

***Die Kindgerechte Durchführung der transepithelialen
Potenzialdifferenzmessung***

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

Vorgelegt von Wiebke Bergmann, geb. Moerkerk aus Bünde

Bünde 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Leiter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Lindemann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger

Tag der Disputation: 21.10.2008

Gewidmet meinem Mann Jens, meinen Eltern und den Mukoviszidose-Patienten, in
Gedenken an Tanja

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

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	EPIDEMIOLOGIE UND GENETIK	1
1.2	PATHOPHYSIOLOGIE DER IONENTRANSPORTSTÖRUNG AM RESPIRATORISCHEN EPITHEL BEI DER CYSTISCHEN FIBROSE	3
	Chloridtransport	3
	Natriumioneneinstrom	4
1.3	SYMPTOMATIK	5
1.4	THERAPIE UND PROGNOSE	5
1.5	DIAGNOSTIK EINSCHL. TRANSEPIHELIALER POTENZIALDIFFERENZ (PD)	6
1.6	TRANSEPIHELIALE POTENZIALDIFFERENZ (PD)	7
1.7	ZIELSETZUNG	9
2	METHODIK	10
2.1	PRINZIPIELLES VORGEHEN BEI DER MESSUNG DER TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZ	10
2.2	BLOCKADE DES NATRIUMEINSTROMS DURCH AMILORID	10
2.3	AKTIVIERUNG DER CHLORIDSEKRETION ÜBER ALTERNATIVE CHLORIDKANÄLE	11
2.4	Chloridsekretion über CFTR-abhängige Kanäle	12
2.5	MATERIAL-UND GERÄTEBESCHREIBUNG ZUR TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	12
2.6	HERSTELLUNG DER AGARGELBRÜCKEN	13
2.7	VERSUCHSAUFBAU ZUR MESSUNG DER TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	13
2.8	DER MESSVORGANG BEI DER NASALEN TRANSEPIHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	15
2.9	POTENZIALDIFFERENZ-MESSUNG AN DER REKTALEN SCHLEIMHAUT	17
2.10	ZUSAMMENSETZUNG BEI DER SUPERFUSION VERWENDETER LÖSUNGEN	19
2.11	PROBANDEN -UND PATIENTENKOLLEKTIVE	21
2.11.1	NASALE PD-MESSUNG	22
2.11.2	REKTALE PD-MESSUNG	22
2.12	STATISTISCHE METHODEN	23

3	ERGEBNISSE	24
3.1	INTRAINDIVIDUELLE VARIABILITÄT DER BASALEN POTENZIALDIFFERENZWERTE VOR DER SUPERFUSION.....	24
3.1.1	BASALE POTENZIALDIFFERENZWERTE BEI GESUNDEN PROBANDEN.....	27
3.1.2	VERGLEICH DER INTRAINDIVIDUELLEN BASALWERTE DER PD BEI CF-PATIENTEN	26
3.2	SUPERFUSION VON AMILORID	29
3.3	SUPERFUSIONSMESSUNGEN MIT CHLORIDFREIEM PUFFER.....	31
3.4	STIMULATION CFTR-ABHÄNGIGER KANÄLE	33
3.5	SUPERFUSIONSMESSUNGEN MIT KONVENTIONELLER UND VERKÜRZTER METHODE	35
3.5.1	AUSGANGSWERTE DER PD UND PD-NIVEAU NACH SUPERFUSION VON AMILORID	35
3.5.2	SUPERFUSION VON BETA-ADRENERGIKA.....	36
3.6	POTENZIALDIFFERENZMESSUNG AN DER REKTALEN SCHLEIMHAUT	42
3.6.1	BASALWERTE AN DER REKTUMSCHLEIMHAUT	42
3.6.2	APPLIKATION VON AMILORID AN DER REKTALSCHLEIMHAUT.....	44
3.6.3	REKTALE PD-MESSUNG UNTER SUPERFUSION VON SALBUTAMOL	45
4	DISKUSSION	49
4.1	ALLGEMEINE INFORMATIONEN ZUR TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	49
4.2	REPRODUZIERBARKEIT DER BASISWERTE DER TRANSEPITHELIALEN POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	49
4.3	EINFLUSS VON AMILORID IN CHLORIDHALTIGEM PUFFER AUF DIE TRANSEPITHELIALE POTENZIALDIFFERENZMESSUNG	50
4.4	STELLENWERT DES ZUSATZES CHLORIDFREIER PUFFERLÖSUNG (NATRIUM-GLUKONAT).....	51
4.5	STIMULATION DER CFTR-ABHÄNGIGEN CHLORIDKANÄLE MIT ISOPROTERENOL UND .. SALBUTAMOL	52
4.6	PD-MESSUNG AN DER REKTUMSCHLEIMHAUT	54
4.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	56

5	ZUSAMMENFASSUNG	58
	SUMMARY.....	61
6	LITERATURVERZEICHNIS	63
7	ANHANG	72
7.1	TABELLEN	72
7.2	LEBENSLAUF	79
7.3	DANKSAGUNG	80

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Genetik

Die Mukoviszidose, auch Zystische Fibrose (CF) genannt, ist mit einer Prävalenz von 1:3000 die häufigste hereditäre Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung in Mitteleuropa und den USA mit ernster Prognose [2, 7]. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt. Man schätzt die Anzahl der heterozygoten Merkmalsträger, die keine Symptome aufweisen, auf ca. 5 % [121].

1985 entdeckte Tsui den Gendefekt der Mukoviszidose auf dem langen Arm des Chromosoms 7 [117].

Heute weiß man, dass das CF-Gen für das Protein "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR) kodiert, das aus 1480 Aminosäuren besteht [60,98]. Bei der Mukoviszidose kommt es zur Mutation des CFTR-Proteins und zum Funktionsverlust des transepithelialen Ionentransports [39, 115].

Inzwischen sind über 1500 Mutationen bekannt. Je nach Gendefekt kommt es an verschiedenen Positionen zu Störungen der Proteinsynthese. Deshalb teilt man die CF-Mutationen inzwischen in 6 Defektklassen ein (Abb.1.1) [77, 132, 133].

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.

Je nach Mutationsklasse kommt es zu unterschiedlich schweren Verlaufsformen der Mukoviszidose. Am Beispiel der Mutation $\Delta F508$, die mit sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen einhergeht, ist jedoch gut nachzuvollziehen, dass es neben der CFTR-Mutation wichtige andere Faktoren gibt, die sich auf den Schweregrad der Krankheit auswirken: Es handelt sich vor allem um zusätzliche genetische Einflüsse [37], das soziale Umfeld und die Qualität der Betreuung in einer CF-Ambulanz [77].

1.2 Pathophysiologie der Ionentransportstörung am respiratorischen Epithel bei der Cystischen Fibrose

Chloridtransport

Das CFTR-Protein reguliert in der Zellmembran des respiratorischen und intestinalen Epithels vorrangig den Chloridtransport zwischen dem Zellinneren und Zelläußeren. Bei dem mutierten Protein der CF-Patienten ist dieser Transport gestört, basierend auf einer Störung der intrazellulären Kanalaktivierung [125, 126]. Dabei sind allerdings nicht alle Chloridkanäle betroffen, sondern nur solche, die CFTR-abhängig sind und über eine Phosphorylierung der c-AMP Moleküle gesteuert werden (Abb. 1.2).

Dagegen ist die Funktion „alternativer“ Chloridkanäle, die über einen Anstieg des intrazellulären Kalziumgehaltes aktiviert werden, bei CF-Patienten unbeeinträchtigt. Dies reicht jedoch nicht für eine Kompensation der CFTR-abhängigen Chloridtransportstörung aus [5, 6]. Als Wirkungsmechanismus vermutet man, dass über einen kalziumabhängigen basolateralen Kaliumkanal eine Hyperpolarisation entsteht, die die treibende Kraft für die Chloridsekretion darstellt [126]. Auch die Aktivierung der apikalen Chloridsekretion über die Stimulation purinerger Rezeptoren (P2Y₂) ist möglich [26, 65], bringt jedoch für die klinische Diagnostik keine Vorteile.

Ferner werden parazelluläre Transportvorgänge diskutiert. Sie sind zum Teil strittig. Da sie vorerst weder in der Diagnostik noch in der Therapie eine Rolle spielen [62, 64], soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

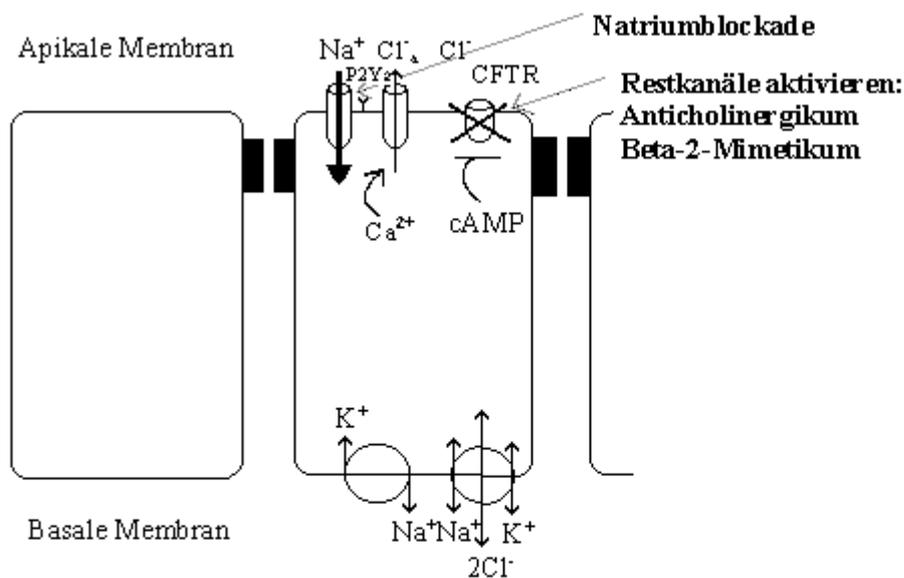


Abb. 1.2 Darstellung der transepithelialen Ionentransportstörung bei CF und der pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten im Rahmen der klinischen Diagnostik. Weitere Erläuterungen im Text.

Natriumioneneinstrom

Folge der gestörten transepithelialen Chloridsekretion an der luminalen Membran und des daraus resultierenden elektrochemischen Gradienten ist eine exzessiv gesteigerte Absorption von Natrium und Wasser [16, 61, 63, 64].

An der basolateralen Seite der Mukosazelle findet ein Ionentransport in das Interstitium statt. Dieser Prozess erfordert Energie, ist also ein aktiver Vorgang, der mit Hilfe der Na^+ - K^+ -ATPase-Pumpe stattfindet [61, 62].

Kürzlich präsentierte Ergebnisse zeigen auch Unterschiede der epithelialen Natriumkanäle im Hinblick auf mRNA- und Proteinsynthese [11, 12]. Danach ist die Natrium-Hyperabsorption nicht allein durch den elektrochemischen Gradienten zu erklären, sondern auch durch die Generierung zusätzlicher Natriumkanäle.

Letztlich ist der Wassergehalt im Bronchiallumen dem Salzgehalt, v.a. dem Natriumgehalt proportional [16]. Als Folge der beschriebenen exzessiv gesteigerten Natriumionen-Absorption kommt es somit zu einem transepithelialen Flüssigkeitstransport [18, 20, 39, 55]. Der Wasserverlust bedingt eine Viskositäts-

zunahme des Bronchialsekretes und eine Reduktion der mukoziliären Clearance [25, 56, 64, 91, 114] mit den nachfolgend skizzierten phänotypischen Veränderungen.

1.3 Symptomatik

Die beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen manifestieren sich in einer Sekretretention mit schwer wiegenden klinischen Auswirkungen v.a. an Lunge und Pankreas, aber auch an anderen lebenswichtigen Organen. Langfristig kommt es zum Teil zu einer zystischen Umwandlung der Organe [25, 68, 92], die zur Namensgebung beigetragen hat.

Im frühen Kindesalter dominieren gastrointestinale, später respiratorische Symptome. Sie sind auch oft ein Hinweis auf die Diagnose bei Säuglingen und Kleinkindern [2]. Vor allem ein Mekoniumileus, häufig rezidivierende Atemwegsinfektionen und Pneumonien, eine Gedeihstörung bei Steatorrhö, rezidivierende Pankreatitiden, ein Rektumprolaps, eine Cholelithiasis bzw. Cholestase lassen an eine Mukoviszidose denken.

Bei etwa 90 % der CF-Patienten ist die Kontamination im Respirationstrakt für die wesentlich reduzierte Lebenserwartung verantwortlich. [77]. *Stenotrophomonas maltophilia*, atypische Mykobakterien und methicillinresistente Staphylokokken komplizieren die Situation zusätzlich [77, 93]. Diese Infektionen induzieren irreversible Schädigungen des Bronchialepithels und Gewebsverlust bzw. einen Umbau der Lunge. Es kommt zu atelektatischen, fibrotischen und emphysematischen Veränderungen des Gewebes. Das Endstadium der Zystischen Fibrose wird in der Regel von einer zunehmenden respiratorischen Insuffizienz mit Hypoxie sowie Hyperkapnie, pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzbelastung bestimmt [47, 77, 127].

1.4 Therapie und Prognose

Eine kausale *Therapie* der Mukoviszidose steht bislang nicht zur Verfügung. Grundpfeiler des aktuell durchgeführten Therapie-Regimes sind die Sekretelimination mittels Physiotherapie und eine konsequent durchzuführende Inhalationstherapie.

Atemwegsinfektionen sollten möglichst frühzeitig gezielt antibiotisch behandelt werden [77].

Neben der Therapie der bronchopulmonalen Manifestation ist auf eine ausreichende Kalorien- und Vitaminzufuhr zu achten. Bei bestehender Pankreasinsuffizienz ist eine angemessene Enzymsubstitution mit säurefesten Präparaten erforderlich, die eine fettreiche Ernährung möglich macht [29, 73, 85].

Die *Prognose* für CF-Patienten hat sich in den letzten Jahren erheblich verbessert. Man kann davon ausgehen, dass ein heute geborener Patient eine mittlere Lebenserwartung von etwa 40 Jahren hat. Dies ist zum einen mit den oben beschriebenen verbesserten Behandlungsmöglichkeiten zu erklären. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist ein umfassendes Versorgungskonzept, das eine engmaschige intensive Betreuung der Patienten beinhaltet. Voraussetzung dafür ist ein Team aus kompetenten Ärzten, Pflegepersonal, Ernährungsberatern bzw. Ökotrophologen, Physio- und Familientherapeuten sowie eine gute psychosoziale Betreuung [74, 77, 127].

Mit entscheidend für eine weitere Verbesserung der Prognose ist eine frühzeitige Diagnosestellung, damit die komplexe Betreuung der Patienten ohne Verzögerung eingeleitet werden kann [34, 46, 123].

1.5 Diagnostik einschl. transepithelialer Potenzialdifferenz (PD)

Neben den klinischen Verdachtsmomenten (s. o.) ist die Mukoviszidose-Erkrankung anderer Familienangehöriger richtungsweisend. Die *konventionelle* Diagnostik stützt sich vor allem auf einen positiven Schweißtest in der Pilocarpin-Iontophorese, wobei die Chloridkonzentration im Schweiß ausschlaggebend ist: Werte über 60 mmol/l gelten als pathologisch. Durch Mehrfachbestimmungen und weitergehende Diagnostik lassen sich passager pathologische Werte, die u.a. bei Mangelernährung, bei starker körperlicher Aktivität, beim nephrotischen Syndrom und beim Pseudohypaldosteronismus beobachtet werden, richtig einordnen. Patienten mit Klasse-IV- und -V-Mutationen können normale Chloridwerte im Schweiß aufweisen [77].

Die Diagnose erfolgt teilweise auch per DNA-Analyse, die schon durch Fruchtwasseruntersuchung in der Schwangerschaft möglich ist. Allerdings werden mit der herkömmlichen genomischen Diagnostik nur 35 bis 40 der über 1500 CF-Mutationen erfasst. Die diagnostische Sicherheit liegt unter diesen Umständen bei knapp 90 %. Eine vollständige Sequenzierung ist immer noch sehr Kosten aufwändig und wird nur bei strenger Indikation durchgeführt.

Durch die Defizite in der Diagnostik erklärt sich das durchschnittliche Alter der Diagnosestellung der Zystischen Fibrose, das zwischen 3 und 5 Jahren liegt. Bei ca. 10 % der Patienten wird die Diagnose erst mit ≥ 10 Jahren gestellt. [35, 89].

Grundsätzlich besteht zwar die Möglichkeit eines Neugeborenen Screenings durch die Bestimmung des immunreaktiven Trypsins (IRT), das üblicherweise am 4.-6. Lebensstag durchgeführt wird und bis zur 8. Lebenswoche als informativ gilt. Durch die Bestimmung der häufigsten CF-Mutationen mittels Polymerasekettenreaktion, die inzwischen auch mit dem auf Filterpapier getrockneten Vollblut durchgeführt werden kann, verbessert sich die Aussagekraft erheblich. Allerdings wird dieses Vorgehen in Deutschland bisher nur an wenigen CF-Zentren gehandhabt, da es als Screeningverfahren nicht etabliert ist und nicht durch öffentliche Mittel finanziert wird [77].

Angesichts der bestehenden Unzulänglichkeiten in der CF-Diagnostik kommt der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung (PD) eine besondere Bedeutung zu, da man sich von dieser Methode eine wesentliche Bereicherung der Diagnostik erhofft [1].

