)*

Abkürzungen: s. Legende zu Tab. 3.6

	PD-Ausgangswert [mV]	PD [mV] nach Ami	PD [mV] na. Ami/OCI	PD [mV] na. Ami/OCI/Sal
x	-26,5	-10,1	-12,2	-11,2
Med.	-24,0	-8,0	-8,0	-10,0
s	8,3	6,4	10,9	9,5
Min.	-42,0	-23	-38	-32
Max.	-12,0	-1	1	3

Somit fand sich kein Hinweis darauf, dass sich die Ionentransportvorgänge an der apikalen Membran des respiratorischen Epithels der Nase durch Applikation eines Azithromycin-Nasensprays in der Gesamtbilanz beeinflussen lassen. Dies wird durch die Darstellung mittels Box und Whisker Diagramm verdeutlicht (Abb. 3.7)

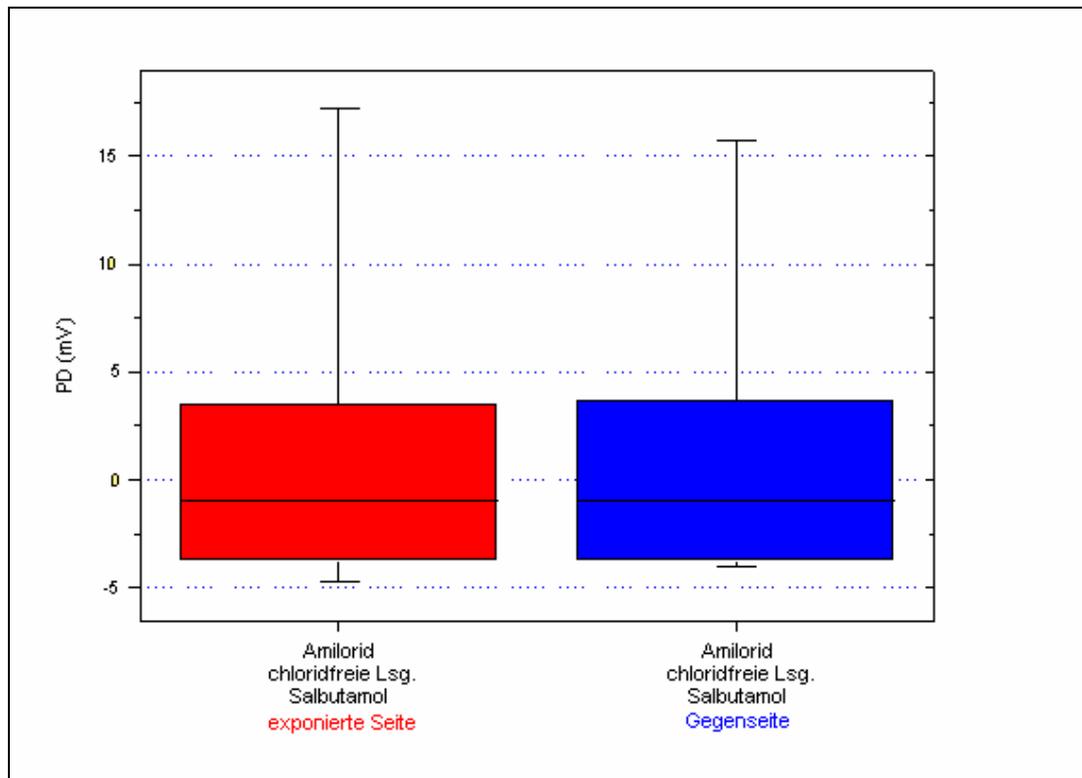


Abb. 3.7: *Absolutwerte der PD an der exponierten und nicht exponierten Seite unter Superfusion von Salbutamol bei 15 CF-Patienten nach 14tägiger Applikation von Azithromycin; Darstellung mittels Box und Whisker Diagramm*

Erläuterung der Markierungen:

Äußere Markierung: 95% Vertrauensbereich

Untere bzw. obere Begrenzung der Kästen: 25 bzw. 75 % Grenze

Markierung innerhalb der Kästen: Median

3.3 WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS

Mit Hilfe der PD-Messung sollte die Wirkung eines neu entwickelten Amilorid-Inhalationspulvers ermittelt werden.

Dazu wurde der initiale Abfall der PD unter Gabe des Präparats und dessen dosisabhängige Wirkungsdauer bestimmt.

3.3.1 INITIALER PD-ABFALL UNTER AMILORID

Das Ausmaß der Repolarisation nach Natriumblockade wurde bei drei CF-Patienten nach nasaler Applikation von drei Hüben (H.) à 140 µg Amiloridpulver gemessen. Bei vier Patienten wurden vier H. Amilorid , bei sechs Patienten fünf H., bei zehn Patienten sechs H. appliziert (*Tab 3.10*).

Das mittlere prozentuale Absinken der PD – bezogen auf den Ausgangswert in mV – betrug nach drei H. Amilorid 65,7 %, nach vier H. 73,0 %, nach fünf H. 69,6 %, nach sechs H. 71,6%.

Der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben ergab beim Vergleich des prozentualen PD-Abfalls der unterschiedlichen Dosierungen untereinander jeweils ein $p > 0,05$. Statistisch ließ sich somit kein signifikanter Unterschied im PD-Abfall für die Dosierungen von 420 bis 840 µg Amiloridpulver nachweisen, obwohl der optische Eindruck einen etwas geringeren Effekt nach 420 µg Amilorid suggeriert (*Abb. 3.8*).

Tab 3.10: Resultate der PD-Messung vor und nach Inhalation (Inh.) von Amilorid-Pulver in unterschiedlicher Dosierung bei CF-Patienten (n=23)

Δ = PD-Differenz bezogen auf den Basiswert der PD

3 Hub (420 µg) Amilorid:				
	PD vor Inh.	PD nach Inh.	Δ PD absolut	Δ PD %
	-30	-16	-14	46,7
	-36	-11	-25	69,4
	-37	-7	-30	81,1
X	-34,3	-11,3	-23,0	65,7
s	3,8	4,5	8,2	17,5
4 Hub (560 µg) Amilorid:				
	PD vor Inh.	PD nach Inh.	Δ PD absolut	Δ PD %
	-44	-14	-30	68,2
	-52	-11	-41	78,9
	-25	-9	-16	64,0
	-37	-7	-30	81,1
X	-39,5	-10,3	-29,3	73,0
s	11,4	3,0	10,2	8,3
5 Hub (700 µg) Amilorid:				
	PD vor Inh.	PD nach Inh.	Δ PD absolut	Δ PD %
	-47	-17	-30	63,8
	-47	-14	-33	70,2
	-51	-20	-31	60,8
	-43	-8	-35	81,4
	-40	-17	-23	57,5
	-37	-6	-31	83,8
X	-44,2	-13,7	-30,5	69,6
s	5,2	5,5	4,1	11,0
6 Hub (840 µg) Amilorid:				
	PD vor Inh.	PD nach Inh.	Δ PD absolut	Δ PD %
	-19	-8	-11	57,9
	-29	-4	-25	86,2
	-19	-5	-14	73,7
	-36	-17	-19	52,8
	-41	-22	-19	46,3
	-27	-1	-26	96,3
	-34	-9	-25	73,5
	-47	-13	-34	72,3
	-45	-9	-36	80,0
	-56	-13	-43	76,8
X	-35,3	-10,1	-25,2	71,6
s	12,2	6,3	10,1	15,3

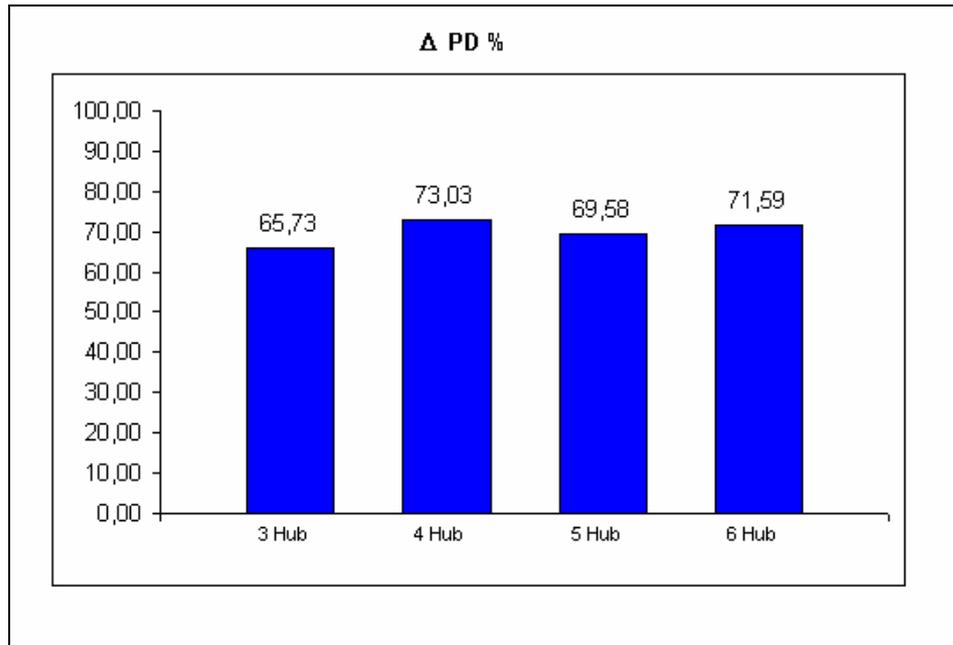


Abb. 3.8: *prozentualer Abfall (Δ PD %) der gemessenen Mittelwerte der PD nach Amilorid-Applikation von 3, 4, 5 und 6 Hübten Amilorid à 140 μ g bezogen auf den Ausgangswert in mV*

3.3.2 DOSISABHÄNGIGE WIRKUNGSDAUER DES AMILORIDS

Zur Ermittlung der Wirkungsdauer des Amilorid-Pulvers in verschiedenen Dosierungen wurde die PD in 15minütigen Abständen bis zum Zeitpunkt der Rückkehr der PD auf ≥ 50 % des Ausgangswertes in mV bestimmt (= ET₅₀).

Hier zeigte sich, dass sich die Wirkungsdauer des Amilorids in Abhängigkeit von der applizierten Amiloriddosis verlängerte.

Bei einer Dosierung von 420 μ g Amilorid wurde die ET₅₀ bereits nach 30 min erreicht. Mit zunehmender Hubzahl verlängerte sich diese Zeitspanne auf bis zu 60 min bei einer Dosierung von 6 H (840 μ g Amilorid).