1.6 Transepitheliale Potenzialdifferenz (PD)

Als Folge der in Abschnitt 1.4 beschriebenen Vorgänge des transepithelialen Ionentransports entsteht eine messbare Spannung [15], die sogenannte Potenzialdifferenz (PD). Sie wird in Millivolt (mV) angegeben und stellt ein durch die verschiedenen Ionen bedingtes Summenpotential dar. In Bezug auf die Submukosa ist die PD negativ (Abb. 1.2). Sie gibt eine elektrische Spannung zwischen dem Lumen und der Subkutis bzw. dem isoelektrischen Interstitium an [4, 6, 28, 58, 94]. In vivo wird die PD in der Regel am respiratorischen Epithel bestimmt. Prinzipiell

gleiche Spannungsverhältnisse wie am respiratorischen Epithel beobachtet man am intestinalen Epithel [15, 19, 57, 78, 86, 120, 128].

Bei CF-Patienten fällt die PD als Folge der gestörten Chloridsekretion und des exzessiven Natriumioneneinstroms signifikant höher aus als bei Probanden ohne CF- (im Mittel bei Nicht-CF: 25 mV, bei CF: 47 mV) [77]. Allerdings weisen die Basalwerte der PD eine große Variabilität mit einem großem Überlappungsbereich der Werte von Gesunden und CF-Patienten auf [9, 52, 60, 61, 70, 119]. Die PD-Werte heterozygoter CF-Merkmalsträger entsprechen denjenigen gesunder Probanden [64].

Durch die Gabe eines selektiven Natriumkanalblockers wie Amilorid kann die Potenzialdifferenz unmittelbar gesenkt werden (Abb. 1.2). Dieser Effekt ist bei CF-Patienten deutlicher ausgeprägt als bei gesunden Probanden und konnte erstmals durch die Arbeitsgruppe um Knowles nachgewiesen werden [60]. Inzwischen wurde die PD-senkende Wirkung von Amilorid auch von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen bestätigt [22, 45, 48, 53, 80]. Der diagnostische Wert der Natriumkanalinhibition gilt heute allerdings als gering [18, 109].

Aussagekräftiger scheint das Verhalten der Chloridkanäle nach Stimulation durch ein Beta-Adrenergikum während der Natriumblockade zu sein. Es kommt zu einer Zunahme der PD bei Probanden ohne CF, während sich bei den meisten CF-Patienten die Chloridsekretionsstörung dadurch nicht beheben lässt und die PD unverändert bleibt. Üblicherweise wird zur Aktivierung der CFTR-abhängigen Chloridkanäle in vivo Isoproterenol verwendet (Kap. 2.1) [67, 81, 109].

Die geringe Invasivität des Verfahrens und eine gute Reproduzierbarkeit ließen die Potenzialdifferenzmessung in den letzten Jahren zu einer etablierten Diagnostikmethode der Mukoviszidose werden, die allerdings bislang wegen der hohen Anforderungen nur wenigen Arbeitsgruppen zur Verfügung steht [109].

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Potenzialdifferenzmessung anderen Arbeitsgruppen besser zugänglich zu machen und die Altersgrenze zu senken:

- Insbesondere sollte geprüft werden, ob bei der PD-Messung das international als Asthma-Medikament etablierte Beta-2-Mimetikum Salbutamol anstelle des üblicherweise verwendeten Isoproterenol zur Stimulation CFTR-abhängiger Chloridkanäle eingesetzt werden kann, da Letzteres in Deutschland für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen ist.
- Ferner stellte sich die Frage, ob auf die gesonderte Aktivierung „alternativer“ Chloridkanäle im Rahmen der PD-Messung mittels Superfusion verzichtet werden kann. Damit wäre eine deutliche Zeitersparnis verbunden, die vor allem bei jüngeren Kindern die Akzeptanz der PD-Messung erhöhen würde. Es war zu überprüfen, ob unter diesen Messbedingungen noch eine ausreichende Differenzierung zwischen einer CFTR-abhängigen Chloridtransportstörung und einer regelrechten Chloridsekretion möglich ist.
- Ein besonders wichtiges Anliegen war es, die Altersgrenze der PD-Messung zu senken. Vor diesem Hintergrund war die Frage zu klären, ob verlässliche PD-Bestimmungen nicht nur an der nasalen Mucosa, sondern auch in der Ampulla recti möglich sind. Dieser Messort wäre v. a. für die PD-Messung bei Säuglingen und Kleinkindern geeignet, bei denen nur selten eine vollständige nasale PD-Messung gelingt. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass für CF-Patienten im Hinblick auf die therapeutischen Konsequenzen und die Prognose eine möglichst frühe Diagnostik der Erkrankung von essenzieller Bedeutung ist.

2 Methodik

2.1 Prinzipielles Vorgehen bei der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz

Auf die elektrophysiologischen Grundlagen wurde bereits eingegangen (Kap. 1.3).

Wie bereits erwähnt ist die Submucosa bzw. das Interstitium der gesamten Epithelien des Respirationstraktes mit der Subcutis isoelektrisch [6, 28, 58]. Daher kann die Referenzelektrode zur Bestimmung der transepithelialen Potenzialdifferenz subkutan platziert werden, während die Messelektrode mit der luminalen Membran gut zugänglich am respiratorischen Epithel der Nase (unter der Concha nasalis inferior) in Kontakt gebracht werden kann (s. Abb. 2.3).

Die qualitative Ebenbürtigkeit des mehrreihigen Flimmerepithels an der Concha nasalis inferior bezüglich der Konfiguration der Zellverbindungen und der Zusammensetzung der Oberflächenflüssigkeit zum Bronchialepithel konnten zweifelsfrei nachgewiesen werden [49, 60, 62].

Zwar ist schon lange bekannt, dass die PD gesunder Probanden deutlich geringer ist als am Epithel von CF-Patienten [57, 59]. Wegen der großen Überlappung der Werte war der diagnostische Wert aber als gering einzuschätzen (Kap. 1.6). Eine Modifizierung der Messelektrode, durch die es möglich wurde, Pharmaka zur Natriumkanalinhibition und zur Aktivierung der Chloridkanäle mittels Superfusion direkt an den Ort der Messung zu bringen (s.u.), weckte Hoffnung auf eine Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft.

2.2 Blockade des Natriumeinstroms durch Amilorid

Im Anschluss an die Bestimmung der PD-Basiswerte wird als Natriumkanalblockierende Substanz bei diagnostischen PD-Messungen vorzugsweise Amilorid (N-amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-carboxamid) eingesetzt, das als kaliumsparendes Diuretikum schon lange zugelassen ist (Abb. 2.1) [20, 21, 59].

Die Natrium-blockierende Wirkung erfolgt schnell und reversibel. Über den genauen Blockierungsmechanismus und die exakte Bindungsstelle für Amilorid herrscht noch Unklarheit. Im Urogenitalsystem blockiert es die Natriumreabsorption im distalen

Tubulus, am respiratorischen und intestinalen Epithel inhibiert es die Natriumkanäle an der apikalen Membran und vermindert somit den transepithelialen Spannungsgradienten [101]. Aufgrund dieses Pathomechanismus wird die passiv ablaufende Kaliumexkretion verringert. Im Rahmen der CF-Diagnostik und Therapie wird Amilorid entweder inhalativ, nasal oder – wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit – auch rektal appliziert.

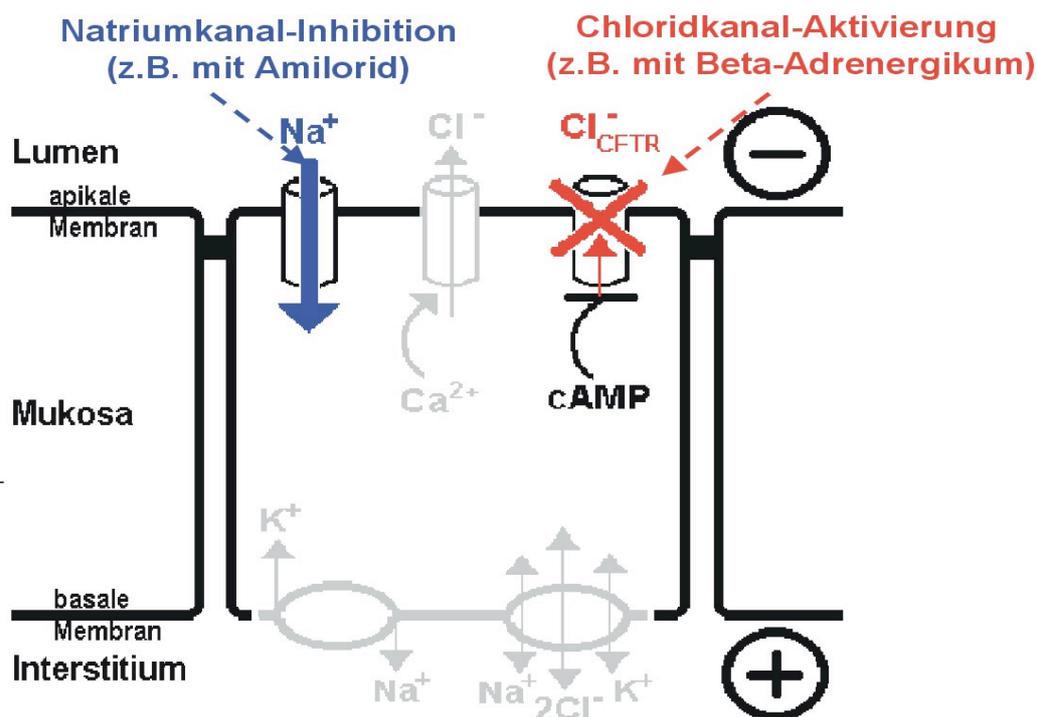


Abb. 2.1 Skizze zur medikamentösen Beeinflussung der Potenzialdifferenz. Einzelheiten im Text (s. auch Legende und Erläuterung zu Abb. 1.2)

2.3 Aktivierung der Chloridsekretion über alternative Chloridkanäle

Zur Aktivierung "alternativer Chloridkanäle" durch chloridfreie Puffer wird üblicherweise Natriumgluconat eingesetzt [6]. Der Nutzen der gesonderten Testung der "alternativer Chloridkanäle" für die klinische Diagnosestellung der Mukoviszidose soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

Ein anderer Mechanismus ist die Verbesserung des Chloridtransports durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration. In vivo wird diese Option wegen unerwünschter Wirkungen nicht genutzt [66].

2.4 Chloridsekretion über CFTR-abhängige Kanäle

Als letzter Schritt der PD-Messung in vivo schließt sich die Stimulation der vom CFTR gesteuerten cAMP-regulierten Chloridkanäle der apikalen Zellmembran an (Abb. 2.1). Bei gesunden Probanden lassen sich diese Chloridkanäle und somit die Chloridsekretion u.a. durch Applikation eines Beta-2-Mimetikums stimulieren, was über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung der transepithelialen Potenzialdifferenz führt [16, 17, 21, 31, 61]. Dieser Effekt bleibt bei CF-Patienten in der Regel aus [38, 54, 66].

2.5 Material- und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potenzialdifferenzmessung

Folgendes Zubehör wurde verwendet:

- 1 Millivoltmeter der Wissenschaftlichen-Technischen Werkstätten-GmbH, WTW PH 530, Weilheim
- 2 Silberchloridelektroden: Standardbezugselektrode Typ 373 von Ingold GmbH, PH-Messtechnik, Steinbach im Taunus
- Kaltlichtquelle der Firma Karl Storz, halogen 150, 20112120
- 5 Infusionspumpen, Typ Injektomat der Firma Fresenius
- 50 ml Injektomat-Pumpen
- Injektomat-Leitungssysteme
- Drei-Wege-Hähne
- Venenverweilkanüle, Typ Surflo 24G
- Nabelarterienkatheter, Typ Argyle 3.5 Ch.
- 2 Agargelbrücken in Plastikschläuchen, gefüllt mit isotonischer Kochsalzlösung in Bactoagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Agargelbrücken in U-förmigen Glasröhrchen gefüllt mit 3-molarer KCl-Lösung in Bactoagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Erlenmeyerkolben 200 ml mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllt, passende Stopfen mit Bohrungen
- Pflaster zur Fixierung der Venenverweilkanüle
- Handschuhe

- Nasenspekulum mit Fiberglas-Lichtträger
- PC Microsan zur Aufzeichnung der Messkurve

2.6 Herstellung der Agargelbrücken

Es werden 2,5 mg des Agars vom Typ Bactoagar der Firma Difco, Augsburg, bzw. KCl-Lösung abgemessen und zu 50 ml isotonischer NaCl-Lösung hinzugefügt. Dieses Gemisch wird bei etwa 200 W im Mikrowellenherd erhitzt und auf diese Weise verflüssigt. Mit Hilfe einer Perfusionspritze werden die Glasröhrchen bzw. die Plastikschläuche mit dem noch flüssigen und warmen Agar möglichst blasenfrei befüllt. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, die Gelbrücken bis zum Festwerden in die beschriebenen Elektrolytlösungen zu stellen. So wird zum einen die vollständige Sättigung der Gelbrücken mit der entsprechenden Elektrolytlösung gewährleistet und zum anderen verhindert, dass sich die Gelbrücken aus den Glasröhrchen bzw. Plastikschläuchen herausziehen. Danach werden die Mess- und die Referenzelektroden zum Nullabgleich zusammengeführt. Bei korrekter luft- bzw. rissfreier Konnektion wird keine Potenzialdifferenz angezeigt [118].

2.7 Versuchsaufbau zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz

Der Versuchsaufbau orientiert sich an dem in der Arbeitsgruppe von Boucher (Chapel Hill/North Carolina) etablierten Messsystem [16].

Ein hochohmiges Voltmeter wird mit zwei Silberchloridelektroden verbunden (s. Kapitel 2.5) und zu Dokumentationszwecken mit einem y/t- Schreiber (Philips Two line PM 8272) verschaltet (Abb. 2.2).

Die Silberchloridelektroden münden jeweils in einem Erlenmeyerkolben, der eine 3-molare Kaliumchloridlösung enthält. Damit diese Lösung nicht verdunstet, ist das Gefäß mit einem Gummistopfen verschlossen.

In die Erlenmeyerkolben werden zudem noch je ein Schenkel eines U- förmigen Glasröhrchens mit einem Innendurchmesser von 5 mm eingeführt, die eine Agargelbrücke aus 3- molarer Kaliumchloridlösung beinhaltet. Der andere Schenkel dieses Röhrchens mündet in einem Gefäß mit isotoner Kochsalzlösung (Abb. 2.2).

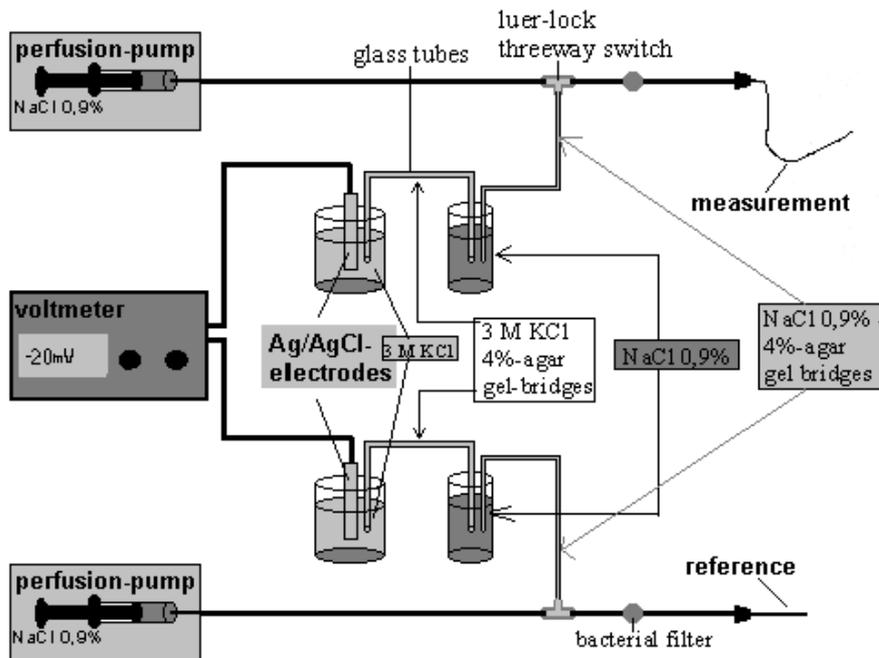
Zudem führt von diesen Kochsalzgefäßen eine zweite mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Agargelbrücke, in Form von mit Hochagar befüllten Kunststoffschläuchen zum Seitenanschluss eines Dreiwegehahns.

An den anderen beiden Anschlüssen des Dreiwegehahns werden je zwei Injektomat-Infusionsschläuche angeschlossen, wovon einer zu einer 50 ml Injektomat-Infusionspumpe führt und der andere zur Messelektrode bzw. zur Referenzelektrode. Als Messelektrode dient ein Nabelarterienkatheter (s. Kapitel 2.5), der mit den Gelbrücken über ein Infusionssystem verbunden ist.

Eine kleinkalibrige Venenverweilkanüle, die subkutan in den Oberarm des Patienten platziert wird, dient als Referenzelektrode [57].

Die 50 ml-Injektomat-Infusionsspritzen fördern je nach Anschluss an Mess- bzw. Referenzelektrode isotonische Kochsalzlösung mit einer Geschwindigkeit von 7 bzw. 3,5 ml/h in die Schläuche [3, 67, 81].

Bevor man mit dem eigentlichen Messvorgang beginnt, werden die Dreiwegehähne so eingestellt, dass die Mess- bzw. Referenzelektroden auf der einen Seite mit den Perfusionspumpen verbunden sind, die die isotone Natriumchloridlösung fördern, und auf der anderen Seite mit den Agargelbrücken verschaltet sind. Luftblasen in den Infusionsleitungen müssen vermieden werden, da diese den Messvorgang behindern.



**Abb. 2.2 Versuchsaufbau der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung ($M = \text{molar}$).
Erläuterungen im Text.**

2.8 Der Messvorgang bei der Bestimmung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz

Die Messelektrode ist an einen langen und weichen Nabelarterienkatheter angeschlossen. Da der Nabelarterienkatheter, der als Messelektrode dient, länger ist und einen größeren Durchmesser aufweist als die Venenverweilkanüle, die als Referenzelektrode fungiert, müssen unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten eingestellt werden (Messelektrode: 7,0 ml/h; Referenzelektrode: 3,5 ml/h).

Vor jeder Messung wird ein Nullabgleich durchgeführt: Man erzeugt einen Kurzschluss, indem man die Enden der Mess- und Referenzelektrode miteinander in Kontakt bringt. Bei korrektem Messaufbau und einwandfreier Funktion der

Agargelbrücken ist keine Spannung zu messen. Ein Toleranzbereich von -1 mV bis +1 mV wird aber allgemein toleriert [3, 58, 67, 81].

Ist der Nullabgleich zufriedenstellend verlaufen, so wird die Messung gestartet: Die Referenzelektrode wird am Oberarm subkutan platziert und mit einem Pflaster fixiert. Der Kopf des Patienten ist mit dem Kinn auf einer ophthalmologischen Kopfstütze positioniert, damit er wenig Bewegungsspielraum hat. Außerdem sollte der Kopf leicht rekliniert sein, damit der Untersucher eine bessere Sicht erhält. Damit ist eine problemlose PD-Messung gewährleistet. Bei der Messung sitzen sich Patient und Untersucher durch einen schmalen Tisch getrennt direkt gegenüber. Zudem hat der Untersucher das Millivoltmeter im Blickfeld.

Die Messelektrode wird mit Hilfe eines an eine Kaltlichtquelle angeschlossenen Nasenspekulums unter die Concha nasalis inferior eingeführt, wo sich in der Regel ein geeignetes Areal mit respiratorischem Epithel befindet (Abb. 2.3).

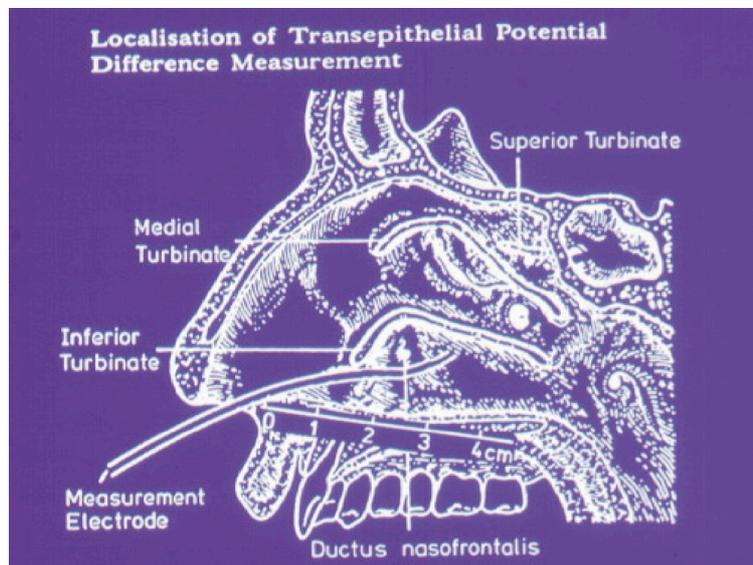


Abb. 2.3 Lagerung des Kopfes einer CF-Patientin auf einer Kopfstütze (links) und Positionierung der Messelektrode zur Bestimmung der nasalen Potenzialdifferenz (rechts)

Der passende Messort für die PD wird dabei durch vorsichtiges Abfahren der concha nasalis inferior von okzipital nach frontal aufgesucht. Dabei dient die Stelle mit dem höchsten Messwert als Messort. Weitere Voraussetzung für eine gültige Messung ist eine Stabilität des PD-Wertes über ca. 5 s.

Es hat sich bewährt, die Basalwerte auf jeder Nasenseite zwei Mal zu messen. Die Werte einer Seite sollten eine Differenz von 5 mV nicht überschreiten [58, 109].

2.9 Potenzialdifferenz-Messung an der rektalen Schleimhaut

Bei Säuglingen und Kleinkindern ist die Messung der nasalen transepithelialen Potenzialdifferenz zwar prinzipiell möglich, allerdings lassen sich hierbei in der Regel allenfalls die Basiswerte ermitteln [118]. Zudem wird der zeitaufwändige Vorgang einer kompletten PD-Messung mit Natriumblockade, Aktivierung alternativer Chloridkanäle und Stimulation des CFTR-abhängigen Chloridtransports (s.u.) von Säuglingen und Kleinkindern nicht toleriert. Eine Messung an der nasalen Mukosa würde in der Regel eine Sedierung erfordern und müsste im Liegen erfolgen. Dies scheint aufgrund der Aspirationsgefahr zu riskant.

RNA-Analysen haben gezeigt, dass die menschliche CFTR-Sequenz nicht nur vom respiratorischen, sondern auch vom intestinalen Zielallel transkribiert wird. Ferner legten Potenzialdifferenzmessungen in vivo nahe, dass die Aktivität basaler CFTR-Chloridkanäle auch in rektalen Epithelzellen vorhanden ist [42, 43, 44, 98].

Als Alternative zur Messung an der Nasalschleimhaut wurde daher die Messung am rektalen Epithel diskutiert. Allerdings waren bisher nur Messungen der PD vor und nach Natriumblockade gelungen, die für die CF-Diagnostik unzulänglich sind [44, 85, 116]. Differenzierte Untersuchungen waren nur an Mäusen geglückt [87, 129].

Nach anfänglichen Schwierigkeiten gelang es im PD-Labor der Universitätskinderklinik Gießen, die Hindernisse zu überwinden und ein probates Messverfahren zu entwickeln, das im folgenden dargestellt ist [105].

Prozedere bei der rektalen Messung: Der prinzipielle Versuchsaufbau ist mit dem der nasalen Messung identisch (Abb. 2.4). Vorteilhaft ist, dass die Kinder in liegender Position gemessen werden. Der Katheter wird im Rektum besser toleriert als in der Nase. Dennoch müssen Säuglinge und Kleinkinder zur Vermeidung von Bewegungsartefakten meist mild sediert werden. Als Einführungshilfe des Messkatheters diene

anstelle eines Nasenspeculums ein (elektrisch nicht leitendes) Pferdeotoskop. Dieses Instrument ähnelt dem Otoskop, das für Menschen eingesetzt wird, besitzt jedoch einen längeren Trichter und ist daher für rektale Messungen besser geeignet. Bei ausreichender Erfahrung kann auf diese Einführungshilfe verzichtet werden, wenn es gelingt, den Katheter am Handschuh des Zeigefingers zu fixieren und mit Gefühl an der gewünschten Stelle zu positionieren. Statt des Nabelarterienkatheters wird ein weicherer Messkatheter mit größerem Lumen verwendet.

Vorbedingungen für die rektale Messung ist eine reizfreie abgeführte Ampulla recti, [23, 90, 91] die vor der Messung mittels Proktoskop optisch beurteilt wird. Erscheint die Darmwand reizfrei, führt man vorsichtig den Katheter ein und ermittelt wie bei der nasalen Messung durch langsames Zurückziehen den Ort mit dem höchsten Messwert. An dieser Position bleibt der Katheter während des weiteren Messvorgangs.

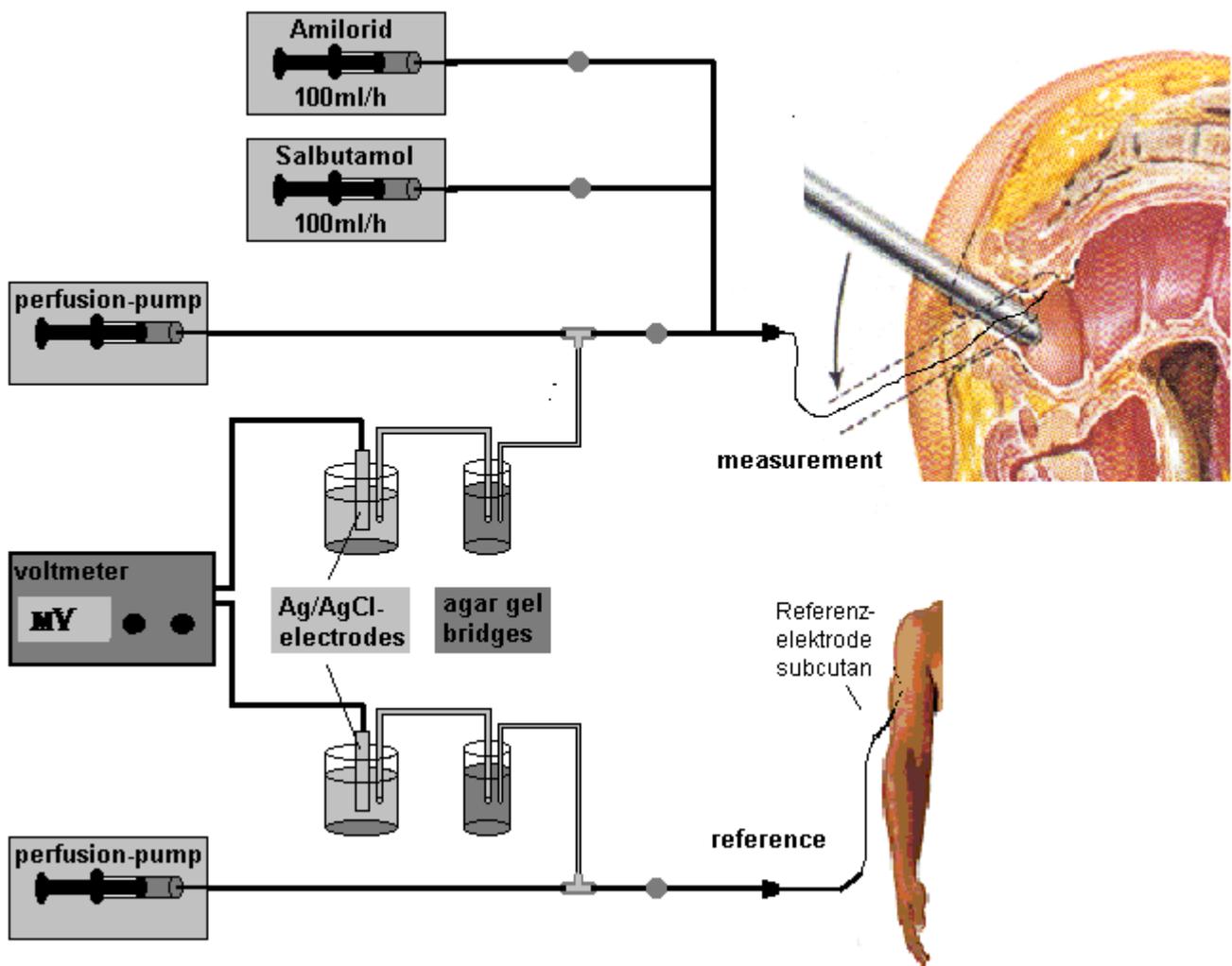


Abb. 2.4 Messaufbau zur Bestimmung der rektalen Potenzialdifferenz mit der Möglichkeit zur Superfusion verschiedener Lösungen wie Amilorid zur Natriumkanalblockade und Salbutamol zur Chloridkanalstimulation (s. zu Abb.2.1)

2.10 Zusammensetzung bei der Superfusion verwendeter Lösungen

Folgende Superfusionslösungen wurden eingesetzt (Tab. 2.1):

- Amilorid-Lösung in chloridhaltigem KBR-Puffer (in lichtgeschützten Flaschen, Puffer und Amilorid in Aqua dest. getrennt, 1 : 1 mischen);
pH 8,58 (über mind. eine Woche stabil), Osmolarität 270 mosmol/l
- Amilorid in chloridfreier Lösung (in lichtgeschützten Flaschen, Puffer und Amilorid in Aqua dest. getrennt, 1 : 1 mischen, pH 8,68 (über mindestens eine Woche stabil), Osmolarität 255 mosmol/l;

- Amilorid in chloridfreier Lösung und Salbutamol bzw. Isoproterenol (in lichtgeschützten Flaschen, Puffer und Amilorid in Aqua dest. getrennt, 1 : 1 mischen); pH 8,69 (über mind. eine Woche stabil), Osmolarität 255 mosmol/l.

Tabelle 2.1 Bei der PD-Messung verwendete Superfusionslösungen

1. Amiloridlösung in chloridhaltigem KBR-Puffer (1000 ml)		2. Amiloridlösung in chloridfreiem Puffer (1000 ml)		3. Amiloridlösung in chloridfreiem Puffer + Isoproterenol (1000 ml)	
K 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	Na CO 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 = 30 mg =0,03 mg / ml = 0,003 %	Amilorid	10 ⁻⁴ Mol=30 mg	Amilorid	10 ⁻⁴ Mol = 30 mg
				Isoproterenol	10 ⁻⁵ Mol
				oder Salbutamol	10 ⁻⁵ Mol

Die Lösungen wurden je 3 Minuten lang mit einem Flow von 100 ml/h superfundiert (Menge: 15 ml in 3 Minuten).

Alle Lösungen wurden in der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen hergestellt. Sie sind nach eigenen Messungen in der Perfusorspritze mindestens 1 Woche stabil. Wegen seiner Lichtempfindlichkeit muss Amilorid in abgedunkelten Gläsern oder Schrankfächern aufbewahrt werden.

Bei längerer Aufbewahrung des Amilorids in elektrolythaltigen Puffern zerfällt dieses. Messungen im HPLC-Labor des Zentrums für Kinderheilkunde in Gießen zeigten, dass in Aqua dest. gelöstes Amilorid in Konzentrationen ≤ 0,3% über mindestens 2 Jahre stabil ist.

2.11 Probanden -und Patientenkollektive

Das Patientenkollektiv rekrutierte sich aus der Mukoviszidose-Ambulanz der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, aus der internistischen Mukoviszidose-Ambulanz der Lungenklinik Seltersberg der JLU Gießen sowie aus stationär behandelten CF-Patienten beider Abteilungen.

Die Diagnose "Zystische Fibrose" basierte jeweils auf einem positiven Schweißtest, einer positiven Genanalyse und einer nachgewiesenen exokrinen Pankreasinsuffizienz.

Das Vergleichskollektiv rekrutierte sich aus Patienten der pneumologischen Ambulanz (vorwiegend Asthmatiker) aus Studenten der Universität Gießen sowie aus Angehörigen und Bekannten der Doktorandin. Bei den Probanden ohne CF wurde darauf geachtet, dass keine Rhinitis oder eine Polyposis nasi vorlag.

Alle PD-Messungen erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Gießen nach Zustimmung der Probanden bzw. durch die Eltern der Probanden. Die Messungen wurden bei Patienten im Alter < 18 Jahren in Anwesenheit der Eltern durchgeführt.

Ausschlusskriterien für die Untersuchungen waren:

- Die Inhalation von Amilorid oder eines β_2 -Mimetikums in einem Zeitraum von 8 Stunden vor der Messung;
- eine schlechte körperliche Verfassung oder eine akute bronchopulmonale Infektion bzw. eine akute Rhinitis;
- ausgeprägte Nasenpolypen, die eine exakte Lokalisation des Messortes unmöglich machten;
- wiederholte Polypektomien, da narbige Veränderungen der Nasenschleimhäute die PD-Werte verfälschen können;

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

2.11.1 Nasale PD-Messung

Bei 25 gesunden Patienten (Alter: 22 bis 30 Jahre) und bei 13 CF-Patienten (Alter: 14 bis 36 Jahre) führten wir - zur Untersuchung der *Reproduzierbarkeit* der PD-Messung innerhalb kurzer Zeit - im Abstand von ca. 10 Minuten zwei Messungen der basalen PD-Werte durch.

- Bei 150 gesunden Probanden (Alter: 7 bis 56 Jahre) und 132 CF-Patienten (Alter: 5 bis 56 Jahre) wurde der Einfluss von *Amilorid auf die nasale PD* ermittelt.
- Bei den gleichen Probanden wurde im Anschluss an die Applikation des Amilorids chloridfreie Lösung zur unspezifischen Chloridsekretion über alternative Chloridkanäle superfundiert.
- Bei 23 gesunden Probanden (Alter: 22 bis 30 Jahre) und 19 CF-Patienten (8 bis 35 Jahre) wurde mit einem Zeitintervall von maximal 5 Tagen die nasale PD *mit und ohne Gabe von chloridfreiem Puffer* bestimmt.
- Bei 25 gesunden Probanden (Alter: 22 bis 30 Jahre) und 13 CF-Patienten (Alter: 14 - 36 Jahre) wurde an zwei verschiedenen Tagen innerhalb von maximal fünf Tagen in randomisierter Reihenfolge je eine PD-Messung nach *Stimulation der CFTR-abhängigen Chloridkanäle* mit Isoproterenol und Salbutamol durchgeführt.
- Mit der gleichen Technik wurden im Zusammenhang mit den rektalen PD-Messungen (s. u.) zeitnah innerhalb von vier Monaten an 45 gesunden Probanden und 17 CF-Patienten nasale Messungen durchgeführt.

2.11.2 Rektale PD-Messung

Bei 56 gesunden Probanden (Alter: 1 Monat bis 61 Jahre) und 12 CF-Patienten (Alter: 1 Monat bis 18 Jahre) wurde die rektale Messung der Potenzialdifferenz vor und während Superfusion von Amilorid sowie von Salbutamol in chloridfreiem Puffer durchgeführt.