Für die Dosierungen zwischen 420 μ g und 840 μ g Amilorid ergaben sich dementsprechend Zeiten zwischen 30 und 60 Minuten (Tab. 3.11, Abb. 3.9).

Tab 3.11: Wirkungsdauer von Amilorid in unterschiedlichen Dosierungen bei CF-Patienten (n=23), ermittelt anhand der ET₅₀ (=Zeitpunkt, an dem 50 % des Ausgangswertes der nasalen PD wieder erreicht wurden)

Δ = Differenz

3 Hübe à 140 µg:										
PD Inh.	vor	PD Inh.	nach	Δ absolut	PD	ET ₅₀	ET ₅₀ erreicht nach			
							30 min	45 min	60 min	>60 min
-30		-16		-14		-23	X			
-36		-11		-25		-23,5	X			
-37		-7		-30		-22		X		
x ET₅₀ (min):						35,0				
s ET₅₀ (min):						± 8,7				
4 Hübe:										
PD Inh.	vor	PD Inh.	nach	Δ absolut	PD	ET ₅₀	ET ₅₀ erreicht nach			
							30 min	45 min	60 min	>60 min
-44		-14		-30		-29	X			
-52		-11		-41		-31,5		X		
-25		-9		-16		-17		X		
-37		-7		-30		-22		X		
x ET₅₀ (min):						41,3				
s ET₅₀ (min):						± 7,5				
5 Hübe:										
PD Inh.	vor	PD Inh.	nach	Δ absolut	PD	ET ₅₀	ET ₅₀ erreicht nach			
							30 min	45 min	60 min	>60 min
-47		-17		-30		-32			X	
-47		-14		-33		-30,5		X		
-51		-20		-31		-35,5	X			
-43		-8		-35		-25,5			X	
-40		-17		-23		-28,5	X			
-37		-6		-31		-21,5		X		
x ET₅₀ (min):						45,0				
s ET₅₀ (min):						± 13,4				
6 Hübe:										
PD Inh.	vor	PD Inh.	nach	Δ absolut	PD	ET ₅₀	ET ₅₀ erreicht nach			
							30 min	45 min	60 min	>60 min
-19		-8		-11		-13,5				X
-29		-4		-25		-16,5				X
-19		-5		-14		-12			X	
-36		-17		-19		-26,5			X	
-41		-22		-19		-31,5			X	
-27		-1		-26		-14		X		
-34		-9		-25		-21,5				X
-47		-13		-34		-30				X
-45		-9		-36		-27			X	
-56		-13		-43		-34,5			X	
x ET₅₀ (min):						> 58,5				
s ET₅₀ (min):						</=> ± 4,7				

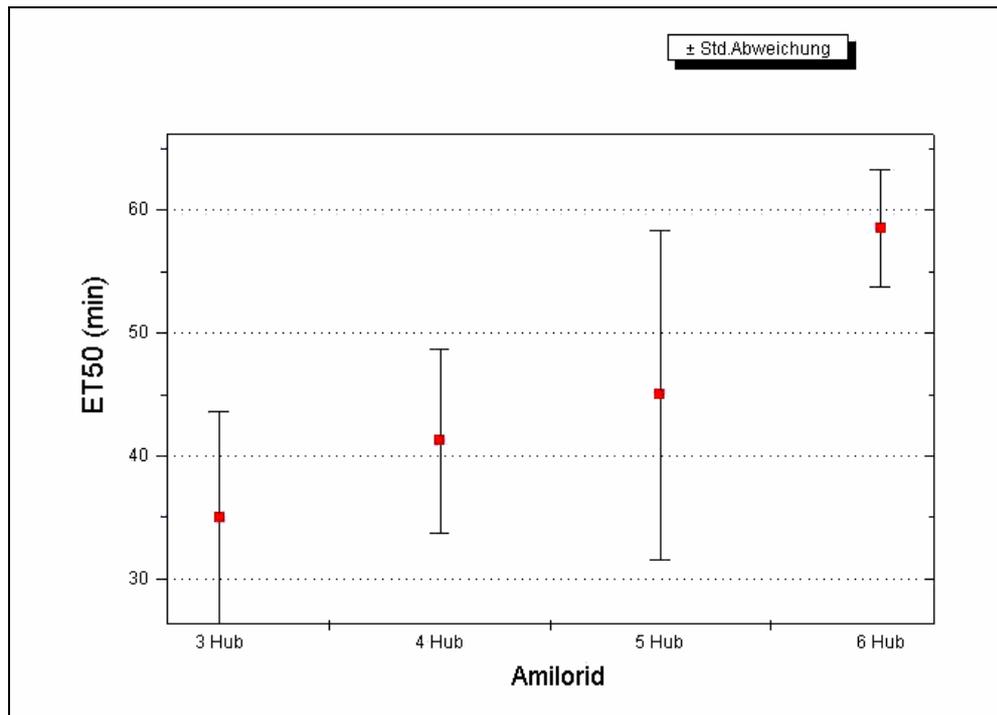


Abb. 3.9: *Wirkungsdauer von Amilorid, ermittelt anhand der ET_{50} (Zeitpunkt, zu dem 50% des Ausgangswertes der nasalen PD wieder erreicht wurde) nach Applikation von 3, 4, 5 und 6 Hübren à 140 µg Amilorid*

3.4 FALLDARSTELLUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZ IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUND-HETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN

In einer Pilotstudie wurde bei drei CF-Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen der Einfluss einer 14tägigen nasalen Gentamicin-Anwendung auf die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz untersucht.

Bei einem der drei Patienten (D.F.) lag der Ausgangswert der nasalen PD nach Gentamicin-Applikation zwar deutlich unter dem Basiswert, der vor Gentamicin-Applikation beobachtet wurde (vorher -55 mV, nachher -24 mV). Das prozentuale Absinken nach Amilorid (76,4 % bzw. 79,2 %) war davon jedoch unabhängig (*Tab. 3.12*).

Die Repolarisation nach chloridfreier Lösung (-2 bzw. 0 %) war vernachlässigbar gering. Nach Applikation eines Beta-2-Mimetikums bestand allerdings eine signifikante Diskrepanz (vorher $-11,9$ %, nach Gentamicin-Therapie $+15,8$ %) gegenüber dem PD-Niveau nach Amilorid, wenn man von einer Variabilität der PD von maximal 20 % ausgeht.

Bei dem zweiten Patienten (P.M.) war das PD-Verhalten ähnlich. Der Wiederanstieg der PD unter Beta-2-Mimetikum war allerdings geringer (vorher $+11,8$ %, nach Gentamicin-Therapie $+18,2$ %; *Tab. 3.13*).

Bei dem dritten Patienten (T.S.) fand sich dagegen kein statistisch signifikanter Unterschied der PD gegenüber dem Amiloridniveau unter den verschiedenen Pharmaka einschließlich Beta-2-Mimetikum (*Tab. 3.14*; *Abb. 3.10*).

Auf der nicht mit Gentamicin behandelten Seite ließ sich bei keinem der drei Patienten ein PD-Anstieg nachweisen, was den Einfluss der Gentamicin-Therapie auf die PD bei den Patienten 1 und 2 unterstreicht (*Abb. 3.11*).

Tab. 3.12: PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami/KBR), chloridfreier Lösung (OCl) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) ohne bzw. mit 14tägiger Applikation von Gentamicin bei Patient D.F., 13J., m., ΔF508/R553X

D.F., 13J., m. ΔF508/R553X	Nasale PD [mV]	Abfall/Anstieg [mV]	Abfall/Anstieg [%]
vor Gentamicin			
basal:	-55		
nach SF Ami/ KBR:	-13	-42	-76,4
nach SF Ami/ OCl:	-12	-1	-2,4
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-8	-5	-11,9
nach Gentamicin			
basal:	-24		
nach SF Ami/ KBR:	-5	-19	-79,2
nach SF Ami/ OCl:	-5	±0	±0
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-8	+3	+15,8
nach Gentamicin (unbehandelte Nasenseite)			
basal:	-25		
nach SF Ami/ KBR:	-7	-18	-72,0
nach SF Ami/ OCl:	-5	-2	-11,1
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-5	±0	±0

Tab. 3.13: PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami/KBR), chloridfreier Lösung (OCl) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) ohne bzw. mit 14tägiger Applikation von Gentamicin bei Patient P.M., 7J., m., ΔF508/R553X

P.M., 7J., m. ΔF508/R553X	Nasale PD [mV]	Abfall/Anstieg [mV]	Abfall/Anstieg [%]
vor Gentamicin			
basal:	-40		
nach SF Ami/ KBR:	-6	-34	-85,0
nach SF Ami/ OCl:	-8	+2	+5,9
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-10	+4	+11,8
nach Gentamicin			
basal:	-37		
nach SF Ami/ KBR:	-4	-33	-89,2
nach SF Ami/ OCl:	-8	+4	+12,1
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-10	+6	+18,2
nach Gentamicin (unbehandelte Nasenseite)			
basal:	-24		
nach SF Ami/ KBR:	-10	-14	-58,3
nach SF Ami/ OCl:	-7	-3	-21,4
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-6	-4	-28,6

Tab. 3.14: PD-Messung nach Superfusion von Amilorid (Ami/KBR), chloridfreier Lösung (OCl) bzw. chloridfreier Salbutamol-Lösung (Sal) ohne bzw. mit 14tägiger Applikation von Gentamicin bei Patient T.S., 39J., m., $\Delta F508/G542X$

T.S., 39J., m. $\Delta F508/G542X$	Nasale PD [mV]	Abfall/Anstieg [mV]	Abfall/Anstieg [%]
vor Gentamicin			
basal:	-34		
nach SF Ami/ KBR:	-21	-13	-38,2
nach SF Ami/ OCl:	-20	-1	-7,7
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-18	-3	-23,1
nach Gentamicin			
basal:	-30		
nach SF Ami/ KBR:	-14	-16	-53,3
nach SF Ami/ OCl:	-13	-1	-6,3
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-13	-1	-6,3
nach Gentamicin (unbehandelte Nasenseite)			
basal:	-38		
nach SF Ami/ KBR:	-25	-13	-34,2
nach SF Ami/ OCl:	-24	-1	-7,7
nach SF Ami/ OCl/ Sal:	-23	-2	-15,4