Alle Patienten hatten eine makroskopisch unauffällige Rektumschleimhaut. Die Säuglinge und Kleinkinder waren mild sediert (mit 20-40 mg/kg Chloralhydrat, oral appliziert, in Form einer Lösung, die in der Kliniksapotheke hergestellt wurde).

Die Diagnose "Zystische Fibrose" basierte jeweils auf einem positiven Schweißtest, einer positiven Genanalyse und einer nachgewiesenen exokrinen Pankreasinsuffizienz.

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Gießen genehmigt.

2.12 Statistische Methoden

Um die Ergebnisse der Potenzialdifferenzmessungen zu beschreiben, wurde die deskriptive Statistik angewendet. Die Anzahl der Probanden bzw. Messungen wurde mit n angegeben, die jeweiligen Zielgrößen wurden durch den Mittelwert und die Standardabweichung bzw. den Median sowie größte und kleinste Merkmalsausprägung dargestellt.

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (r) und der linearen Regression wurden nach den üblichen statistischen Methoden vorgenommen [100]. Zur Auswertung standen dafür die Statistikprogramme WinStat Vers. 3,1 und ORIGIN 6.1 zur Verfügung.

Zum Vergleich der Messergebnisse unter Isoproterenol und Salbutamol, der konventionellen mit der verkürzten Methode sowie der rektalen und nasalen Potenzialdifferenzmessung wurde zum einen der Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben sowie der T-Test für unpaarige Stichproben angewendet, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde. Die Gleichwertigkeit zweier Methoden (z. B. Wirkung der beiden Beta-2-Mimetika) wurde mittels der Diagramme nach Bland und Altman untersucht, wobei die Differenzen der Wertepaare auf die Mittelwerte bezogen werden [14].

Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Intraindividuelle Variabilität der basalen Potenzialdifferenzwerte vor der Superfusion

3.1.1 Basale Potenzialdifferenzwerte bei gesunden Probanden

Um die Reproduzierbarkeit und damit die Aussagekraft der basalen Potenzialdifferenzwerte (PD) beurteilen zu können, führten wir bei 25 gesunden Probanden und 13 CF-Patienten im Abstand von ca. 10 Minuten jeweils zwei Messungen der basalen PD-Werte beim gleichen Probanden durch (Tabelle 3.1, 3.2).

Dabei fand sich bei Gesunden eine intraindividuelle Variabilität der basalen PD-Werte von 11,6% mit einer signifikanten Korrelation von $r = 0,49$ ($p < 0,05$; Abb. 3.1).

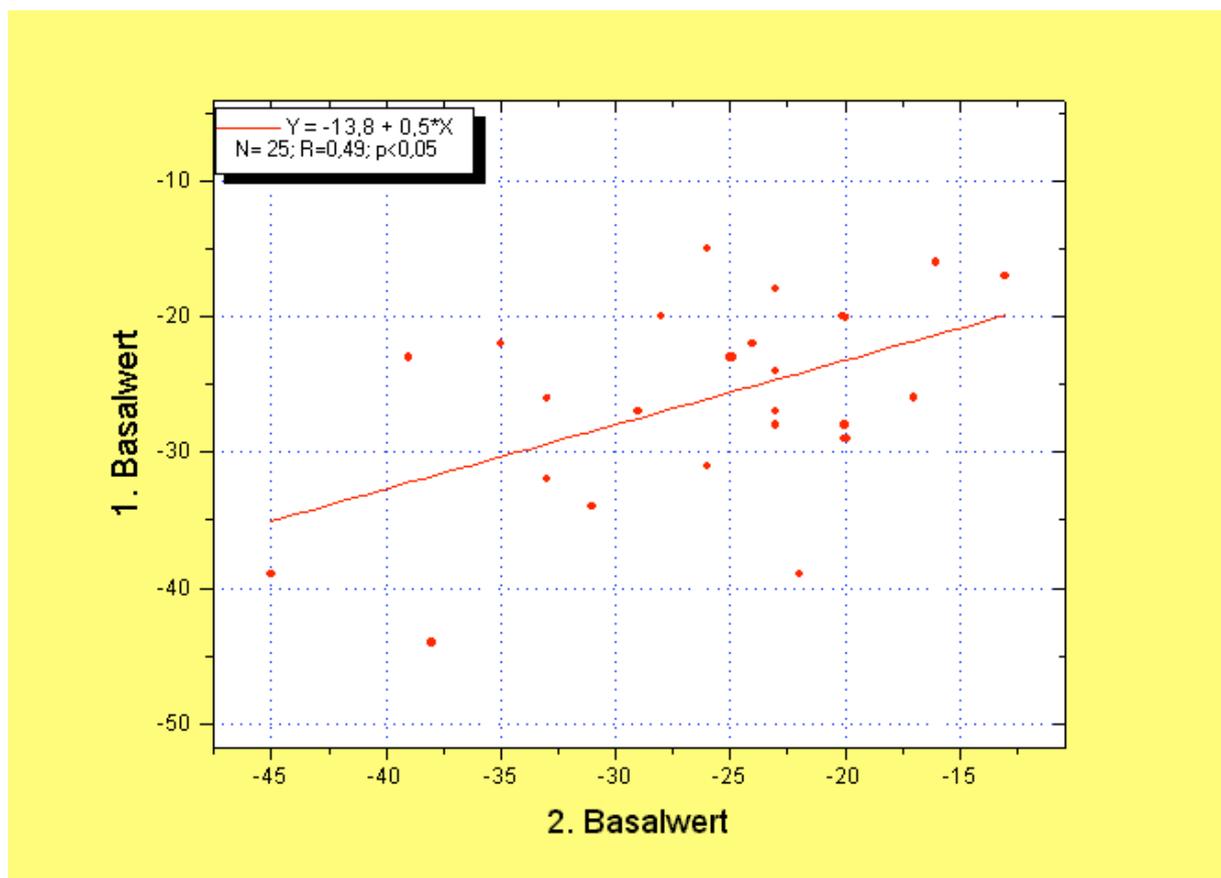


Abbildung 3.1: Regressionsanalyse von Doppelmessungen der Basalwerte der nasalen Potenzialdifferenz dargestellt bei 25 Probanden ohne CF ($r = 0,49$)

Tabelle 3.1: Ausgangswerte der Potenzialdifferenz-Messung bei 25 Probanden ohne CF und Berechnung des Variationskoeffizienten (VC)

Proband-Nr.	1.Messung (mV)	2. Messung (mV)	Arithmet. Mittelwert (mV)	VC
1.	-26	-33	-29,5	13,5%
2.	-22	-24	-23	4,5%
3.	-29	-20	-24,5	15,5%
4.	-15	-26	-20,5	36,7%
5.	-20	-20	-20	0%
6.	-39	-22	-30,5	21,8%
7.	-32	-33	-32,5	1,6%
8.	-44	-38	-41	6,8%
9.	-31	-26	-28,5	8,1%
10.	-22	-35	-28,5	29,5%
11.	-27	-29	-28	3,7%
12.	-23	-25	-24	4,3%
13.	-16	-16	-16	0%
14.	-26	-17	-21,5	17,3%
15.	-23	-39	-31	34,8%
16.	-24	-23	-23,5	2,1%
17.	-34	-31	32,5	4,4%
18.	-27	-23	-25	7,4%
19.	-28	-23	25,5	8,9%
20.	-28	-20	-24	14,3%
21.	-24	-23	-23,5	2,1%
22.	-18	-23	-20,5	13,9%
23.	-17	-13	-15	11,8%
24.	-39	-45	-42	7,7%
25.	-20	-28	-24	20,0%

Mittelwert des Variationskoeffizienten: 11,6 %
Standardabweichung: 10,3 %

Tabelle 3.2: Deskriptive Statistik der Doppelmessungen der basalen PD-Werte bei 25 Probanden ohne CF (Nicht-CF)

	1. basale PD-Messung, Nicht-CF	2. basale PD-Messung, Nicht-CF
n	25	25
Arithmetischer Mittelwert	-26,2 mV	-26,2 mV
Median	-26,0 mV	-24,0 mV
Standardabweichung	7,4 mV	7,7 mV
Minimum	-44,0 mV	-45,0 mV
Maximum	-15,0 mV	-13,00 mV

3.1.2 Vergleich der intraindividuellen Basalwerte der PD bei CF-Patienten

Analog wurden zwei PD-Messungen der basalen Werte bei 13 CF-Patienten kurz hintereinander in der Nasenöffnung mit der größeren Potenzialdifferenz durchgeführt (Tab. 3.3, 3.4). Dabei zeigte sich eine im Vergleich zu den Daten der Gesunden etwas höhere intraindividuelle Variabilität der Doppelmessungen mit einem Variationskoeffizienten von $17,7 \pm 31,0 \%$ und eine trotz des kleinen Kollektivs gleich gute signifikante Korrelation von $r = 0,49$ bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$).

Tabelle 3.3: Ausgangswerte der Potenzialdifferenz-Messung bei 13 CF-Patienten und Berechnung des Variationskoeffizienten (VC)

Proband-Nr.	1.Messung (mV)	2. Messung (mV)	Arithmet. Mittelwert (mV)	VC
1.	-40	-19	-29,5	26,3%
2.	-42	-41	-41,5	1,2%
3.	-42	-38	-40	4,8%
4.	-53	-54	-53,5	1,0%
5.	-62	-40	-51	17,7%
6.	-12	-40	-26	116,7%
7.	-37	-33	-35	5,4%
8.	-55	-82	-68,5	24,5%
9.	-60	-74	-67	11,7%
10.	-35	-44	-39,5	12,9%
11.	-48	-47	-47,5	1,0%
12.	-46	-40	-43	6,5%
13.	-50	-50	-50	0%

Mittlerer Variationskoeffizient: 17,7 %
Standardabweichung: 31,0 %

Tabelle 3.4: Deskriptive Statistik zur Doppelmessung der nasalen PD bei 13 CF-Patienten vor der Applikation von Medikamente (Ausgangswerte)

	1. basale PD-Messung, CF	2. basale PD-Messung, CF
n	13	13
Arithmetischer Mittelwert	-44,8 mV	-46,3 mV
Median	-46,0 mV	-41,0 mV
Standardabweichung	12,9 mV	16,5 mV
Minimum	-62,0 mV	-82,0 mV
Maximum	-12,0 mV	-19,00 mV

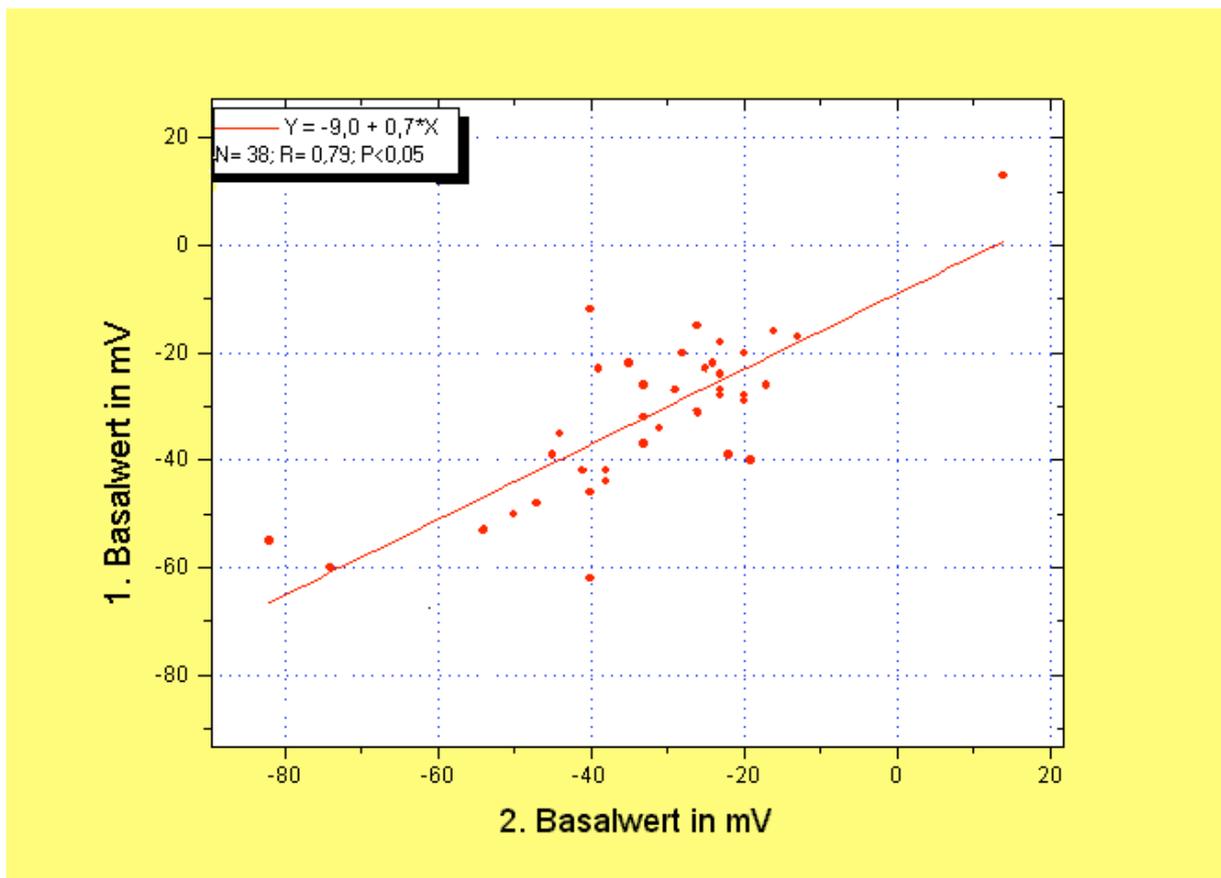


Abbildung 3.2: Lineare Regression der doppelt gemessenen Basalwerte der nasalen PD bei 13 CF-Patienten und 25 Probanden ohne CF ($r = 0,79$)

Führt man die Regressionsanalyse mit den Daten beider Kollektive durch (Abb. 3.2), so resultiert insgesamt eine deutlich bessere lineare Korrelation ($r = 0,79$; $p < 0,05$).

Die absoluten PD-Werte der CF-Patienten (-46,0 bzw. -41,0 mV) lagen im Mittel wesentlich höher als bei den gesunden Probanden (-26,0 bzw. -24,0 mV). Legt man jeweils die arithmetischen Mittelwerte zugrunde, so war im T-Test für unabhängige Stichproben ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar ($p < 0,001$). Allerdings war der Überlappungsbereich zwischen Probanden ohne CF (-15,0 bis -42,0 mV) und mit CF (-26,0 bis - 68,5 mV) ausgeprägt (s. Tab. 3.1 und 3.3).

3.2 Superfusion von Amilorid

Die Inhibition der Natriumkanäle mit Hilfe des Natriumkanalblockers Amilorid ist Voraussetzung für die Testung weiterer Medikamente. Bei 150 gesunden Probanden und 132 CF-Patienten wurde die PD vor und nach Amilorid gemessen und der prozentuale Abfall nach Superfusion von Amilorid-Lösung ermittelt (Tab. 3.5; Anhang Tab. 6.1).

Tabelle 3.5: Deskriptive Statistik des absoluten (mV) und prozentualen Abfalls der Potenzialdifferenzwerte (PD) nach Superfusion von Amilorid bei Probanden ohne (Nicht-CF) und mit CF

	PD nach Amilorid, Nicht-CF (mV)	PD nach Amilorid, CF (mV)	PD nach Amilorid, Nicht-CF (%)	PD nach Amilorid, CF (%)
n	150	132	150	132
Arithmetischer Mittelwert	- 10,2	-13,3	59,7	66,5
Median	-9,0	-12,0	61,3	68,1
Standardabweichung	5,5	6,8	14,6	13,7
Minimum	0,0	-1,0	21,1	30,3
Maximum	-28,0	-38,0	100,0	92,3

Sowohl bezüglich der absoluten Werte ($p = 4,04 \times 10^{-5}$) als auch im Hinblick auf den prozentualen Abfall der Potenzialdifferenz ($p = 5,6 \times 10^{-5}$) waren nach Superfusion von Amilorid zwar statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar. Aus den Minimum-Maximum-Werten ist allerdings eine deutliche Überschneidung abzulesen. Für die prozentualen PD-Änderungen ist die starke Überlappung der Werte mit Hilfe von Boxplot-Diagrammen veranschaulicht (Abb. 3.3). Somit kommt dem Amilorideffekt keine diagnostische Bedeutung zu.

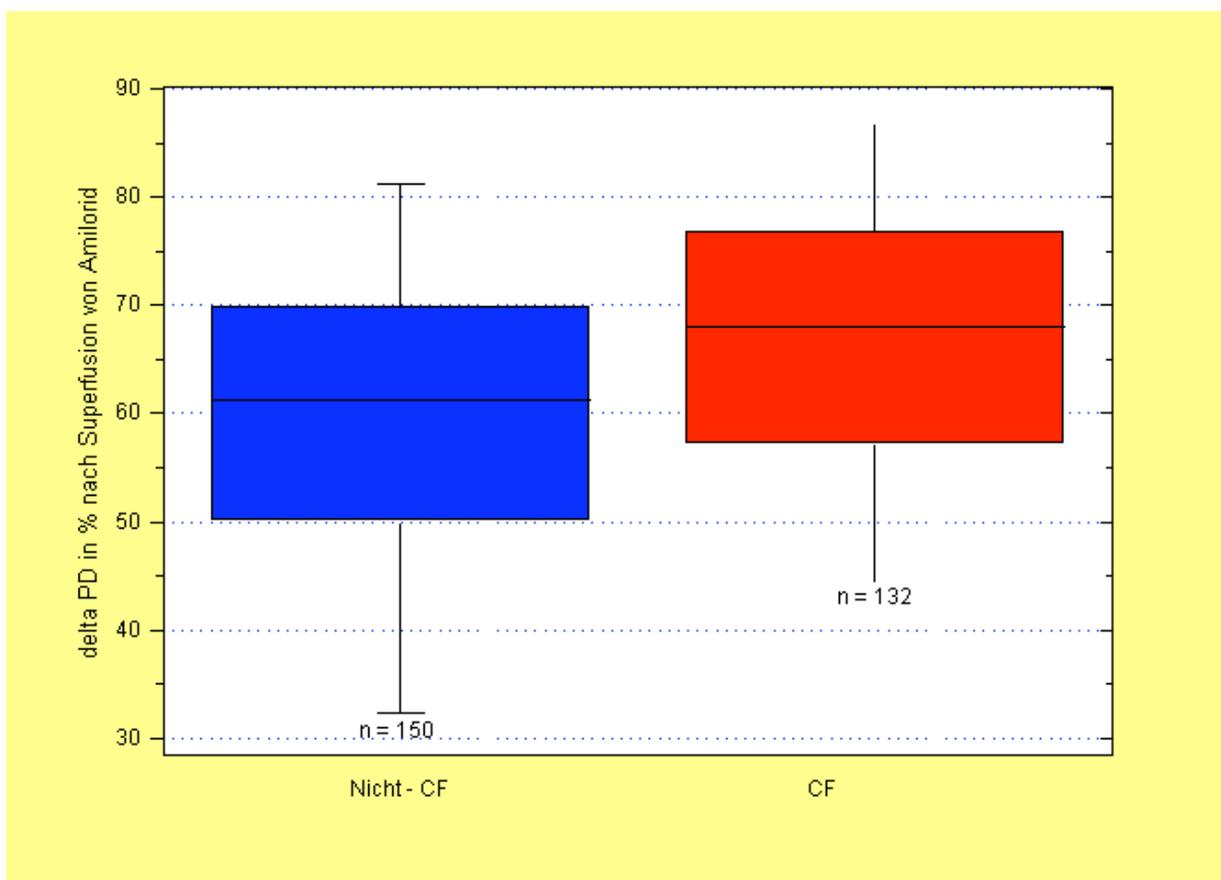


Abbildung 3.3: Prozentuales Absinken der Potenzialdifferenz (PD) nach Superfusion von Amilorid bei 150 Gesunden und 132 CF-Patienten im Boxplot-Diagramm. Die Markierungen entsprechen dem Median, der 5., 25., 75. und 95. Perzentile.

3.3 Superfusionsmessungen mit chloridfreiem Puffer

Nach Applikation des Amilorids folgte bei der konventionellen Superfusionsmessung die Verabreichung einer chloridfreien Lösung zur Aktivierung alternativer Chloridkanäle.

Bei 150 gesunden Probanden und 132 CF-Patienten wurde der prozentuale Anstieg der PD ermittelt, bezogen auf das PD-Niveau nach Superfusion von Amilorid in chloridhaltiger Puffer-Lösung.

Auch die PD-Resultate nach Gabe der chloridfreien Lösung variierten beträchtlich sowohl bei gesunden Probanden als auch bei CF-Patienten (Abb. 3.4, 3.5).

Tabelle 3.6: Deskriptive Statistik des prozentualen Anstieges der PD-Werte nach Superfusion von chloridfreier Lösung bei Probanden ohne (Nicht-CF) und mit CF

	PD nach chloridfreier Lösung, Nicht-CF	PD nach chloridfreier Lösung, CF
n	150	132
Arithmetischer Mittelwert	34,6 %	-0,6 %
Median	28,6 %	-3,1 %
Standardabweichung	62,1 %	36,7 %
Minimum	-45,0 %	-72,7 %
Maximum	433,3 %	317,0 %

Im Mittel reagierten die Gesunden mit einem tendenziell größeren Anstieg der Potenzialdifferenz als die CF-Patienten, die meistens sogar einen weiteren Abfall der PD auf die Superfusion chloridfreier Lösung aufwiesen. Dies wird aus dem Median von 28,6 % bei den Probanden ohne CF und von -3,1 % für die CF-Patienten deutlich, wobei erhebliche Überlappungen zwischen Probanden ohne und mit CF vorliegen (siehe Tabelle 3.6; Abb. 3.6). Im T-Test war der Unterschied hoch signifikant ($p = 1,5 \times 10^{-6}$).

Geht man von einem "cut-off" bei einer prozentualen Zunahme von > 20% aus, so waren bei Probanden ohne CF 87 (= 58 %), bei CF-Patienten 11 (= 8,3 %) „responder" zu verzeichnen.

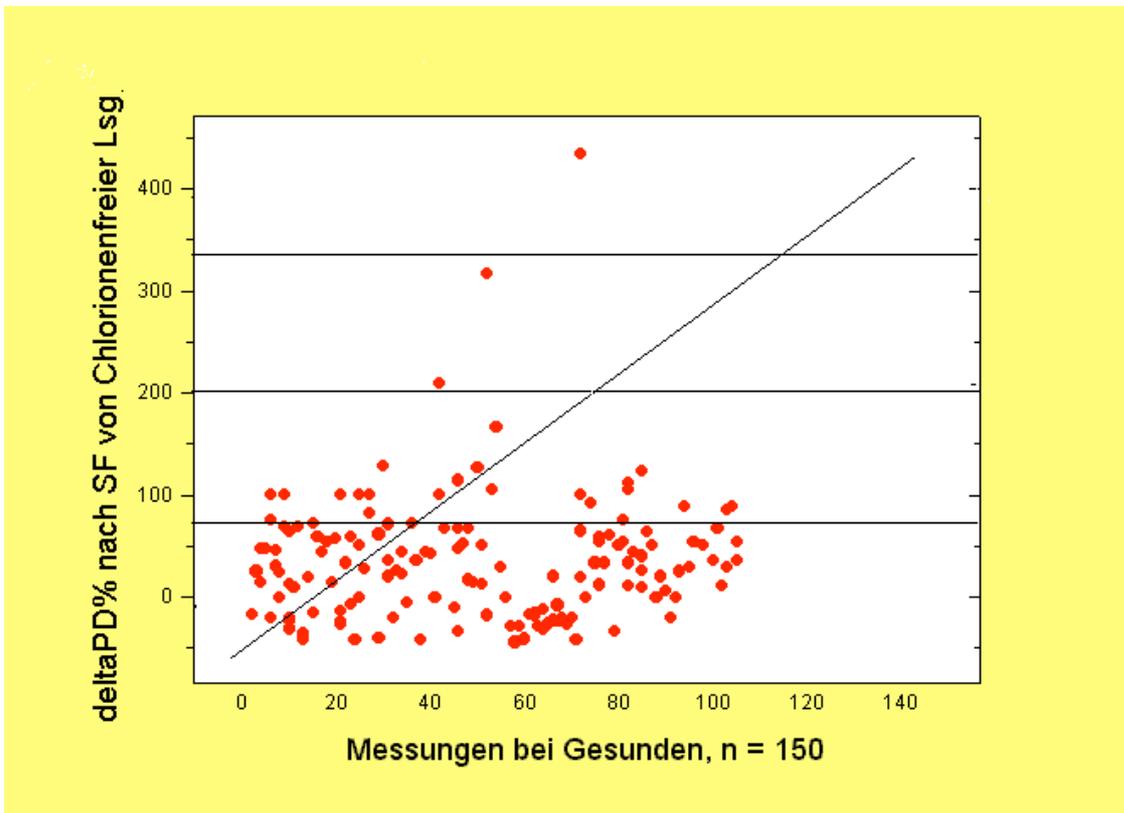


Abbildung 3.4: Wiederanstieg der PD nach chloridfreier Lösung bei 150 gesunden Probanden

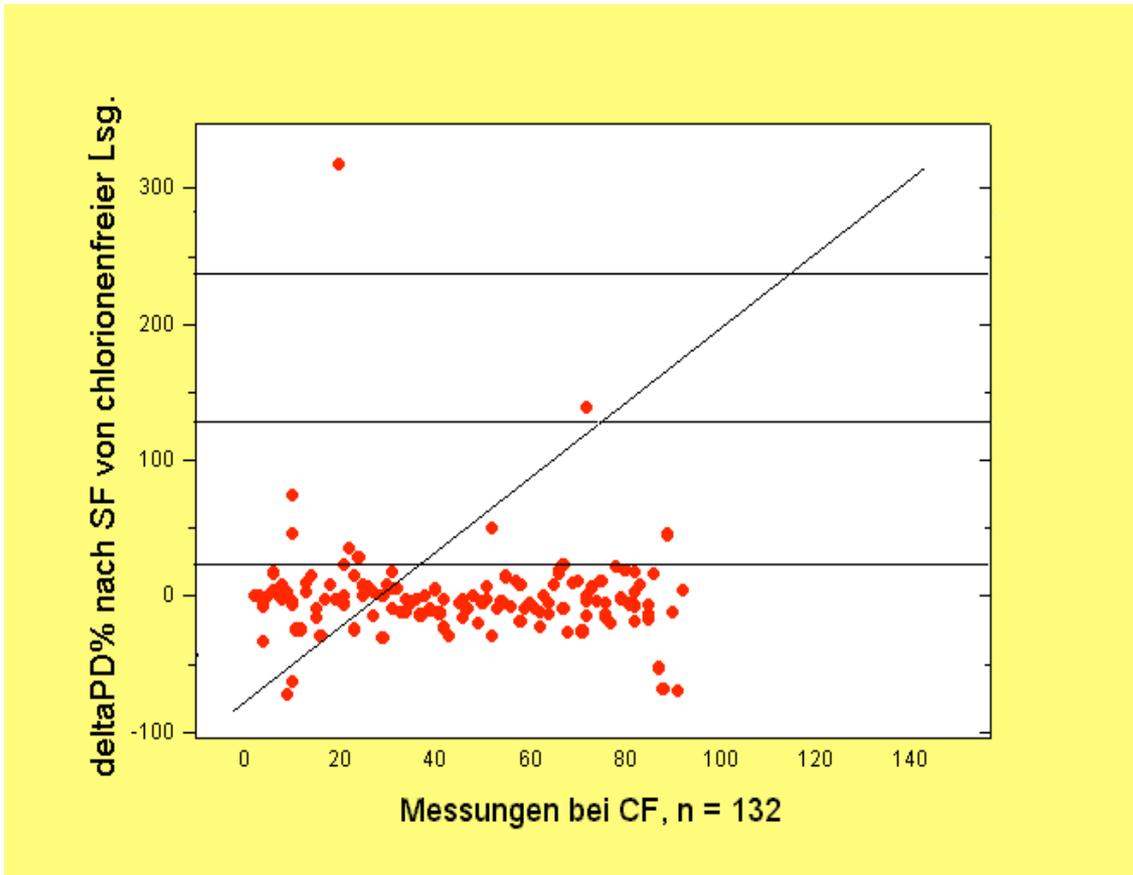


Abbildung 3.5: Wiederanstieg der PD nach Superfusion chloridfreier Lösung bei 132 CF-Patienten

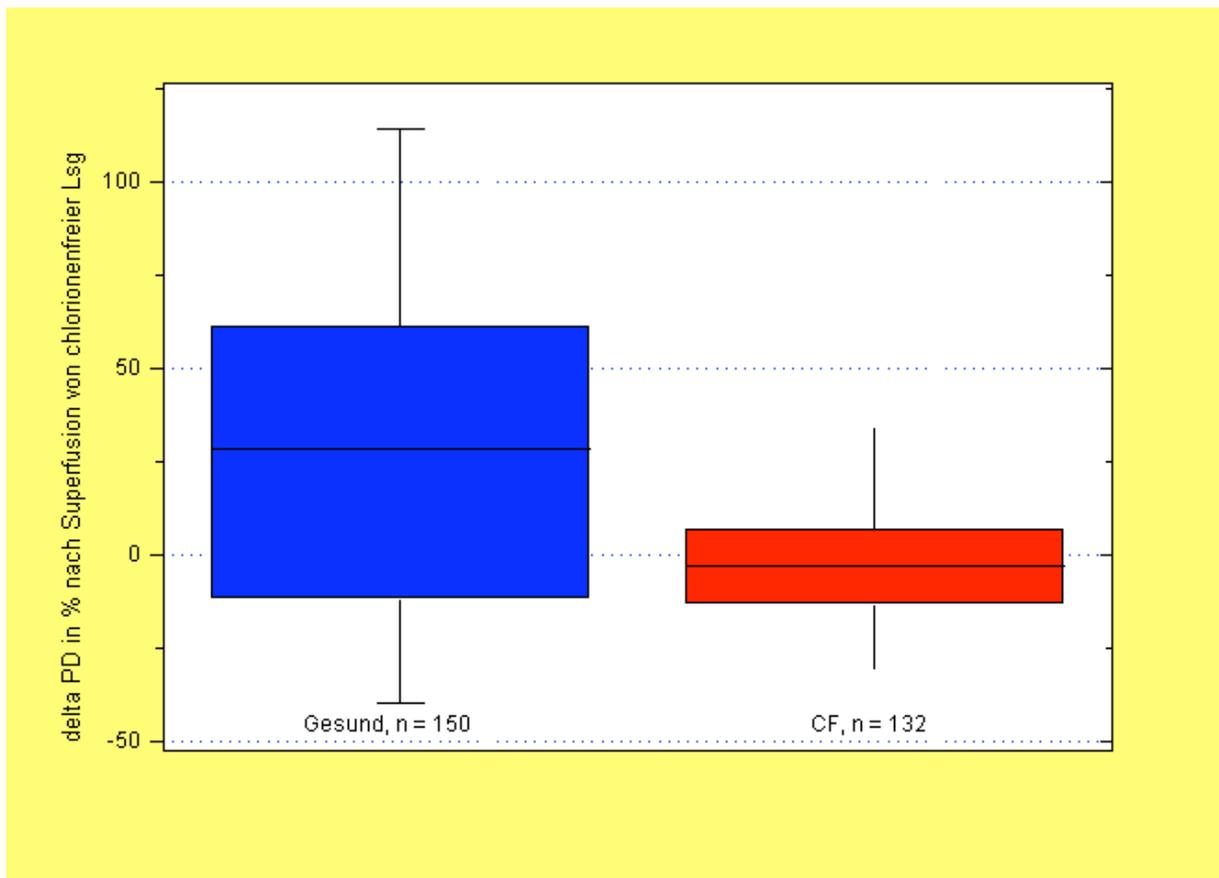


Abbildung 3.6: Vergleich der Reaktion auf die Gabe von chloridfreier Lösung bei Probanden ohne (Gesund) und mit CF im Boxplot-Diagramm (siehe auch Legende zu Abb. 3.4)

3.4 Stimulation CFTR-abhängiger Kanäle

Um die Effizienz von Isoproterenol und Salbutamol hinsichtlich der Aktivierung des Chlorionentransportes einschätzen zu können, führten wir bei 25 Probanden ohne CF und bei 13 CF-Patienten PD-Messungen in randomisierter Reihenfolge mit beiden Medikamenten durch (Tab. 3.7).

Der Median des prozentualen Wiederanstieges der PD, der deutlich vom arithmetischen Mittelwert abwich, lag bei Probanden ohne CF nach Superfusion von Salbutamol mit 100,0 % geringfügig über den Werten, die nach Isoproterenol zu erheben waren (90,5 %). Der maximale Wiederanstieg nach Gabe von Salbutamol betrug 223,1 %, nach Applikation von Isoproterenol 191,7 %.

Auch bei CF-Patienten war der Median annähernd gleich. Er betrug bei der Messung mit Salbutamol -4,2 %, bei denjenigen mit Isoproterenol 0,0 %. Im Mittel war also

keine Zunahme der PD zu beobachten. Im Einzelfall war ein Wiederanstieg von bis zu 14,3 % nach Salbutamol und nach Isoproterenol bis zu 21,7 % nachzuweisen.

Tabelle 3.7: Deskriptive Statistik des direkten PD-Vergleiches von Salbutamol und Isoproterenol in randomisierter Reihenfolge bei 25 Probanden ohne (Nicht-CF) und 13 Probanden mit CF

	PD nach Salbutamol, Nicht-CF	PD nach Isoproterenol, Nicht-CF	PD nach Salbutamol, CF	PD nach Isoproterenol, CF
n	25	25	13	13
Arithmetischer Mittelwert	108,8 %	114,6 %	-3,4 %	-5,3 %
Median	100,0 %	90,5 %	-4,2 %	0,0 %
Standardabweichung	39,9 %	38,3 %	12,2 %	17,9 %
Minimum	61,5 %	53,9 %	-31,8 %	-45,0 %
Maximum	223,1 %	191,7%	14,3 %	21,7 %

Mittels linearer Regressionsanalyse ließ sich beim direkten Vergleich der beiden Beta-Mimetika eine gute Übereinstimmung des prozentualen Wiederanstieges der PD dokumentieren ($r = 0,86$; $p < 0,01$).

Es fällt auf, dass sich bei den CF-Patienten als Folge der nur vereinzelt nachweisbaren Repolarisation eher eine Punktwolke um die Null-Prozent-Linie herum darstellt (Abb. 3.7).