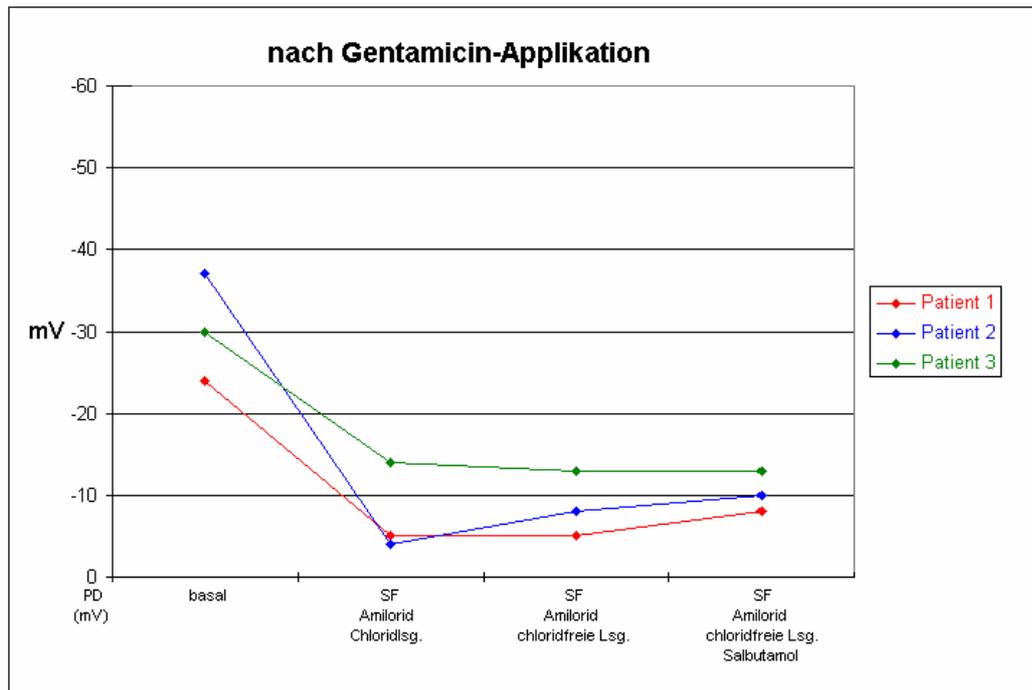


Abb. 3.10: Potenzialdifferenzmessung (PD) nach Gentamicin-Therapie bei 3 CF-Patienten

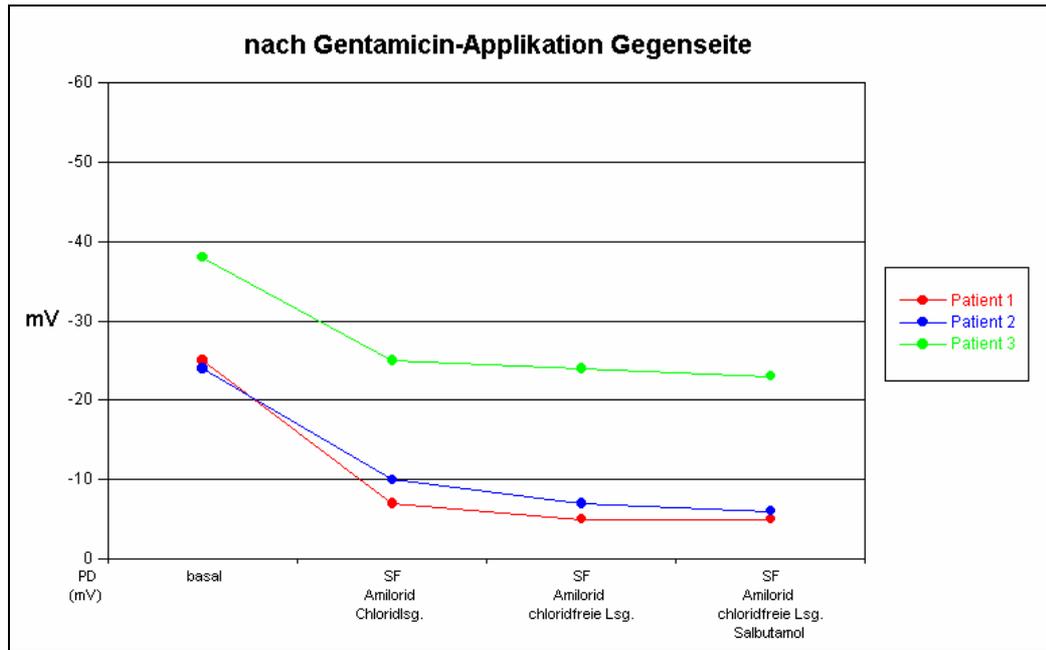


Abb. 3.11: *Potenzialdifferenzmessung (PD) an der nicht exponierten Seite nach Gentamicin-Applikation bei 3 CF-Patienten*

4 DISKUSSION

4.1 ALLGEMEINES ZUR TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG

Die nasale transepitheliale Potenzialdifferenzmessung dient vor allem bei unklaren Fällen als ergänzende Methode in der Diagnostik der Mukoviszidose.

Da bei einem Teil der CF-Patienten die Schweißdrüsen nicht ins Krankheitsgeschehen mit einbezogen sind, stellt die PD-Messung im Falle eines grenzwertigen Schweißtests oder einer isolierten exokrinen Pankreasinsuffizienz eine kostengünstige Alternative zur Genanalyse dar [72].

Darüber hinaus ist die PD-Messung für die Grundlagenforschung unentbehrlich geworden. Zunächst nur in Biologie und Physiologie bei Messungen an Tieren und menschlichen Zellverbänden verwendet, wird seit 1981 die Bestimmung der PD auch beim Menschen zur Beurteilung der Membranfunktion in vivo herangezogen [17, 33, 58, 106].

Die eingangs beschriebene Messvorrichtung ist in der Zusammensetzung und Wartung der einzelnen Elemente allerdings sehr aufwendig, da ein Gerät zur Bestimmung der Potenzialdifferenz bislang nicht kommerziell verfügbar ist.

Durch die verschiedenen Schlauchsysteme und die in mehreren Schritten herzustellenden Agarbrücken ist die Messanordnung störanfällig, und es bedarf einiger Erfahrung, das System zu warten und zu bedienen. Dennoch gilt die von Boucher entwickelte Methode bis heute als Goldstandard, da die Entwicklung eines vereinfachten PD-Messgerätes für die breite klinische Anwendung bisher nicht erfolgreich war [17, 119].

Bei Anwendung der Superfusion kann die PD-Messung und die lokale Applikation von Pharmaka an gleicher Position vorgenommen werden. Dieses Vorgehen eignet sich daher besonders zur klinischen Forschung unter

anderem zur Bestimmung des Anteils noch funktionierender CFTR-abhängiger Chloridkanäle bei bekannter Mukoviszidose [60].

4.2 DER EINFLUSS VON IPRATROPIUMBROMID AUF ALTERNATIVE UND CFTR-ABHÄNGIGE CHLORIDKANÄLE AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL

Ipratropiumbromid wird häufig als schonender Bronchodilatator bei bronchialer Überempfindlichkeit eingesetzt [21]. Als Anticholinergikum entfaltet es seine Wirkung über den cGMP-Transduktionsweg etwa 1,4- bis 2-mal stärker als Atropin [10] und scheint gerade in der Behandlung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen und als inhalativer Bronchodilatator im Säuglingsalter besonders effektiv zu sein (s. Kap. 2.8.1). Auch vom Nebenwirkungsprofil her ist es attraktiv. Allenfalls wird eine leichtgradige Beeinflussung der Speichelsekretion und ein geringer Anstieg der Herzfrequenz je nach Dosierung und Art der Applikation in der Literatur beschrieben [16, 20]. Dadurch wird Ipratropiumbromid zu einer guten Alternative, wenn β -Mimetika wegen kardialer Nebenwirkungen kontraindiziert sind.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass durch Ipratropiumbromid eine Beeinflussung der am respiratorischen Epithel abgeleiteten Potenzialdifferenz möglich ist [103]. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen war ein wichtiges Anliegen der vorliegenden Arbeit.

Es ließ sich zeigen, dass Ipratropiumbromid unter Natriumblockade mittels Amilorid bei gesunden Probanden zu einem signifikanten Wiederanstieg der PD führt ($p < 0,001$), vergleichbar der Reaktion auf Salbutamol-Superfusion. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Ipratropiumbromid bei gesunden Probanden zu einer lumenwärts gerichteten Chloridsekretion führt, welche am Wiederanstieg der nasalen PD messbar ist. Der Kurvenverlauf der

PD-Messung unter Superfusion von Salbutamol entsprach dem unter Applikation von Ipratropiumbromid.

Bei den untersuchten Mukoviszidose-Patienten blieb hingegen ein signifikanter Anstieg der PD sowohl unter Applikation von Salbutamol als auch von Ipratropiumbromid aus. Die gemessenen PD-Werte vor und nach Superfusion zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,21$).

Da bei CF-Patienten ein Defekt an den CFTR-abhängigen Chloridkanälen der apikalen Zellmembran des respiratorischen Epithels vorliegt [4], kann man aufgrund des Wiederanstiegs der PD bei Gesunden (ohne CFTR-Kanaldefekt) und angesichts des ausbleibenden Wiederanstiegs bei Mukoviszidose-Patienten (mit CFTR-Kanaldefekt) vermuten, dass durch Applikation von Ipratropiumbromid wie von Salbutamol der CFTR-Kanal stimuliert wird.

Allerdings muss noch geklärt werden, an welcher Stelle des CFTR-Kanals Ipratropiumbromid seine chloridsekretionsfördernde Wirkung entfaltet.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse ist - vor allem bei jungen Kindern - der diagnostische Einsatz von Ipratropiumbromid im Rahmen der PD-Messung als Alternative zu Salbutamol bzw. Isoproterenol zu erwägen [98].

Mittelfristig könnten sich Anticholinergika angesichts der großen therapeutischen Breite auch in der Prävention als sinnvoll erweisen: Für Patienten, bei denen der Nachweis einer Restfunktion der CFTR-abhängigen Chloridkanäle gelingt, hätte eine Substanz wie zum Beispiel Tiotropium, die nur einmal pro Tag appliziert werden muss, besondere Vorteile [110].

4.4 DER EINFLUSS VON AZITHROMYCIN AUF DEN IONENTRANSPORT AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL

Nach dem Vorbild der in Kapitel 2.8.2 zitierten italienischen Studie [86] wurde versucht, an einem größeren Patientenkollektiv zu klären, ob und wie

Azithromycin (AZM) die Ionentransportvorgänge bei Cystischer Fibrose beeinflusst. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie die lokale AZM-Applikation mittels Nasenspray der von der italienischen Arbeitsgruppe verwendeten hoch dosierten systemischen Anwendung vorgezogen.