Die Boxplot-Diagramme machen die weitgehende Übereinstimmung der Resultate deutlich (Abb. 3.8). Es existiert kein Überlappungsbereich zwischen den Probanden mit regelrechter Chloridsekretion und den CF-Patienten, bei denen sich die Chloridtransportstörung widerspiegelt. Ein signifikanter Unterschied in der Reaktion auf die beiden Beta-Adrenergika war nicht nachweisbar (Nicht-CF: $p = 0,47$; CF-Patienten: $p = 0,70$).

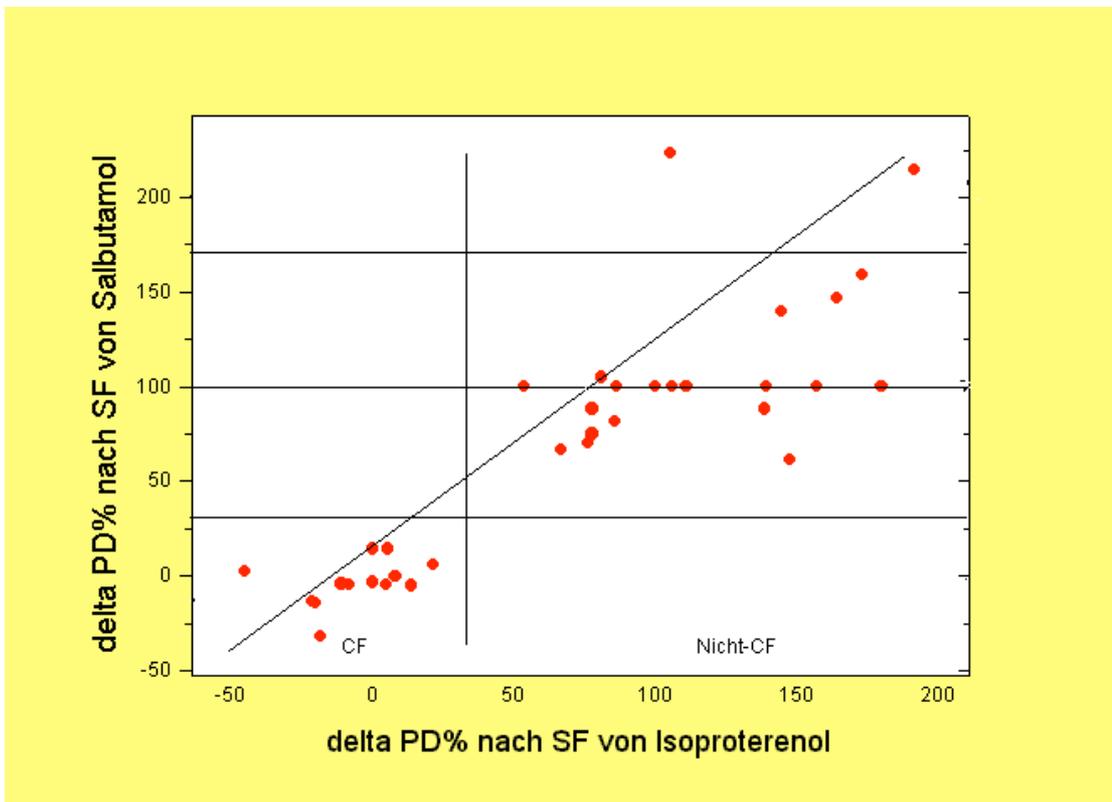


Abbildung 3.7: Lineare Regression des prozentualen Anstiegs der PD-Werte nach Superfusion von Salbutamol bzw. Isoproterenol bei 13 CF-Patienten und 25 Probanden ohne CF ($r = 0,86$)

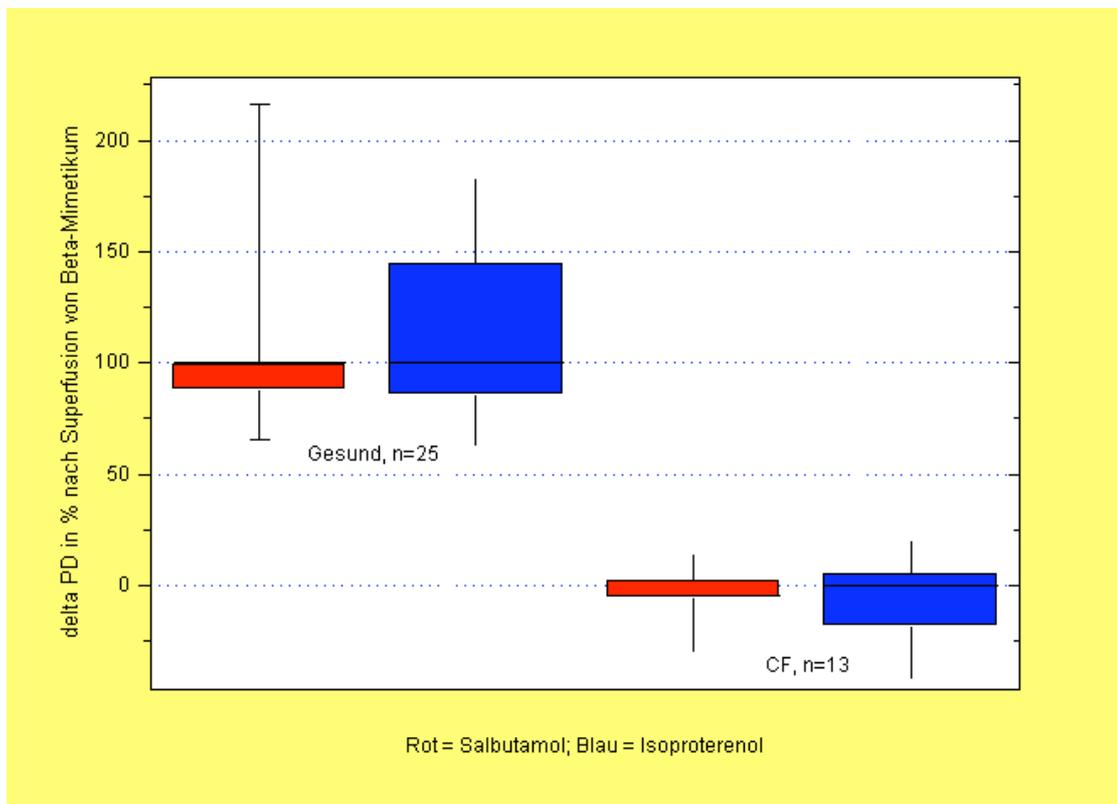


Abbildung 3.8: Gegenüberstellung des prozentualen Wiederanstiegs der PD nach Superfusion von Salbutamol bzw. Isoproterenol bei 25 Probanden ohne CF (Gesund) und 13 CF-Patienten (s. auch Legende zu Abb. 3.4)

Bezieht man die Differenzen der Wertepaare auf die Mittelwerte (nach Bland und Altman), so lässt sich die weitgehende Übereinstimmung der Wirkung der beiden Beta-Mimetika gut beurteilen: Bei den Daten der CF-Patienten ergibt sich nur eine geringfügige Streuung der PD-Werte. Lediglich bei starken PD-Wiederanstiegen (d.h. bei Probanden ohne CF) ist eine Streuung über den 2s-Bereich hinaus zu erkennen (Abb. 3.9):

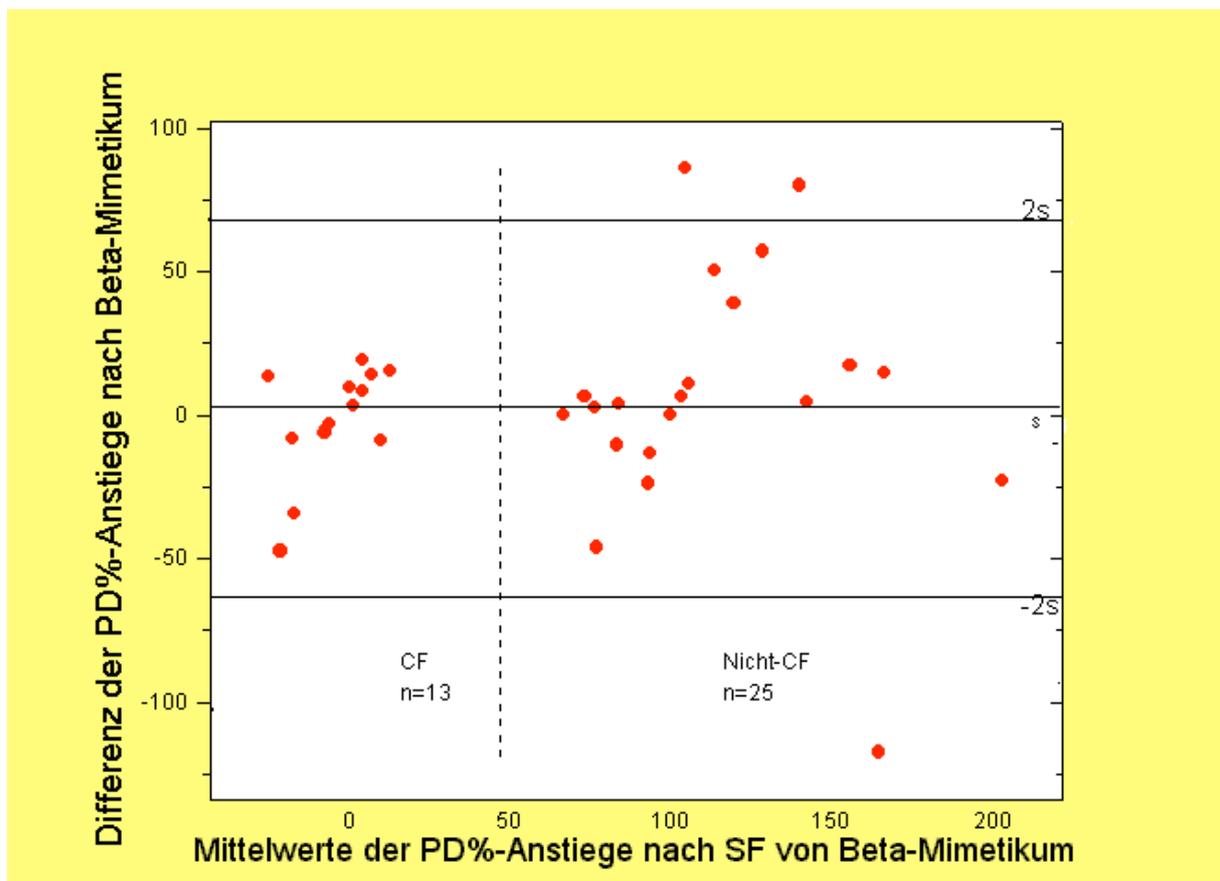


Abbildung 3.9: Vergleich der Wirkung von Salbutamol und Isoproterenol bezüglich der Differenz des prozentualen Wiederanstieges der Potenzialdifferenz (PD %) nach Bland und Altman

3.5 Superfusionsmessungen mit konventioneller und verkürzter Methode

Bei 23 gesunden Probanden und 19 CF-Patienten wurde geprüft, ob durch Verzicht auf die sonst gebräuchliche chloridfreie Lösung die CF-Diagnostik beeinträchtigt wird.

3.5.1 Ausgangswerte der PD und PD-Niveau nach Superfusion von Amilorid

Nach der initialen PD-Messung, bei der für die Probanden ohne CF die Ausgangswerte in der Größenordnung der Voruntersuchung lagen (Tab. 3.8, vgl. Tab. 3.2, 3.4) und ebenfalls deutlich niedriger ausfielen als für die CF-Patienten, wurde die Amilorid-Superfusion durchgeführt. Dabei bestätigte sich der prozentuale Abfall der PD gesunder Probanden (Median 61,5%), der nicht ganz das Ausmaß der CF-Patienten erreichte (Median: 71,6%, vgl. Tab. 3.5).

Tabelle 3.8: Ausgangswerte der PD sowie PD-Befunde nach Superfusion von Amilorid (vor Anwendung der verkürzten Methode)

	Ausgangswerte der PD (mV); Nicht-CF	Ausgangswerte der PD (mV), CF	Absinken der PD unter Amilorid, Nicht-CF	Absinken der PD unter Amilorid, CF
n	23	19	23	19
Arithmetischer Mittelwert, \bar{x}	-24,7 mV	-37,7 mV	58,8 %	68,3 %
Median, Med.	-22,5 mV	-39,0 mV	61,5 %	71,6 %
Standardabweichung, s	10,7 mV	20,0 mV	16,8 %	16,0 %
Minimum	-45,0 mV	-68,0 mV	20,0 %	30,0 %
Maximum	1,0 mV	22,0 mV	84,2 %	89,1 %

3.5.2 Superfusion von Beta-Adrenergika

Der direkte Vergleich der verkürzten und herkömmlichen Methode unter Applikation eines Beta-Mimetikums mit oder ohne vorgeschaltete Messung mit chloridfreier Lösung wurde bei 19 CF-Patienten und 23 gesunden Probanden durchgeführt (Tab. 3.9). Exemplarisch sind 2 Kurven der PD-Aufzeichnung dargestellt, die den Zeitgewinn verdeutlichen (Abb. 3.10, 3.11).

Tabelle 3.9: Prozentuale PD-Änderung nach Superfusion eines Beta-Mimetikums: Vergleich zwischen verkürzter und konventioneller Methode der PD-Messung

	Verkürzte Methode, CF	Konventionelle Methode, CF	Verkürzte Methode, Nicht-CF	Konventionelle Methode, Nicht-CF
n	19	19	23	23
Arithmetischer Mittelwert	-6,4 %	-3,6 %	111,9 %	99,3 %
Median	-3,3 %	0,0 %	100,0%	88,2 %
Standardabweichung	15,0 %	17,5 %	50,2%	39,7 %
Minimum	-44,4 %	-40,0 %	50,0 %	50,0 %
Maximum	20,9 %	25,9 %	214,3 %	218,2 %

Sowohl bei den CF-Patienten (-3,3 bzw. 0,0 %), bei denen eine signifikante Repolarisation nur vereinzelt nachzuweisen war, als auch bei den gesunden Probanden lagen die Mediane der prozentualen Änderungen nach Superfusion des Beta-2-Mimetikums eng beieinander (+100,0 % bzw. +88,2 %). Ebenso waren die mit beiden Methoden maximal und minimal gemessenen Werte bei den vergleichbaren Kollektiven im gleichen Werte-Bereich angesiedelt.

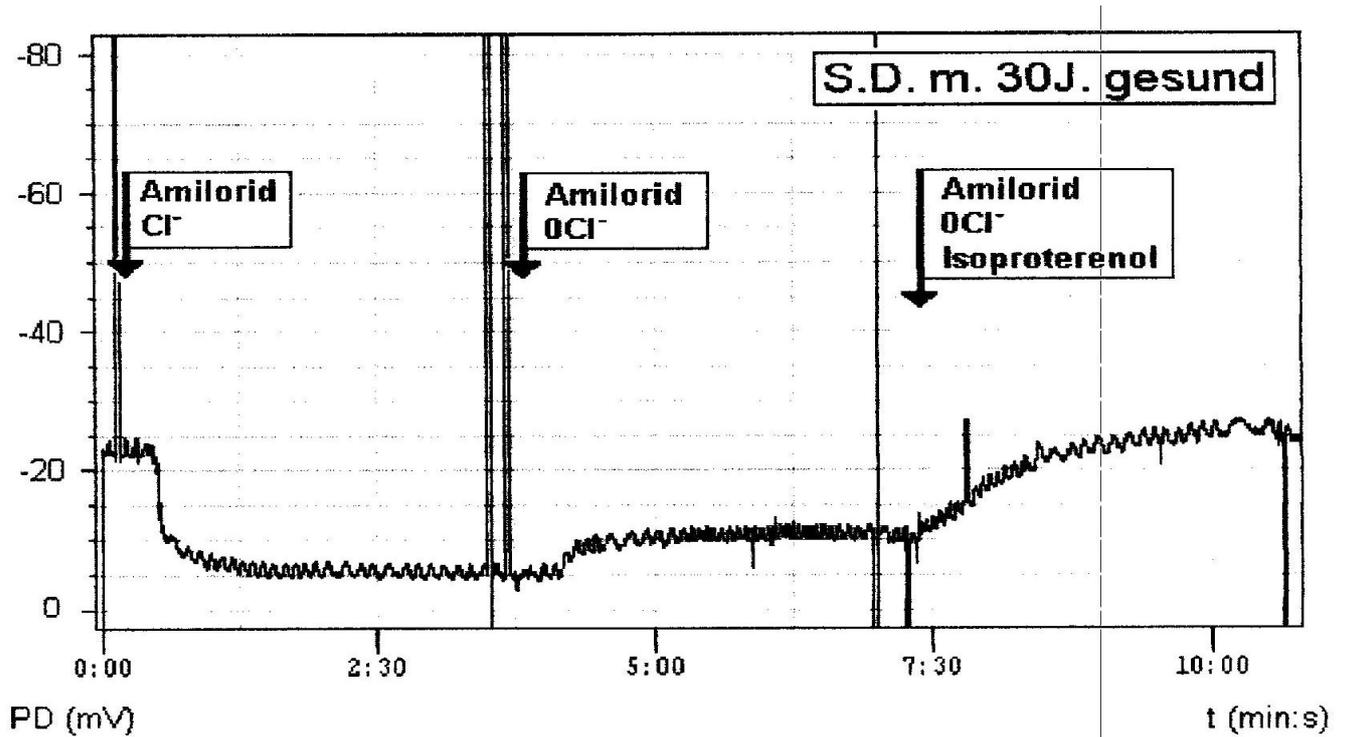


Abbildung 3.10: Potenzialdifferenzmessung (PD) nach konventioneller Methode mit chloridfreier Lösung bei einem 30 Jahre alten Probanden (Dauer: ca. 11 min bis zum Erreichen des PD-Niveaus unter Isoproterenol)

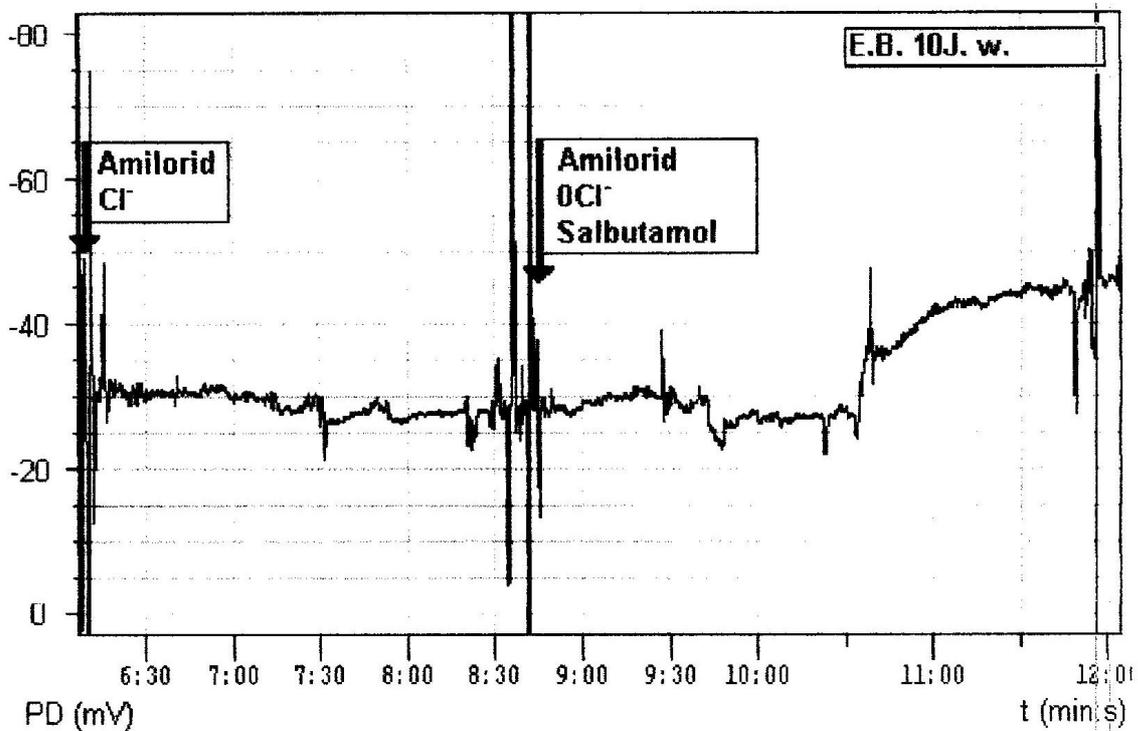


Abbildung 3.11: PD-Messung bei einem 10-jährigen gesunden Mädchen bei Auslassen der Gabe einer chloridfreien Lösung (Dauer 5 1/2 min bis zum Erreichen des PD-Niveaus unter Salbutamol)

Die Auswertung nach Bland und Altman unterstreicht - vor allem für CF-Patienten - die Gleichwertigkeit beider Methoden (Abb. 3.12). Die Wertepaare der verkürzten und der konventionellen Methode liegen ungefähr im gleichen Bereich. Lediglich bei drei Messungen an gesunden Probanden kommt es zu einer Streuung über den 2s-Bereich hinaus.

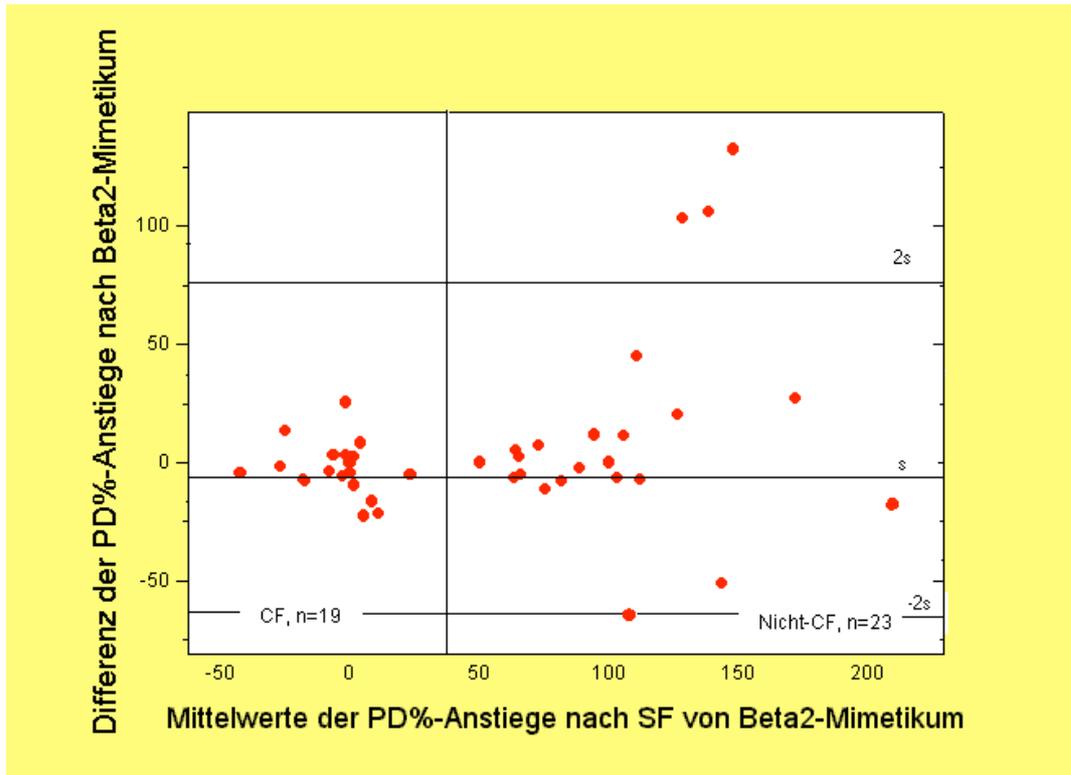


Abbildung 3.12: Prozentualer PD-Anstieg: Vergleich der verkürzten und konventionellen Methode nach Superfusion eines Beta-2-Mimetikums (nach Bland und Altman).

Der klinisch relevante Anstieg der Potenzialdifferenz bei CF-Patienten (>15 %) wurde mit beiden Messmethoden erfasst.

Die Boxplot-Diagramme veranschaulichen die gute Übereinstimmung der Ergebnisse, die mit der verkürzten und der konventionellen Messmethode ermittelt wurden. Auch die klare Trennung zwischen Kollektiven ohne und mit CF aufgrund der unterschiedlichen Chloridsekretion nach Applikation eines Beta-Mimetikums ist gut dokumentiert (Abb. 3.13).

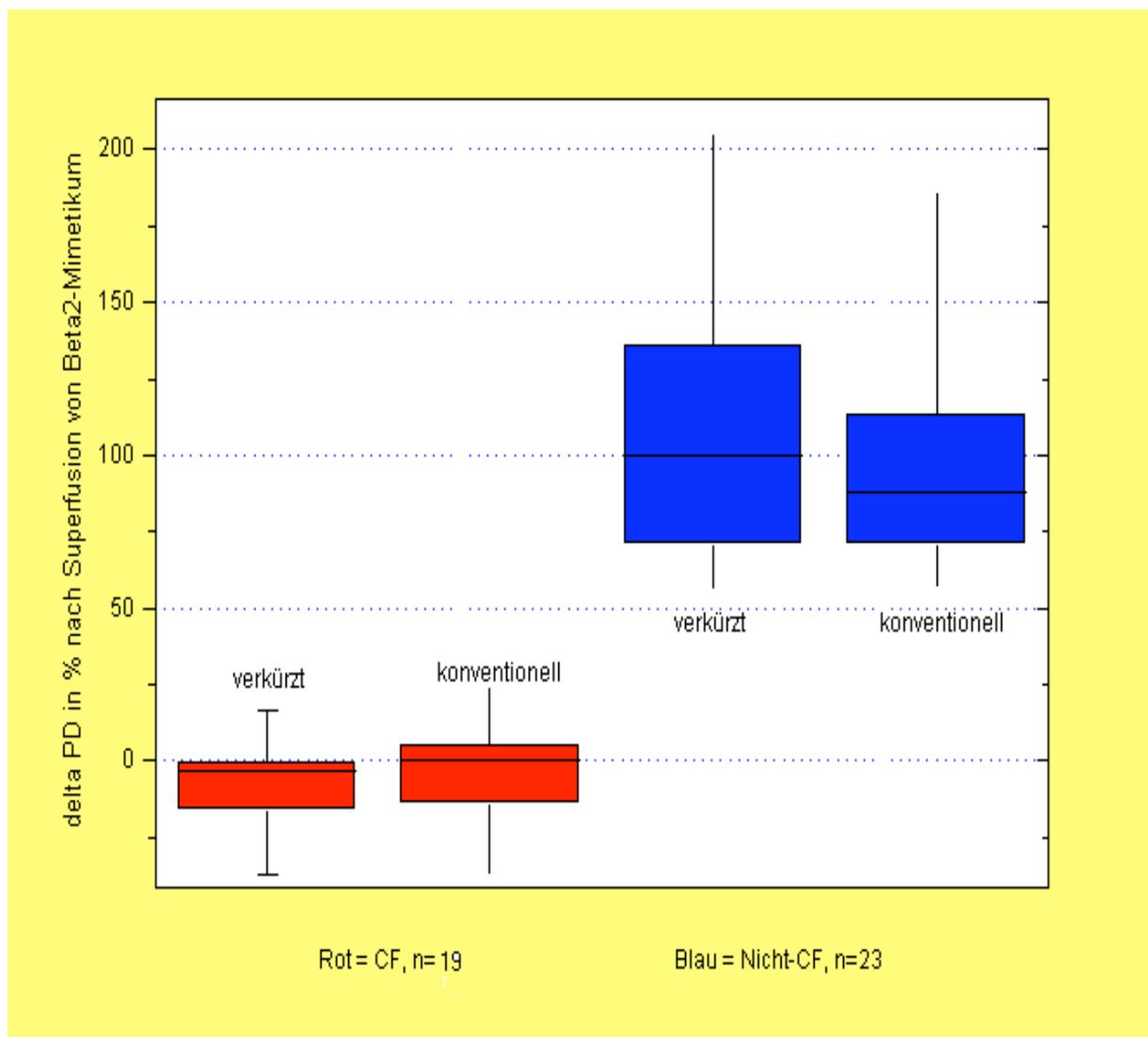


Abbildung 3.13: PD-Anstieg unter verkürzter Applikationsdauer im Vergleich mit der konventionellen Methode nach einem Beta-Mimetikum bei 19-Probanden mit und 23 ohne CF (s. auch Legende zu Abb. 3.4).

3.6 Rektale Potenzialdifferenzmessung

3.6.1 Basalwerte an der Rektumschleimhaut

Die basalen PD-Werte der rektalen Potenzialdifferenzmessung wurden bei 56 gesunden Probanden und bei 12 CF-Patienten erhoben (Abb. 3.14). Zur Kontrolle der Konstanz des Messverfahrens wurden zeitnah an 45 gesunden Probanden und 17 CF-Patienten nasale Messungen durchgeführt (Tab. 3.10).

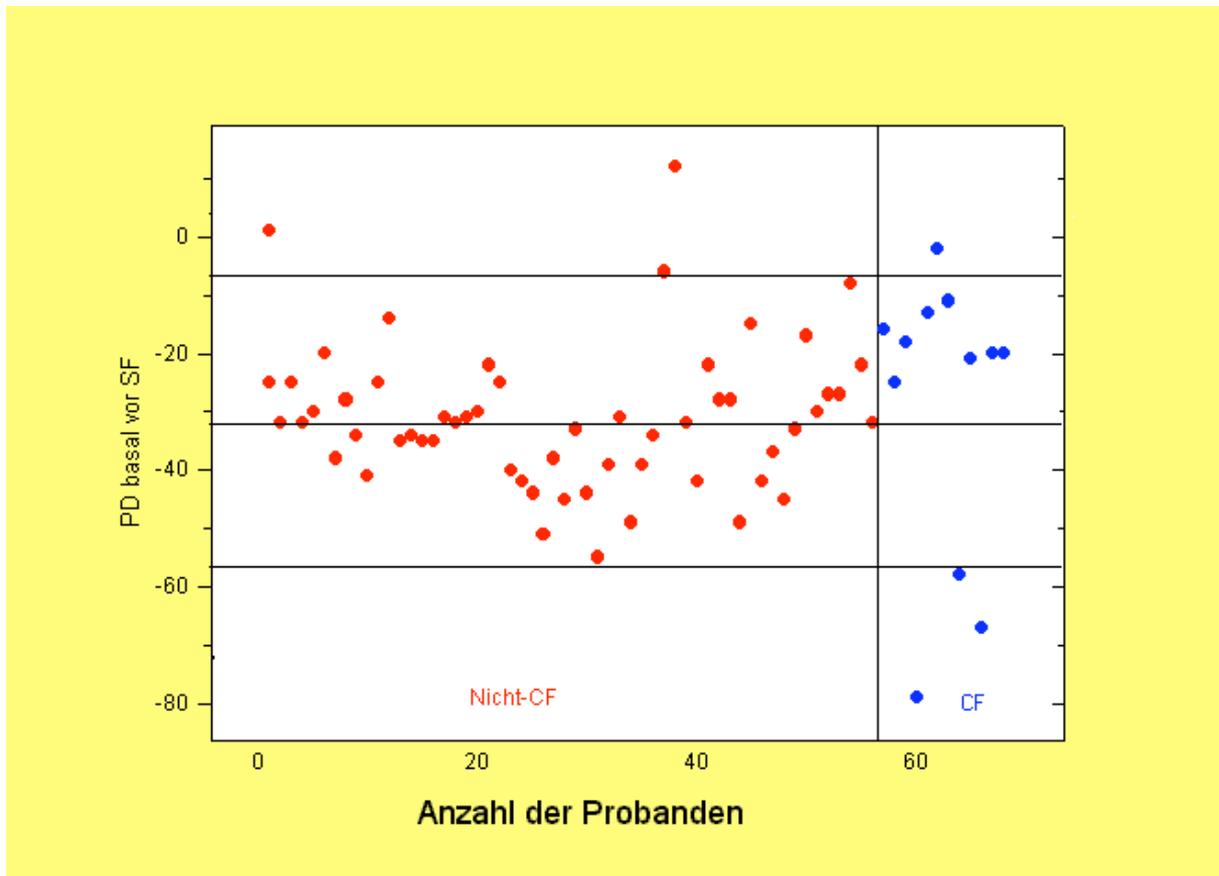


Abbildung 3.14: Basalwerte der rektalen Potenzialdifferenzmessung (in mV) bei 56 Probanden ohne CF und 12 CF-Patienten.

Der Median der rektalen PD fiel bei zeitnah untersuchten Gesunden mit -32,0 mV geringfügig höher aus als derjenige der nasal bei gesunden Probanden gemessenen Werte (Tab. 3.10). Ein statistisch signifikanter Unterschied war nicht nachweisbar ($p = 0,08$).

Der Median der rektalen PD bei CF-Patienten lag zwar niedriger (-20,0 mV). Bei beiden Messverfahren war die Spannbreite der PD-Werte jedoch sehr groß und der Überlappungsbereich beträchtlich, so dass ebenfalls kein statistischer Unterschied resultierte ($p = 0,61$).

Tabelle 3.10: Deskriptive Statistik: Basalwerte der rektalen und nasalen PD bei gesunden Probanden und CF-Patienten.

	Basalwerte, Rektale PD, Gesund	Basalwerte, Rektale PD, CF	Basalwerte, Nasale PD, Gesund	Basalwerte, Nasale PD, CF
n	56	12	45	17
Arithmetischer Mittelwert	-31,6 mV	-29,2 mV	-28,0 mV	-44,8 mV
Median	-32,0 mV	-20,0 mV	-27,0 mV	-46,0 mV
Standardabweichung,	11,7 mV	24,5 mV	8,2 mV	11,3 mV
Minimum	-55,0 mV	-79,0 mV	-44,0 mV	-62,0 mV
Maximum	12,0 mV	-2,0 mV	-14,0 mV	-12,0 mV

3.6.2 Applikation von Amilorid an der Rektalschleimhaut

Nach Bestimmung der Ausgangswerte der PD wurden mit den gleichen Kollektiven rektale Messungen unter Amilorid-Superfusion durchgeführt (Abb. 3.15).