Nach 14tägiger Anwendung des AZM-Sprays in eine Nasenöffnung fand sich bei der Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz an 18 CF-Patienten kein signifikanter Unterschied in den PD-Basalwerten des respiratorischen Epithels ($p = 0,20$). Die Natriumleitfähigkeit nach Blockade der Natriumkanäle durch Amilorid wurde nur marginal beeinflusst ($p = 0,05$). Eine signifikante Steigerung der CFTR-unabhängigen („alternativen“) Chloridsekretion durch chloridfreie Lösung bzw. der CFTR-spezifischen Chloridkanalaktivierung durch chloridfreie Salbutamol-Lösung unter weiterbestehender Natriumkanalblockade konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden ($p = 0,29$ bzw. $0,23$).

Bei einigen CF-Patienten (Nr. 3, 8, 16, und 18) war nach Salbutamol eine Restfunktion der CFTR-abhängigen Chloridkanäle erkennbar. Von einer solchen geht man aus, wenn durch ein Betamimetikum oder ein Anticholinergikum ein PD-Wiederanstieg um $\geq 20\%$ erreicht wird [46]. Bei Patient Nr. 18 ließ sich die Restfunktion durch die AZM-Therapie signifikant steigern. Bei einzelnen Patienten (Nr. 1, 12 und 13) ohne initiale Restfunktion konnte durch AZM der Umfang der Repolarisation signifikant verbessert werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass mittels AZM eine zusätzliche Aktivierung der Chloridkanäle erfolgt. Angesichts der konträren Resultate bei den Patienten Nr. 8 und 16 muss allerdings vor einer Überinterpretation gewarnt werden.

Auch im Vergleich zwischen AZM-exponierter Seite und der nicht mitbehandelten Gegenseite ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Messung der Potenzialdifferenz, und zwar weder nach Natriumblockade ($p = 0,11$) noch nach ergänzender Stimulation der Chloridkanäle durch chlorfreie Lösung alleine ($p = 0,29$) bzw. mit Salbutamol ($0,46$). Allein die Unterschiede der absoluten Differenz zwischen Basalwerten

und Werten nach Amilorid-Superfusion waren signifikant ($p = 0,04$), was möglicherweise auf die Divergenz der Basalwerte zurückzuführen ist.

Die in klinischen Studien gezeigten positiven Effekte des Azithromycins sind demnach wahrscheinlich eher auf dessen anti-inflammatorische Wirkungen zurückzuführen als auf eine direkte Beeinflussung der Ionentransportvorgänge [52].

Es ist nicht ganz auszuschließen, dass durch die in der vorliegenden Studie bevorzugte lokale Applikation die Konzentration des Wirkstoffes am Messort nicht ausreicht. Bedenken gegen eine langfristige systemische Anwendung in der von Pradal et al. empfohlenen Dosis [85] sind wegen unerwünschter Wirkungen jedoch nicht von der Hand zu weisen [122].

4.5 DIE WIRKUNG EINES NEUEN AMILORID-PULVERS

Die Verwendung des Natrium-Kanal-Blockers Amilorid in Pulverform ist ein neuer Ansatz in der Mukoviszidose-Therapie, nachdem in verschiedenen Arbeiten dargestellt wurde, dass bei lokaler Anwendung von Amiloridlösung die nasale transepitheliale Potenzialdifferenz reduziert, die Viskosität des Bronchialsekrets gesenkt und die mukoziliäre Clearance verbessert werden kann [6, 59, 65, 69, 77].

Diese Möglichkeit der Prävention mit Amilorid geriet in den letzten Jahren weitgehend in Vergessenheit, weil die Resultate einiger Studien, die sich ausschließlich auf die Feuchtinhalation mit Amiloridlösung in mäßiger Konzentration beschränkten, nicht überzeugend ausfielen [21].

Neue Anstrengungen auf diesem Gebiet mit Hilfe eines Amiloridpulvers erscheinen gerechtfertigt, zumal kürzlich der präventive Effekt der Amiloridtherapie an einem transgenen Mausmodell mit gewebespezifischer Überexpression von Natriumkanälen in der apikalen Membran des respiratorischen Epithels bestätigt werden konnte [120]. Sie sind umso vielversprechender, weil kürzlich dokumentiert wurde, dass die Natrium-

Hyperabsorption nicht allein durch den elektrochemischen Gradienten zu erklären ist, sondern auch von der Generierung zusätzlicher Natrium-Kanäle abhängig ist [7].

Auf der Basis früherer Forschungsergebnisse [32, 67] wurde versucht, in einer ersten orientierenden Untersuchung mit Hilfe der nasalen transepithelialen PD-Messung Erkenntnisse zur Dosierung und Wirkdauer eines neu entwickelten Amilorid-Pulvers zu gewinnen.

Das Präparat wurde zusammen mit der Gießener Löwen-Apotheke entwickelt. Es kann mit Hilfe des von der Gesellschaft für Gesundheit und Umwelt entwickelten MAGhalers™ appliziert werden [94]. Durch eine neue Technik lässt sich ein Pulver generieren, das eine geringere Agglomerationsneigung hat als herkömmliche Pulverpartikel, so dass die Partikelgröße im Vergleich zu den gebräuchlichen Inhalatoren Novolizer und Turbohaler reduziert ist und eine bessere Lungendeposition resultiert [81].

Es ließ sich zeigen, dass bei Dosierungen von drei bis sechs Hüben à 140 µg Amilorid der initiale Abfall der PD unter Amilorid gleich war, die Wirkdauer aber mit Zunahme der applizierten Dosis zunahm.

Im Vergleich zur Amilorid-Inhalation über Vernebler wäre eine weitere Steigerung der Inhalatmenge bei einem Pulver wesentlich einfacher zu realisieren, da der Zeitaufwand der höher dosierten Pulverapplikation im Vergleich zur Steigerung der Inhalatmenge bei Feuchtinhalation wesentlich geringer ist.

Die Darreichung von Amilorid in Pulverform kann somit als eine geeignete, Zeit sparende Applikationsform angesehen werden.

Für eine ausreichende Wirkungsdauer des Amilorids ist nach den bisherigen Ergebnissen allerdings eine mindestens dreimalige Inhalation pro Tag erforderlich. Dies erfordert ein hohes Maß an Compliance der Patienten, das nur von einem Teil der Patienten erwartet werden kann [39].

Die Entwicklung länger wirkender Natriumblocker wäre demnach wünschenswert. Die Suche nach Amiloridanaloga mit wesentlich längerer

Wirkungsdauer war bisher wenig erfolgreich [15, 43, 47, 90]. Mittelfristig wäre eine Substanz hilfreich, die maximal zweimal täglich inhaliert werden muss.

Kürzlich gelang erstmals *in vitro* eine nachhaltige Natriumblockade mittels Antisense-Technik. Dabei werden Antisense-Oligonukleotide (AON) verwendet, die sequenzabhängig an die mRNA der epithelialen Natriumkanäle (ENaC) binden und hochspezifisch die ENaC-Expression unterdrücken. In Vorarbeiten konnte bereits erfolgreich an humanen primären Nasenepithelzellen gezeigt werden, dass die AON die ENaC-Aktivität mit Erfolg hemmen können [101].

Zurzeit sind die Vorbereitungen für erste *in vivo*-Untersuchungen in vollem Gange.

4.6 FALLDARSTELLUNGEN ZUM EFFEKT VON GENTAMICIN AUF DIE POTENZIALDIFFERENZMESSUNG IN VIVO BEI PATIENTEN MIT COMPOUNDHETEROZYGOTEN STOPPMUTATIONEN

In Anlehnung an das Vorgehen der israelischen Arbeitsgruppe um Kerem, die einen Effekt von lokal appliziertem Gentamicin auf die Potenzialdifferenzmessung *in vivo* bei Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen postulierte [114, 115], wurde bei drei Mukoviszidose-Patienten mit dieser Mutationsform der Einfluss einer 14tägigen Gentamicin-Anwendung auf die nasale transepitheliale PD untersucht. Gentamicin wurde dabei lokal in eine Nasenöffnung appliziert (Kap. 2.8.4).

Bei zwei der drei Patienten erfüllten sich die Hoffnungen, dass die lokale Anwendung von Gentamicin zumindest eine partielle Wiederherstellung der CFTR-Expression an der apikalen Zellmembran bewirken kann. Bei ihnen zeigte sich ein partieller Wiederanstieg der PD, vor allem auch im Vergleich zur nicht exponierten Gegenseite. Als Grundlage zur Beurteilung des Effekts wurde die Variabilität der PD herangezogen, die nach einer kürzlich abgeschlossenen Untersuchung an CF-Patienten in Gießen im Mittel knapp

18 % beträgt [14]. Mit nur drei untersuchten Patienten war eine weitere statistische Verifizierung der Ergebnisse nicht zulässig.

Darüber hinaus ist anzumerken, dass sich keine der von Wilschanski et al. getesteten Stopp-Mutation W1282X unter den rekrutierten Patienten fand.

Die Resultate sind aber immerhin so ermutigend, dass es gerechtfertigt erscheint, weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv durchzuführen. Allerdings hätte ein solches Projekt in Deutschland nur bei Kooperation aller CF-Zentren Aussicht auf Erfolg, da von Stoppmutationen weltweit insgesamt nur etwa 10% der Bevölkerung, in Israel dagegen über 50 % betroffen sind [35, 54].

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Die nasale transepitheliale Potenzialdifferenzmessung (PD) dient der Diagnosestellung der Mukoviszidose (CF) und der Klärung des Anteils noch funktionierender CFTR*-abhängiger Chloridkanäle bei bekannter CF. Außerdem wird sie in der Grundlagenforschung eingesetzt.

Bei der Mukoviszidose kommt es aufgrund eines Gendefektes des CFTR*-Chloridkanals zur Störung der zum Lumen hin gerichteten Chloridsekretion, was eine gesteigerte Natriumreabsorption in die Zelle zur Folge hat und damit einen Verlust an positiven Valenzen auf der Zelloberfläche. Dieses wird als erhöhte Potenzialdifferenz messbar.

Verschiedene Substanzen, welche teilweise bereits als Therapeutika in der Mukoviszidose-Therapie eingesetzt werden, beeinflussen die PD durch Einwirkung auf die direkten oder indirekten Ionenströme.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung den Einfluss verschiedener Medikamente auf die Funktion der Ionenkanäle am respiratorischen Epithel zu überprüfen. In die Untersuchungen wurden Ipratropiumbromid, Azithromycin, Amilorid und Gentamicin einbezogen.

Methodik

Mittels Superfusion wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung während der PD-Messung verschiedene Testlösungen auf das nasale Epithel appliziert.

In einer Untersuchung an insgesamt 22 gesunden Probanden (im Alter von 16 bis 47 Jahren) und 11 CF-Patienten (13 bis 39 J.) wurde unter Hemmung der apikalen Natriumabsorption mittels Amilorid die nasale Mukosa aufeinander folgend mit chloridhaltiger, chloridfreier und danach chloridfreier Lösung in Kombination mit dem β -Sympathomimetikum Salbutamol oder mit Ipratropiumbromid superfundiert und dabei die PD gemessen.

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Bei Untersuchungen an 18 CF-Patienten (16 bis 39 J.) wurde durch Messung der nasalen PD vor und 14 Tage nach Exposition mit einem azithromycinhaltigen Nasenspray eine Stimulation der Chloridsekretion angestrebt. Das Nasenspray wurde dabei 1x täglich jeweils in eine Nasenöffnung appliziert. Zusätzlich erfolgte an 15 CF-Patienten aus diesem Kollektiv ein PD-Vergleich von AZM-exponierter zu nicht exponierter Seite.

Bei insgesamt 23 CF-Patienten (6 bis 43 J.) wurde die Wirkung eines neuen Amilorid-Pulvers und dessen dosisabhängige Wirkdauer am respiratorischen Epithel geprüft.

Amilorid-Pulver wurde in Dosierungen zwischen drei und sechs Hüben (entsprechend 420 bzw. 840 µg) nasal appliziert. Mittels PD-Messung wurde nach Applikation des Amilorid-Pulvers zum einen der initiale Abfall der Potenzialdifferenz unter Amilorid, zum anderen der Zeitpunkt bestimmt, zu welchem die nasale PD nach Anwendung verschiedener Dosierungen des Amilorid-Pulvers wieder 50 % ihres Ausgangswertes erreicht hatte.

Bei drei CF-Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen (Alter: 7, 13 und 39 J.) wurde in vivo ein eventueller Effekt von Gentamicin untersucht. Dabei wurden sowohl die Absolutwerte der PD unter Superfusionsbedingungen vor und nach 14tägiger nasaler Applikation eines im Handel erhältlichen Gentamicin-Präparats als auch der jeweilige prozentuale PD-Abfall oder -Anstieg miteinander verglichen.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung zur Wirkung von Ipratropiumbromid auf die CFTR*-abhängige Chloridsekretion zeigte sich, dass es bei allen gesunden Probanden unter Ipratropiumbromid ähnlich wie unter Salbutamol zu einer lumenwärts gerichteten Chloridsekretion kam, die sich in einem hochsignifikanten Wiederanstieg der PD widerspiegelte ($\Delta PD 11,9 \pm 5,4$ mV bzw. $11,8 \pm 7,0$ mV; $p < 0,001$).

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Bei 11 Mukoviszidose-Patienten mit CFTR^{*}-Kanalddefekt hingegen blieb ein signifikanter Anstieg der nasalen PD sowohl unter Superfusion von Salbutamol als auch unter Superfusion von Ipratropiumbromid aus ($\Delta PD -1,1 \pm 4,0$ mV bzw. $-1,4 \pm 5,4$ mV).

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Azithromycin auf die Potenzialdifferenz zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied in den ermittelten PD-Basalwerten ($p = 0,20$) noch in den nach Superfusion ermittelten Werten (p zwischen 0,05 und 0,29).

Beim Vergleich von AZM-exponierter zu nicht exponierter Nasenseite konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der PD-Messung festgestellt werden.

Die Testung der Dosisabhängigkeit des Amiloridpulvers ergab folgende interessante Resultate: Bei Applikation von drei bis sechs Hüben des Amilorid-Pulvers war der initiale Abfall der PD gleich. Die Wirkdauer stieg aber mit Zunahme der applizierten Dosis. So war der Zeitpunkt der Rückkehr der transepithelialen Potenzialdifferenz auf ≥ 50 % des Ausgangswertes (ET_{50}) nach Anwendung von drei Hüben frühestens nach 30 min, bei sechs Hüben frühestens nach 45 min erreicht.

Bei den Falldarstellungen zum Effekt von Gentamicin an Patienten mit compound-heterozygoten Stoppmutationen zeigte sich bei zwei von drei Patienten eine signifikante Zunahme der PD nach Anwendung von Gentamicin.

Fazit

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ipratropiumbromid wie Salbutamol seine Wirkung an CFTR^{*}-abhängigen Chloridkanälen entfaltet.

Die Untersuchungsergebnisse zum Einfluss von Azithromycin gestatten die Schlussfolgerung, dass es zumindest nach lokaler Anwendung von Azithromycin nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Ionen-transportvorgänge am respiratorischen Epithel kommt. Auch der PD-Vergleich von AZM-exponierter zu nicht exponierter Nasenseite untermauert die Aussage, dass Azithromycin die Stimulierbarkeit der Chloridsekretion nicht signifikant beeinflusst.

Die Resultate der Evaluierung der optimalen Amiloriddosis sprechen dafür, dass Amiloridpulver seine Wirkung am respiratorischen Epithel umso länger entfaltet, je höher es dosiert wird. Insgesamt bietet sich Amilorid in Pulverform als eine einfache und Zeit sparende Alternative zur Amilorid-Inhalation über Vernebler an.

Erste orientierende Untersuchungen zum Effekt von Gentamicin waren ermutigend. Bei zwei von drei Patienten mit compoundheterozygoten Stoppmutationen erfüllten sich die Hoffnungen, dass die lokale Anwendung von Gentamicin zumindest eine partielle Wiederherstellung der CFTR*-Expression an der apikalen Zellmembran bewirken kann.

Mit der Anwendung von Ipratropiumbromid, Amiloridpulver und Gentamicin scheinen sich somit weitere Möglichkeiten der Mukoviszidose-Therapie zu ergeben. Die Verwendung von Azithromycin in der Therapie der CF entbehrt dagegen einer rationalen Grundlage.

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

6 SUMMARY

Background

The measurement of the nasal transepithelial potential difference (PD) served as an important tool in the diagnosis and research of cystic fibrosis.

Due to a genetic defect of the CFTR^{*}-chloride-channel, patients with cystic fibrosis have an abnormal epithelial ion transport. This includes a defective chloride secretion which thereby produces an accelerated rate of apical sodium transport into the cell. This causes a measurable PD increase.

Different substances used in cystic fibrosis therapy have yet to have an effect on the nasal transepithelial potential difference.

The purpose of this thesis is to examine the effect of different drugs on the ion channels by measuring and comparing the nasal PD. In this study, ipratropium bromide, azithromycin, amiloride, and gentamicin were examined.

Methods

In each case, the transepithelial potential difference was measured by superfusion.

To examine the effect of ipratropium bromide, 22 healthy subjects ranging from 16 to 47 years and 11 cystic fibrosis patients (13 to 39 years) were tested.

After blocking the apical sodium channels, the nasal PD was measured continuously while nasal mucosa was sequentially superfused with a chloride buffer, a chloride-free solution and with either salbutamol or ipratropium bromide in chloride-free buffer.

Measurements of the PD were also performed on 18 CF patients before and after 14 days exposure of an azithromycin nasal spray in one nostril.

In addition to this, in 15 patients the PD of exposed nostril was compared with the PD of the non exposed.

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

The effect of a new amiloride powder on the nasal epithelium was tested on 23 CF patients. Amiloride was applied in the nasal cavity in three to six spray dosages. The decreasing levels and half time of the potential difference were then measured.

Three cystic fibrosis patients with compound heterocytotic stop-mutations were tested on the effect of gentamicin. In this study, the potential difference was measured before and after 14 days of the exposure of gentamicin.

Results

In healthy subjects, ipratropium bromide increased the nasal PD during blockage of apical sodium channels (ΔPD $11,9 \pm 5,4$ mV rather $11,8 \pm 7,0$ mV; $p < 0,001$). This increasing trend in PD is also seen during superfusion of salbutamol.

There was no increase of nasal PD by salbutamol nor by ipratropium bromide in the 11 cystic fibrosis patients with a defect of the CFTR^{*}-channel (ΔPD $-1,1 \pm 4,0$ mV rather $-1,4 \pm 5,4$ mV).

The following study showed that there was neither a significant difference between the PD-basal rates ($p = 0,20$) nor between the rates measured after superfusion (p between 0,05 and 0,29) before and while under the influence of azithromycin.

Comparison of the exposed nostril with the non-exposed also did not show any difference.

Dosage testing of the amiloride powder showed the following results: Using three and six sprays of amiloride powder caused a significant decrease in potential difference. However, as the dosage increased, the period of effect also increased. This meant the amount of time it took for the PD to reach its half value was shorter at three sprays (30 min) than at a six spray (45 min) dosage.

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Two out of three patients with compound heterocytotic stop-mutations showed a significant increase during superfusion of salbutamol after application of gentamicin.

Conclusion

The effect of ipratropium bromide on nasal transepithelial potential difference during blockage of apical sodium channels suggests an additional specific effect of ipratropium bromide on CFTR^{*}-function. A similar effect is observed with salbutamol.

Local application of azithromycin seems to have no significant influence on ion transport at the respiratory epithelium.

The period of the effect of amiloride on nasal PD increases with increasing dosage. Altogether, amiloride powder is an easier and more time efficient option than the amiloride-inhalation with nebulizer.

The pilot study with gentamicin was encouraging: In two out of three patients the hope to rebuild at least partially the CFTR-expression on apical cell membrane in patients with compound heterocytotic stop-mutations by local application of gentamicin did prove true.

The application of either ipratropium bromide, amiloride powder, or gentamicin seems to point out of potential options in cystic fibrosis therapy. A causal therapy with azithromycin does not seem to have any rationale.

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

7 ANHANG

Tab. 7.1: Resultate der nasalen Potenzialdifferenz (PD) nach Superfusion (SF) der chloridhaltigen (Ami/KBR) und chloridfreien SF-Lösungen (OCl) sowie der chloridfreien SF-Lösung mit Salbutamol (Sal) bei 22 gesunden Probanden

Δ = Differenz

SF mit chloridhaltigen und chloridfreien SF-Lösungen sowie der chloridfreien SF-									
PD vor SF	PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR [%]	PD nach SF Ami/ OCl	Δ PD nach SF Ami/ OCl	Δ PD nach SF Ami/ OCL [%]	PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCl/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal [%]
-18	-5	-13	72,2	-17	12	92,3	-22	17	130,8
-18	-6	-12	66,7	-10	4	33,3	-12	6	50,0
-14	-5	-9	64,3	-8	3	33,3	-14	9	100,0
-16	-6	-10	62,5	-12	6	60,0	-15	9	90,0
-24	-7	-17	70,8	-9	2	11,8	-18	11	64,7
-20	-6	-14	70,0	-8	2	14,3	-17	11	78,6
-21	-6	-15	71,4	-11	5	33,3	-17	11	73,3
-23	-5	-18	78,3	-24	19	105,6	-29	24	133,3
-23	-4	-19	82,6	-6	2	10,5	-22	18	94,7
-14	-5	-9	64,3	-9	4	44,4	-15	10	111,1
-15	-4	-11	73,3	-5	1	9,1	-10	6	54,6
-22	-8	-14	63,6	-17	9	64,3	-21	13	92,9
-18	-7	-11	61,1	-14	7	63,6	-19	12	109,1
-13	-4	-9	69,2	-8	4	44,4	-12	8	88,9
-12	-3	-9	75,0	-11	8	88,9	-12	9	100,0
-17	-9	-8	47,1	-15	6	75,0	-20	11	137,5
-12	-4	-8	66,7	-8	4	50,0	-13	9	112,5
-32	-15	-17	53,1	-21	6	35,3	-28	13	76,5
-10	-4	-6	60,0	-8	4	66,7	-11	7	116,7
-14	-4	-10	71,4	-7	3	30,0	-9	5	50,0
-18	-4	-14	77,8	-16	12	85,7	-21	17	121,4
-27	-10	-17	63,0	-25	15	88,2	-35	25	147,1

Tab. 7.2: Resultate der nasalen Potenzialdifferenz (PD) nach Superfusion (SF) der chloridhaltigen (Ami/KBR) und chloridfreien SF-Lösungen (OCl) sowie der chloridfreien SF-Lösung mit Ipratropiumbromid (IB) bei 22 gesunden Probanden

Δ = Differenz

SF mit chloridhaltigen und chloridfreien SF-Lösungen sowie der chloridfreien SF-									
PD vor SF	PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR [%]	PD nach SF Ami/ OCl	Δ PD nach SF Ami/ OCl	Δ PD nach SF Ami/ OCL [%]	PD nach SF Ami/ OCL/ IB	Δ PD nach SF Ami/ OCl/ IB	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ IB [%]
-28	-5	-23	82,1	-16	11	47,8	-22	17	73,9
-15	-5	-10	66,7	-17	12	120,0	-16	11	110,0
-18	-7	-11	61,1	-13	6	54,6	-10	3	27,3
-24	-8	-16	66,7	-8	0	0,0	-18	10	62,5
-20	-10	-10	50,0	-25	15	150,0	-35	25	250,0
-18	-4	-14	77,8	-8	4	28,6	-13	9	64,3

-16	-2	-14	87,5	-6	4	28,6	-9	7	50,0
-24	-5	-19	79,2	-14	9	47,4	-15	10	52,6
-21	-7	-14	66,7	-14	7	50,0	-16	9	64,3
-14	-2	-12	85,7	-6	4	33,3	-8	6	50,0
-17	-3	-14	82,4	-15	12	85,7	-18	15	107,1
-18	-8	-10	55,6	-12	4	40,0	-18	10	100,0
-18	-5	-13	72,2	-8	3	23,1	-14	9	69,2
-15	-3	-12	80,0	-20	17	141,7	-27	24	200,0
-17	-5	-12	70,6	-24	19	158,3	-35	30	250,0
-24	-8	-16	66,7	-12	4	25,0	-18	10	62,5
-14	-3	-11	78,6	-7	4	36,4	-10	7	63,6
-24	-11	-13	54,2	-13	2	15,4	-15	4	30,8
-17	-4	-13	76,5	-10	6	46,2	-13	9	69,2
-14	-4	-10	71,4	-6	2	20,0	-9	5	50,0
-18	-4	-14	77,8	-9	5	35,7	-17	13	92,9
-19	-6	-13	68,4	-17	11	84,6	-23	17	130,8

Tab. 7.3: Resultate der Potenzialdifferenzmessung (PD) nach Superfusion der chloridhaltigen (KBR) und chloridfreien SF-Lösungen (OCI) sowie der chloridfreien SF-Lösung mit Salbutamol (Sal) vor und nach 14tägiger Applikation eines AZM-haltigen Nasensprays bei 18 CF-Patienten

Δ = Differenz

SF vor 14tägiger Applikation eines AZM-Nasensprays:										
Nr.	PD vor SF	PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR [%]	PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCL [%]	PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal [%]
1	-19	-7	-12	63,2	-8	1	8,3	-8	1	8,3
2	-40	-20	-20	50,0	-14	-6	-30,0	-11	-9	-45,0
3	-36	-4	-32	88,9	-7	3	9,4	-11	7	21,9
4	-26	-15	-11	42,3	-8	-7	-63,6	-10	-5	-45,5
5	-32	-17	-15	46,9	-15	-2	-13,3	-14	-3	-20,0
6	-24	-12	-12	50,0	-18	6	50,0	-13	1	8,3
7	-38	-8	-30	79,0	-13	5	16,7	-10	2	6,7
8	-16	-3	-13	81,3	-21	18	138,5	-17	14	107,7
9	-32	-12	-20	62,5	-9	-3	-15,0	-8	-4	-20,0
10	-54	-8	-46	85,2	-8	0	0,0	-4	-4	-8,7
11	-38	-17	-21	55,3	-21	4	19,1	-19	2	9,5
12	-46	-28	-18	39,1	-27	-1	-5,6	-23	-5	-27,8
13	-56	-15	-41	73,2	-22	7	17,1	-18	3	7,3
14	-43	-16	-27	62,8	-18	2	7,4	-20	4	14,8
15	-32	-16	-16	50,0	-5	-11	-68,8	-8	-8	-50,0
16	-44	-15	-29	65,9	-28	13	44,8	-24	9	31,0
17	-33	-9	-24	72,7	-10	1	4,2	-8	-1	-4,2
18	-35	-16	-19	54,3	-30	14	73,7	-28	12	63,2
SF nach 14tägiger Applikation eines AZM-Nasensprays:										
Nr.	PD vor SF	PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR [%]	PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCL [%]	PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal [%]
1	-35	-21	-14	40,0	-23	2	14,3	-25	4	28,6
2	-32	-17	-15	46,9	-19	2	13,3	-19	2	13,3
3	-38	-12	-26	68,4	-15	3	11,5	-18	6	23,1
4	-34	-12	-22	64,7	-13	1	4,6	-14	2	9,1

10	-50	-8	-42	84,0	-15	7	16,7	-15	7	16,7
11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12	-30	-15	-15	50,0	-7	-8	-53,3	-6	-9	-60,0
13	-23	-7	-16	69,6	-5	-2	-12,5	-4	-3	-18,75
14	-23	-9	-14	60,9	-8	-1	-7,1	-5	-4	-28,6
15	-46	-24	-22	47,8	-34	10	45,5	-32	8	36,4

Tab. 7.5: Resultate der Potenzialdifferenzmessung (PD) nach Superfusion der chloridhaltigen (KBR) und chloridfreien SF-Lösungen (OCI) sowie der chloridfreien SF-Lösung mit Salbutamol (Sal) nach 14tägiger Applikation eines AZM-haltigen Nasensprays bei CF-Patienten auf exponierter und nicht exponierter Seite (n=15)

Δ = Differenz

SF nach 14tägiger Applikation eines AZM-Nasensprays (exponierte Seite):										
Nr.	PD vor SF	PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR [%]	PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCL [%]	PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal [%]
1	-35	-21	-14	40,0	-23	2	14,3	-25	4	28,6
2	-32	-17	-15	46,9	-19	2	13,3	-19	2	13,3
3	-38	-12	-26	68,4	-15	3	11,5	-18	6	23,1
4	-34	-12	-22	64,7	-13	1	4,6	-14	2	9,1
5	-28	-11	-17	60,7	-11	0	0,0	-12	1	5,9
6	-40	-6	-34	85,0	-5	-1	-2,9	-2	-4	-11,8
7	-28	-13	-15	53,6	-15	2	13,3	-9	-4	-26,7
8	-20	-5	-15	75,0	-3	-2	-13,3	0	-5	-33,3
9	-32	-16	-16	50,0	-13	-3	-18,8	-14	-2	-12,5
10	-60	-25	-35	58,3	-20	-5	-14,3	-23	-2	-5,7
11	-33	-12	-21	63,6	-13	1	4,8	-16	4	19,2
12	-35	-17	-18	51,4	-23	6	33,3	-14	-3	-16,7
13	-33	-14	-19	57,6	-17	3	15,8	-13	-1	-5,3
14	-27	-7	-20	74,1	-4	-3	-15,0	-3	-4	-20,0
15	-42	-20	-22	52,4	-35	15	68,2	-41	21	95,5
SF nach 14tägiger Applikation eines AZM-Nasensprays (nicht-exponierte Gegenseite):										
Nr.	PD vor SF	PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR	Δ PD nach SF Ami/ KBR [%]	PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCI	Δ PD nach SF Ami/ OCL [%]	PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal	Δ PD nach SF Ami/ OCL/ Sal [%]
1	-24	-12	-12	50,0	-11	-1	-8,3	-11	-1	-8,3
2	-39	-20	-19	48,7	-27	7	36,8	-24	4	21,1
3	-30	-7	-23	76,7	-4	-3	-13,0	-6	-1	-4,4
4	-22	-11	-11	50,0	-8	-3	-27,3	-8	-3	-27,3
5	-20	-8	-12	60,0	-6	-2	-16,7	-4	-4	-33,3
6	-25	-5	-20	80,0	-4	-1	-5,0	-4	-1	-5,0
7	-37	-13	-24	64,9	-12	-1	-4,2	-12	-1	-4,2
8	-20	-4	-16	80,0	-3	-1	-6,3	0	-4	-25,0
9	-42	-17	-25	59,5	-26	9	36,0	-20	3	12,0
10	-34	-23	-11	32,4	-38	15	136,4	-32	9	81,8
11	-12	-1	-11	91,7	1	-2	-18,2	3	-4	-36,4
12	-24	-5	-19	79,2	-6	1	5,3	-10	5	26,3
13	-22	-7	-15	68,2	-7	0	0,0	-8	1	6,7
14	-26	-14	-12	46,2	-12	-2	-16,7	-10	-4	-33,3
15	-21	-4	-17	81,0	-20	16	94,1	-22	18	105,9

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Altschüler EL: Azithromycin, the multidrug-resistant protein, and cystic fibrosis. *Lancet* 351: 1286 (1998)
- [2] Amsden G: Pharmacokinetics and tissue targeting of azithromycin. Cambridge Medical Publications (2002)
- [3] Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ: Demonstration that CFTR is a chlorid channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253: 202-205 (1991)
- [4] Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ: Generation of camp-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251: 679-682 (1991)
- [5] Anderson MP, Welsh MJ: 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)
- [6] App EM, 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)
- [7] Bangel N, Dahlhoff C, Sobczak K, Weber WM, Kusche-Vihrog K: Upregulated expression of ENaC in human CF nasal epithelium. *J Cyst Fibros* 7: 197-205 (2008)
- [8] Bangel N, Rudack C, Weber WM, Kusche K: Different expression levels of ENaC from human nasal epithelium in CF and non-CF tissue. *Acta Physiologica Congress* 12914 (2006), abstract
- [9] Bargon J, Dittrich-Weber H: Lungentransplantation. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): *Mukoviszidose - Zystische Fibrose*. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart - New York, 2004, p 95-99

- [10] Bauer R, Kuhn FJ, Stockhaus K, Wick H: Allgemeine Pharmakologie und sekretionshemmende Wirkung von (8r)-3alpha-Hydroxy-8-isopropyl-1alphaH,5alphaH-tropaniumbromid-(±)-tropat (Ipratropiumbromid). *Arzneimittel-Forschung* 26: 974-980 (1976)
- [11] Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR: Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68: 809-818 (1992)
- [12] Bedwell DM, Kaenjak A, Benos D, Bebök Z, Bubián JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP, Sorscher EJ: Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nature Med* 3: 1280-1284 (1997)
- [13] Benedetto GD, Lopez-Vidriero MT, Carratu L, Clarke SW: Effect of amiloride on human bronchial ciliary activity in vitro. *Respiration* 57: 37-39 (1990)
- [14] Bergmann W: Die kindgerechte Durchführung der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung. Inaug. Diss. Gießen, 2008
- [15] Blank U, Rückes C, Clauss W, Hofmann T, Lindemann H, Münker G, Weber WM: 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)
- [16] Bleichert A: Zur Frage der Nebenwirkungen anticholinergischer Drogen in Abhängigkeit von der Applikationsart: Inhalation versus intravenöse Injektion von Ipratropiumbromid. *Arzneimittelforschung* 26: 1010-1013 (1976)
- [17] Boucher RC, Bromberg PA, Gatzky JT: Airway transepithelial electric potential in vivo: species and regional differences. *J Appl Physiol* 48: 169-176 (1980)

- [18] Boucher RC, Cotton CU, Gatzky JT, Knowles MR, Yankaskas JR: Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J Physiol* 405: 77-103 (1988)
- [19] Bronsveld I, Bijman J, Mekus F, Ballmann M, Veeze HJ, Tümmler B: Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 54: 278-281 (1999)
- [20] Bultmann C: Zur Wirksamkeit von Bronchodilatoren bei der Therapie der obstruktiven Bronchitis im frühen Kindesalter. Inaug. Diss. Gießen, 2003
- [21] Burrows E, Southern KW, Noone P: Sodium channel blockers for cystic fibrosis. Issue 3. Art. No.: CD005087. DOI: 0.1002/14651858.CD005087.pub2, Cochrane Database of Systematic Reviews (2006)
- [22] Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE: Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66: 1027-1036 (1992)
- [23] Chernick WS, Barbero GJ: Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics* 24: 739-745 (1959)
- [24] Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM: Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1683-1692 (2001)
- [25] Cohn RC, Rudzienski L, Putnam RW: In vitro antimicrobial activity of amiloride analogs against *Pseudomonas*. *Chemotherapy* 38: 232-237 (1992)
- [26] Cropp GJ: Effectiveness of bronchodilators in cystic fibrosis. *Am J Med* 100: 19-29 (1996)

- [27] Davies J, Goorini L, Davis BD: Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol* 1: 93-106 (1965)
- [28] Di Saint` Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12: 549-563 (1953)
- [29] Di Saint` Agnese PA: Cystic fibrosis (mukoviscidosis). *Am Fam Physician* 7: 102-111 (1973)
- [30] Drumm ML: Modifier genes and variation in cystic fibrosis. *Respir. Res.* 2: 125-128 (2001)
- [31] Estler CJ: *Pharmakologie und Toxikologie*. 5. Auflage, Schattauer, Stuttgart - New York (2000)
- [32] Everard ML, Devadason SG, Sunderland VB, Le Souef PN: An alternative aerosol delivery system for amiloride. *Thorax* 50: 517-519 (1995)
- [33] Frasca JM, Auerbach O, Parks VR, Jamieson JD: Electron microscopic observations of bronchial epithelium in dogs. *Exp Mol Pathol* 9: 363-370 (1968)
- [34] Frömter E: Die Ionentransportstörung bei der Mukoviszidose. Aktueller Wissensstand. *Pneumologie* 44: 1144-1146 (1990)
- [35] Gallati S: Molekularbiologische Methoden für den Mutationsnachweis. In: Reinhardt D, Götz M, Kraemer M, Schöni MH (Hrsg). *Cystische Fibrose*. Springer, Berlin, 2003, p 214-215
- [36] Gibson LE, Cooke RE: A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by electrophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549 (1959)
- [37] Gowen CW, Lawson EE, Gingras-Leatherman J, Gatzky JT, Boucher RC, Knowles MR: Increased nasal potential difference and amiloride

- sensitivity in neonates with cystic fibrosis. *J Pediatr* 108: 517-521 (1986)
- [38] Griese M, Hüls G, Lindemann H: Atemwege und Lunge. In Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): Mukoviszidose – Zystische Fibrose, 4. Aufl., Thieme Stuttgart - New York, 2004, p 35-94
- [39] Griese M: Compliance bei inhalativer Therapie im Kindes- und Jugendalter. Möglichkeiten der Kontrolle und Verbesserung. *Monatsschr Kinderheilkd* 148, 707-712 (2000)
- [40] Hamosh A, Corey M: The cystic fibrosis genotype-phenotype consortium: correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 329: 1308-1313 (1993)
- [41] Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, Montrose-Rafizadeh C, Rosenstein BJ, Crystal RG, Cutting GR: Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316 in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 88: 1880-1885 (1991)
- [42] Harris A: Cystic fibrosis gene. *Brit Med Bullet* 48: 738-753 (1992)
- [43] Hirsh AJ, Molino BF, Zhang J, Astakhova N, Geiss WB, Sargent BJ, Swenson BD, Usyatinsky A, Wyle MJ, Boucher RC, Smith RT, Zamurs A, Johnson MR: 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)
- [44] Ho LP, Samways JM, Porteous DJ, Dorin JR, Carothers A, Greening AP, Innes JA: Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 10 : 2018-2022 (1997)
- [45] Hofmann T, Gibson J, Noone PG, Foy CE, Gipson C, Robinson JM, Boucher RC, Knowles MR: Nasal epithelial CFTR-mediated chloride

conductance in patients with mild as compared with severe CFTR mutations. 12. North American CF-Conference montreal (1998), abstract

- [46] Hofmann T, Senier I, Bittner P, Hüls G, Schwandt HJ, Lindemann H: Aerosolized amiloride: Dose-effect on nasal bioelectric properties, pharmacokinetics and effect on sputum expectoration in patients with cystic fibrosis. *J Aerosol Med* 10: 147-158 (1997)
- [47] 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. *Eu. Resp J* 9, Suppl. 23, 175s (1996), abstract
- [48] Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, Tamura M, Chijimatsu Y, Kira S, Izumi T: Diffuse panbronchiolitis: a disease of the transitional zone of the lung. *Chest* 83: 63-69 (1983)
- [49] Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM: Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nature Med* 2: 467-469 (1996)
- [50] Hyams DE: Amiloride: a review. *Royal society of medicine, International congress and symposium series* 44: 65-73 (1981)
- [51] Ichimiya T, Takeoka K, Hiramatsu K, Hirai K, Yamasaki T, Nasu M: The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Chemotherapy* 42: 186-191 (1996)
- [52] Jaffe A, Bush A: Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. *Pediatr Pulmonol* 31: 464-473 (2001)
- [53] Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080 (1989)

- [54] Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Elfring GL, Northcutt VJ, Miller LL, Kerem BS, Wilschanski M: Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 372: 719-727 (2008)
- [55] Kleyman TR, Cragoe EJ: Amiloride and its analogs as tools in the study of the ion transport. *J Membrane Biol* 105: 1-21 (1988)
- [56] Knowles MR, Buntin WH, Bromberg P, Gatzky JT, Boucher RC: Measurement of transepithelial potential difference in the trachea and bronchi of human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis* 126: 108-112 (1982)
- [57] Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatzky JT, Boucher RC : Bioelectric properties and ion transport in excised human bronchi. *Physiologist* 23: 100 (1980)
- [58] Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatzky JT, Boucher RC: Measurement of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis* 124: 484-490 (1981)
- [59] Knowles MR, Church NL, Waltner WE, Yankaskas JR, Gilligan P, King M, Edwards L, Helms RW, Boucher RC: A pilot study of aerosolised amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 322: 1189-1194 (1990)
- [60] Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC: Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305: 1489-1495 (1981)
- [61] Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC: Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71: 1410-1417 (1983)

- [62] Knowles MR, Robinson JM, Wood RE: Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared to normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* 100: 2588-2595 (1997)
- [63] Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC: Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221: 1067-1069 (1983)
- [64] Knowlton RG, Cohen-Haguenaer O, Van Cong N, Frezal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M, Donis-Keller H: A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318: 380-382 (1985)
- [65] 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)
- [66] Konstan MW, Berger M: Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 24: 137-142 (1997)
- [67] Krahl A, Geidel C, Alter H, Hofmann T, Bittner-Dersch P, Hüls G, Pabst J, Lindemann H: Effective amiloride administration to CF-patients by powder inhalation. Poster, 12th North American CF-Conference, Montreal, Canada (1998)
- [68] Lassen UV, Rasmissen BE: Use of microelectrodes for measurement of membrane potentials. in: Giebisch G (Hrsg): *Membrane transport in biology*, Berlin, 1978, p 169-203
- [69] Lindemann H, Becker T, Bittner P, Boldt A, Hofmann T, Schwandt HJ : Sekretelimination bei CF-Patienten unter Amiloridinalation. *Pneumologie* 44: 1148-1150 (1990)
- [70] Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): *Mukoviszidose - Zystische Fibrose*. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart - New York, 2004

- [71] Lindemann H, Wunderlich P: Atemwege und Lunge. in: Dockter G, Lindemann H, Wunderlich P, Dittrich-Weber H (Hrsg): Mukoviszidose. Thieme, Stuttgart - New York, 1994, p 21-48
- [72] Lindemann H: Mukoviszidose. in: Enzyklopädie Naturwissenschaft und Technik, 2. Auflage, ecomed, Landsberg/Lech (2001)
- [73] Lindemann H: Pulmonaler Verlauf der Mukoviszidose beim Kind. Atemw-Lungenkrkh 19: 503-509 (1993)
- [74] Loddenkemper R : Ipratropiumbromid, ein anticholinergischer Bronchodilatator: Verhalten des Atemwegwiderstandes nach Inhalation verschiedener Dosierungen bei Patienten mit reversibler Atemwegobstruktion. Arzneimittel-Forschung 26: 1017-1020 (1976)
- [75] Mall M, Bleich M, Schürlein M, Kühr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K: Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivating by cAMP. Am J Physiol 275: 1274-1281 (1998)
- [76] Martin R, Mogg AE, Heywood LA, Nitschke L, Burke JF: Aminoglycoside suppression at AUG, UAA, and UGA codons in E. coli and human tissue culture cells. Mol Gen Genet 217: 411-418 (1989)
- [77] Middleton PG, Geddes DM, Alton EFWF: Effect of amiloride and saline on nasal mucociliary clearance and potential difference in cystic fibrosis and normal subjects. Thorax 48: 812-816 (1993)
- [78] Middleton PG, Geddes DM, Alton EFWF: Protocols for in vivo measurements of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. Eur Respir J 7: 2050-2056 (1994)
- [79] Mylett J, Johnson L, Knowles M: Alternate therapies for cystic fibrosis. Sem Respir Crit Care Med 15: 426-433 (1994)
- [80] Nagai H, Shishido H, Yoneda R, Yamaguchi E, Tamura A, Kurashima A: Long-term low-dose administration of erythromycin to patients with diffuse panbronchiolitis. Respiration 58: 145-149 (1991)

- [81] Newman SP, Malik S, Hirst PB, Pitcalm GR, Fleischer W, Schulze B, Heide A, Dinkelager A, Pabst J: Scintigraphic evaluation on lung deposition of salbutamol delivered by the MAGhaler dry powder device at fast and slow rates of inhalation. (in preparation)
- [82] Noone PG, Olivier KN, Knowles MR: Modulation of the ionic milieu of the airway in health and disease. *Annu Rev Med* 45: 421-434 (1994)
- [83] Pilewski JM, Frizzell RA: Role of CFTR in airways disease. *Physiol Rev* 79: 215-255 (1999)
- [84] Potter JL, Matthews LW, Spector S, Lemm J: Studies on pulmonary secretions: II. Osmolality and ionic environment of pulmonary secretion from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and laryngectomy. *Am Rev Respir Dis* 96: 83-87 (1967)
- [85] Pradal U, Delmarco A, Morganti M, Cipolli M, Mini M, Cazzola G: Azithromycin induces overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) and restores chloride conductance in cystic fibrosis. Poster, 25th European Cystic Fibrosis Conference, Genua, Italy (2002)
- [86] Reddy MM, Quinton PM: Cl⁻-permeability of sweat duct cell membranes: intracellular microelectrode analysis. *Prog Clin Biol Res* 254: 45-57 (1987)
- [87] Regnis JA, Robinson M, Bailey DL, Cook P, Hooper P, Chan H-K, Gonda I, Bautovich G, Bye PTP: Mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis and in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 66-71 (1994)
- [88] Riedler J: Inhalative Bronchodilatoren im Säuglingsalter - Vergleichsstudie zwischen Salbutamol und Ipratropiumbromid. *Pneumologie* 44: 777-780 (1990)
- [89] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL: Identification of the cystic

fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA. Science 245: 1066-1073 (1989)

- [90] Rodgers HC, Knox AJ: The effect of topical benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis. Eur Respir J 14:693–696 (1999).
- [91] Rommens JM, Ianuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidake N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 245: 1059-1065 (1989)
- [92] Rosenstein BJ, Langbaum M: Diagnosis. in: Taussing LM: Cystic fibrosis. Thieme-Stratton Inc., Stuttgart - New York: 85-114 (1984)
- [93] Rosenstein BJ, Zeitlin PL: Recent advances in cystic fibrosis. Cur Op Pediat 3: 392-398 (1991)
- [94] Rymsa B: Der MAGhaler – ein neuartiger treibgasfreier Inhalatortyp. Atemw – Lungenkrkh 24: 37-41 (1998)
- [95] Sanchez I, De-Koster J, Holbrow J, Chernick V: The effect of high doses of inhaled salbutamol and ipratropium bromide in patients with stable cystic fibrosis. Chest 104: 842-846 (1993)
- [96] Sauder RA, Chesrown SE, Loughlin GM: Clinical application of transepithelial potential differences measurements in cystic fibrosis. J Pediatr 111: 353-358 (1987)
- [97] Schüler D, Moerkerk W, Weber K, Alter H, Geidel C, Hüls G, Lindemann H: Salbutamol: eine Alternative zu Isoproterenol bei der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenzmessung mittels Superfusion. Pneumologie 5: 46 (2000), abstract

- [98] Schüler D, Weber K, Moerkerk W, Wagner J, Hüls G, Lindemann H: Vergleich von rektaler und nasaler Potenzialdifferenzmessung in vivo. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 149: 194 (2001), abstract
- [99] Singh A, Ursic D, Davies J: Phenotypic suppression and misreading in *Saccaromyces cerevisiae*. *Nature* 277: 146-148 (1979)
- [100] Smith JJ, Karp PH, Welsh MJ: Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Inv* 93: 1307-1311 (1994)
- [101] Sobczak K: Vergleichende funktionale Analyse epithelialer Natriumtransporte und deren Rolle bei der menschlichen Erbkrankheit Mukoviszidose. Inaug. Diss. Münster, 2008
- [102] Tai S, Sudo E, Sun F, King M, App EM, Sextro W, von der Hardt H, Baumann U: Effect of azithromycin treatment on sputum rheology in cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonol* 19: 264 (1999)
- [103] Tamaoki J, Chiyotani A, Tagaya E, Takemura H, Konno K: Cholinergic control of rabbit tracheal transepithelial potential difference in vivo. *Eur Respir J* 9: 1632-1636 (1996)
- [104] Tsui LC: Mutations and sequence variations detected in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: a report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1: 97-203 (1992)
- [105] Ünal-Maelger ÖH, Urbanek R: Stellenwert der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD) am respiratorischen Epithel in der Mukoviszidose-Diagnostik. *Monatsschr Kinderheilkd* 136: 76-80 (1988)
- [106] Ussing HH, 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)

- [107] Veeze HJ, Halley DJ, Bijman J, De Jongste JC, De Jonge HR, Sinaasappel M: Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 93: 461-466 (1994)
- [108] Veeze HJ, Sinaasappel M, Bijman J, Bouquet J, De Jonge HR: Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 101: 398-403 (1991)
- [109] Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law H, Faval M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R: Localisation of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 318: 384-385 (1985)
- [110] 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)
- [111] Welsh MJ, Tsui L, Boat TF, Beaudet AL: Cystic fibrosis. in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS (Hrsg): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, 1995, p 3799-3876
- [112] Welsh MJ: Abnormal chloride and sodium channel function in cystic fibrosis airway epithelia. *The lung*: Raven Press, Ltd., New York, 1991: p 2073-2081
- [113] Willumsen NJ, Davis CW, Boucher RC: Cellular Cl⁻-transport in cultured cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Physiol* 256: 1045-1053 (1989)
- [114] 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)
- [115] Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebök Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E:

- Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 349: 1433-1441 (2003)
- [116] Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Kawada H, Yokota T: Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1749-1755 (1993)
- [117] Ziebach R, Pietsch-Breitfeld B, Bichler M, Busch A, Riethmüller J, Stern M: Bronchodilatory effects of salbutamol, ipratropium bromide, and their combination: double blind, placebo-controlled crossover study in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 31: 432-435 (2001)
- [118] Zielenski J: Genotype and phenotyp in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 117-133 (2000)
- [119] Ziersch A: Optimierung der Mukoviszidose-Diagnostik und Überprüfung neuer Therapie-Ansätze auf der Basis der nasalen Potenzialdifferenz-Messung. Inaug. Diss. Gießen, 1994
- [120] Zhou Z, Treis D, Schubert SC, Harm M, Schatterny J, Hirtz S, Duerr J, Boucher RC, Mall MA: Preventive but not late amiloride therapy reduces morbidity and mortality of lung disease in betaENaC-overexpressing mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1245-1256 (2008)
- [121] <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
- [122] http://media.pfizer.com/files/products/uspi_zithromax.pdf

Erklärung

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

Freudenberg 2010

Juliane Hoeser

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Hermann Lindemann für die Überlassung der Fragestellung und die umfassende und gute Betreuung mit wertvollen Ratschlägen und Anregungen während der gesamten Zeit der Fertigstellung.

Mein besonderer Dank gilt den Mukoviszidosepatienten und den vielen freiwilligen Probanden, die das Entstehen dieser Arbeit durch ihre Mitarbeit erst möglich gemacht haben.

Weiterhin danke ich herzlich dem kompletten Team der Lungenfunktionsabteilung des Zentrums für Kinderheilkunde Gießen mit meinem Betreuer Dr. med. Daniel Schüler für die Unterstützung und Motivation bei der Durchführung der Messungen.

Meinen Mit-Doktoranden Wiebke Bergmann, Katrin Weber und Christoph Barth danke ich vor allem dafür, dass mir durch die freundschaftliche Zusammenarbeit mit ihnen der praktische Teil der Arbeit so viel Freude machen konnte.

Außerdem danke ich Doris Küppersbusch für die Motivation Medizin zu studieren und für die Durchsicht der Arbeit sowie April Bowen für die Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich unter anderem für ihre Liebe und die bestmögliche Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Meinem lieben Mann Christian danke ich für seine Liebe, seine Geduld und Nachsicht mit mir, Rat und Tat in allen Lebenslagen und die mir gegebene Ruhe und Sicherheit bei der Erstellung dieser Arbeit.