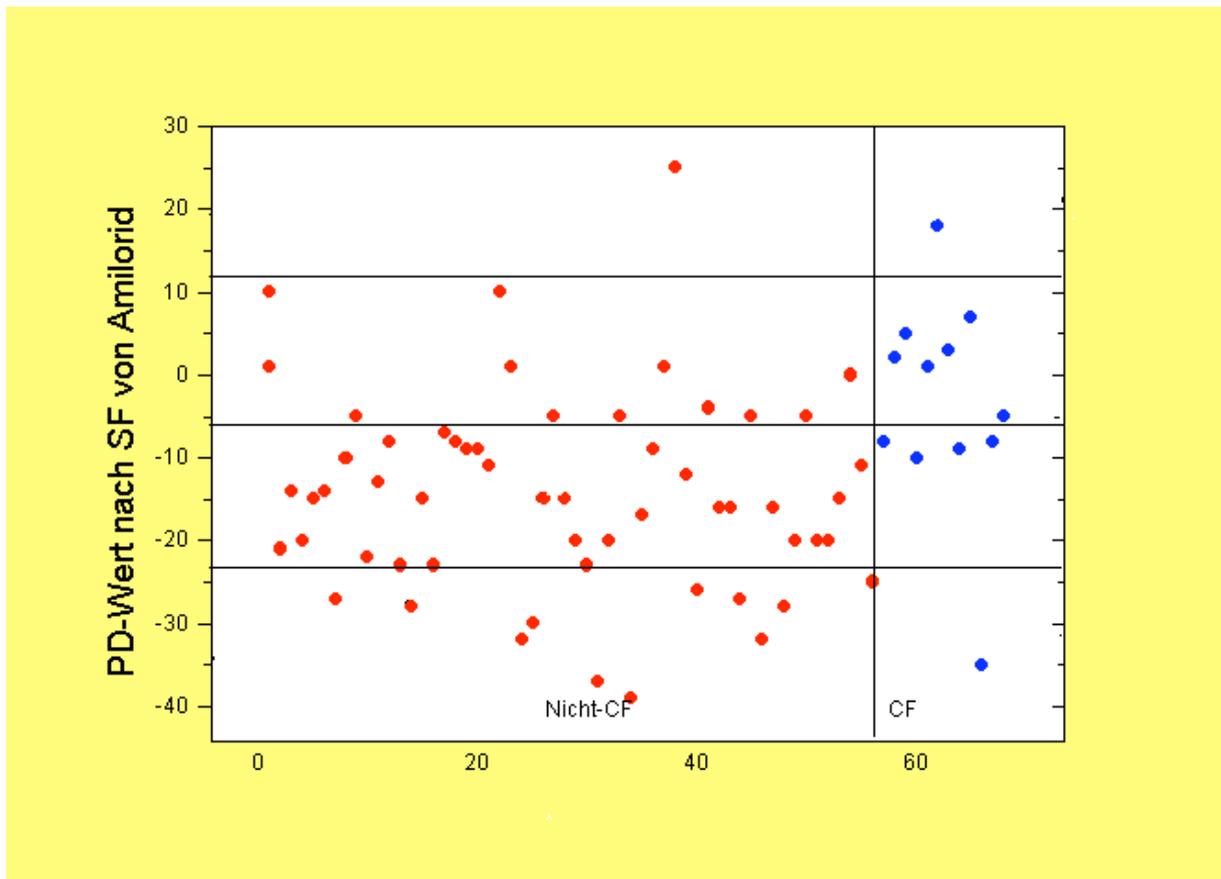


Abbildung 3.15: Absolute rektale PD-Messwerte (mV) nach Applikation von Amilorid bei 56 Probanden ohne CF (links) und 12 CF-Patienten (rechts).

Der mediane Abfall der PD bei gesunden Probanden betrug 13,5% des Ausgangswertes, bei CF-Patienten 97,5% (Tab. 3.11; Anhang Tab. 7.2).

Die Überlappung der Minimum-Maximum-Werte der CF-Patienten mit denjenigen der Probanden ohne CF (47,8 – 180 % bzw. 17,7 – 140 %) zeigt jedoch, dass sich der PD-Abfall unter Amilorid bei rektaler Messung ebenso wenig für die CF-Diagnostik eignet wie bei nasaler Messung (vgl. Kap. 3.2).

Tabelle 3.11: Deskriptive Statistik der rektalen PD-Messung nach lokaler Superfusion von Amilorid bei 12 CF-Patienten und 56 Probanden ohne CF

	Abfall nach SF von Amilorid, CF	Abfall nach SF von Amilorid, Gesund
n	12	56
Arithmetischer Mittelwert	99,1 %	56,6 %
Median	97,5 %	13,5 %
Standardabweichung	39,3 %	8,5 %
Minimum	47,8 %	17,7 %
Maximum	180,0 %	140,0 %

3.6.3 Rektale PD-Messung unter Superfusion von Salbutamol

Im Anschluss an die Applikation von Amilorid wurde Salbutamol den gleichen Kollektiven appliziert, wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, und die rektale PD bestimmt (Abb. 3.16, Anhang Tab. 7.3).

Der mediane Anstieg der PD bei gesunden Probanden nach Salbutamol betrug 90,5%, bei CF-Patienten 0,0% (Tab. 3.12). Der Unterschied war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Eine Überlappung war im Boxplot-Diagramm nicht zu beobachten (Abb. 3.17). Die Trennschärfe entsprach annähernd derjenigen, die bei der nasalen Messung zu beobachten war (vgl. Tab. 3.7).

Tabelle 3.12: Rektale PD nach Superfusion eines Beta-Mimetikums (Salbutamol in chloridfreier Lösung)

	Anstieg nach SF von Salbutamol, Nicht-CF	Anstieg nach SF von Salbutamol, CF
n	56	12
Arithmetischer Mittelwert	101,1 %	-1,7 %
Median	90,5 %	0,0 %
Standardabweichung	41,0 %	18,7 %
Minimum	45,8 %	-37,5 %
Maximum	300,0 %	26,7 %

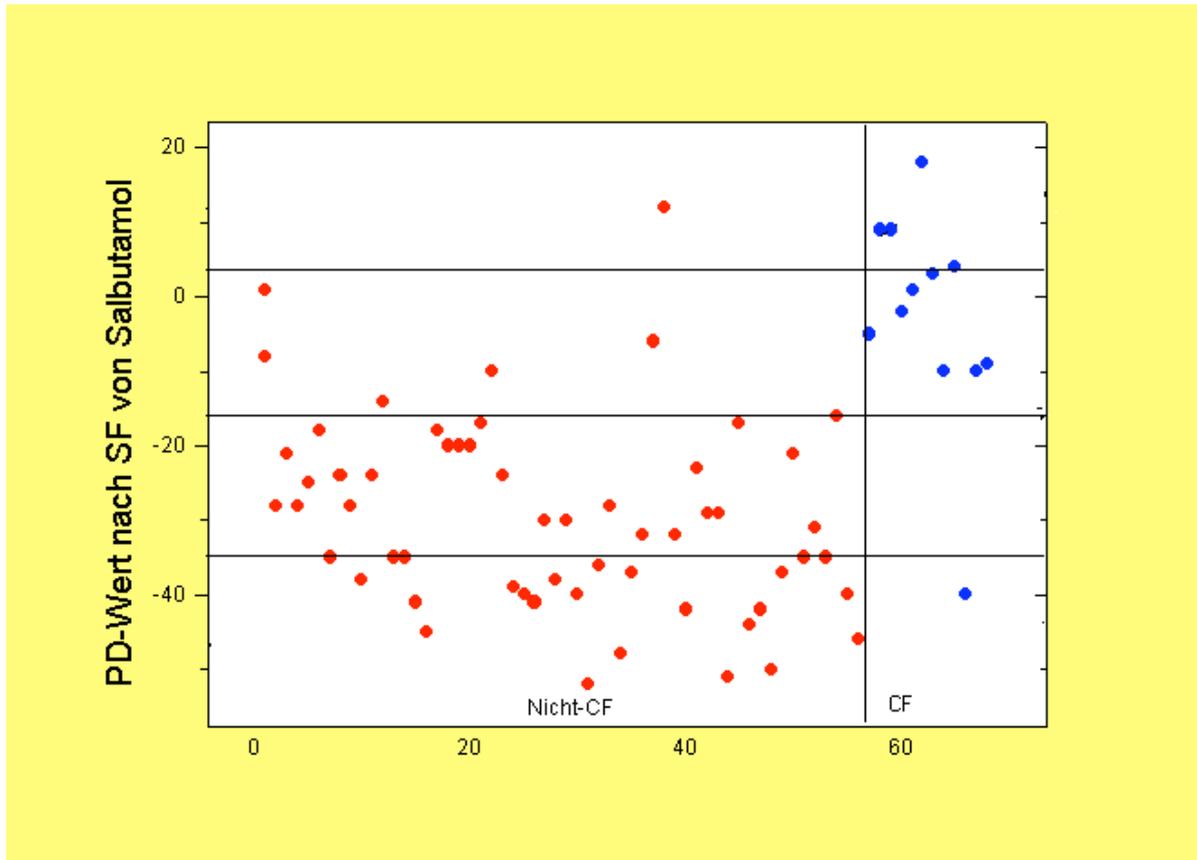


Abbildung 3.16: Absolute rektale PD-Werte (in mV) bei 56 Probanden ohne CF (links) und 12 CF-Patienten (rechts) nach Superfusion von Salbutamol

Folglich ist eine Trennung zwischen einer Chloridtransportstörung (bei den meisten CF-Patienten) und einer regelrechten Chloridsekretion (bei Probanden ohne CF) möglich.

Bei **einem CF-Patienten** war eine Restfunktion der CFTR-abhängigen Chloridkanäle nachweisbar, so dass sich ein deutlicher PD-Anstieg nach Applikation von Salbutamol dokumentieren ließ. Andererseits fehlte bei **einem Probanden ohne CF** der erwartete PD-Anstieg. Man muss demnach Einflussfaktoren vermuten, die das Ergebnis bei rektaler PD-Messung beeinträchtigen.

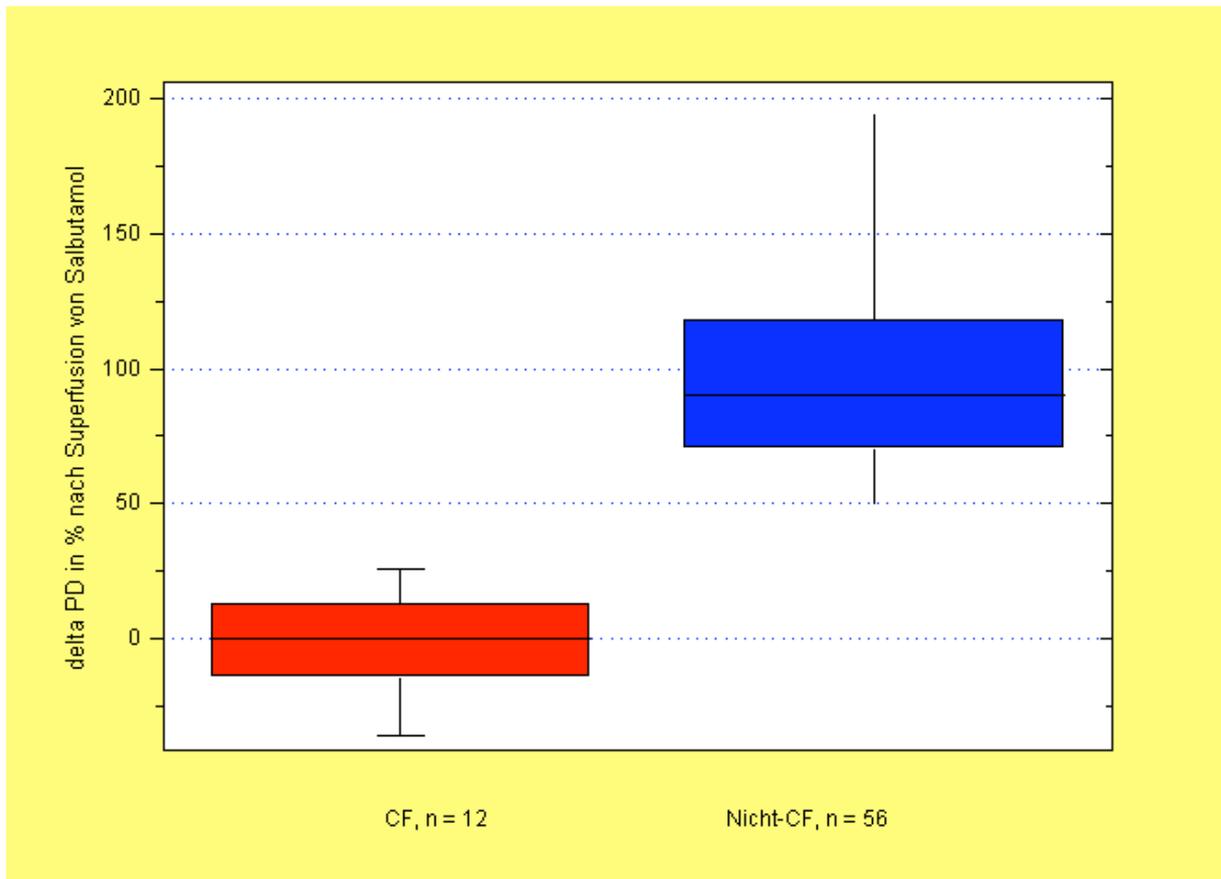


Abbildung 3.17: Boxplot-Diagramme zur rektalen Potenzialdifferenzmessung bei 12 CF-Patienten und 56 Probanden ohne CF nach Superfusion des Beta-2-Mimetikums Salbutamol (s. auch Legende zu Abb. 3.4).

Dies wird abschließend durch die direkte Gegenüberstellung der kontinuierlich registrierten Aufzeichnung bei der rektalen Messung der PD bei einem Probanden ohne CF und einem CF-Patienten veranschaulicht (Abb. 3.18): Die *blaue* Messkurve stellt den Verlauf der Spannung während einer rektalen PD-Messung unter Applikation von Amilorid und Salbutamol bei einem 20 Monate alten **gesunden** Kleinkind dar. Ausgehend von einem Basalwert von -39,0 mV fällt die PD nach rektaler Applikation von Amilorid auf einen Wert von -17,0 mV ab (56,4%). Nach Superfusion von Salbutamol erreicht die PD mit -37,0 mV knapp den Ausgangswert (Wiederanstieg um 90%).

Die *rote* Messkurve repräsentiert den Kurvenverlauf während rektaler PD-Messung bei einem **CF-kranken** 8 Monate alten Säugling: Der Ausgangswert beträgt -58,0 mV

und fällt nach Amilorid-Applikation um 84,5% auf einen Wert von -9,0 mV ab. Unter Superfusion von Salbutamol erfolgt ein geringer PD-Anstieg auf -10,0 mV (+2,0%).

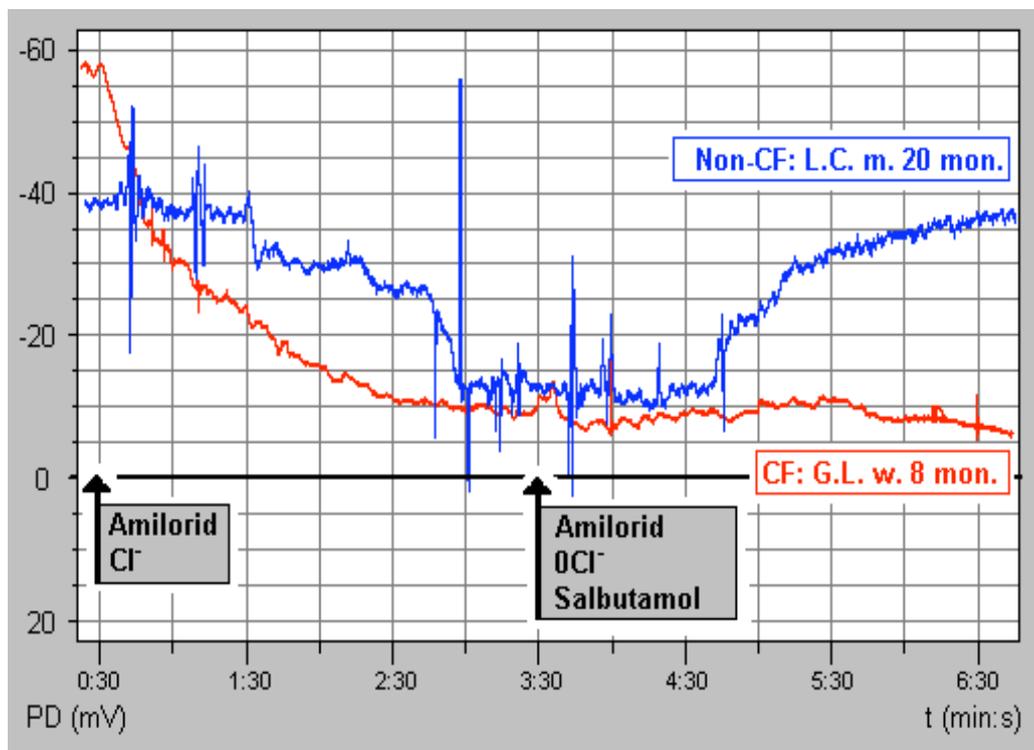


Abbildung 3.18: Messkurven transepithelialer Spannung während rektaler PD-Messung unter Superfusion von Amilorid und Salbutamol (in chloridfreier Lösung) bei einem gesunden Kleinkind (blau) und einem Säugling mit gesicherter Mukoviszidose (rot). Einzelheiten im Text.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Informationen zur transepithelialen Potenzialdifferenzmessung

Die von *Knowles et al.* eingeführte Methode der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung am respiratorischen Epithel [58] ist für die Grundlagenforschung unentbehrlich geworden. Darüber hinaus ist sie - neben der kostspieligen Option der vollständigen Genanalyse - in Zweifelsfällen zu einem wichtigen Instrument der Mukoviszidose-Diagnostik avanciert [77].

Der komplizierte Aufbau der Messvorrichtung, die von Boucher entwickelt wurde [15, 20], gilt trotz der großen Störanfälligkeit bislang als Standard [15]. Im klinischen Alltag hat er sich jedoch als zeitlich zu aufwändig und belastend für Untersucher und Probanden herausgestellt. Modifikationen, die Vereinfachungen der Messmethode zum Ziel hatten, sind daher seit Längerem postuliert worden [41, 103, 104, 105, 110]. Die vorliegende Arbeit sollte dazu einen Beitrag leisten.

4.2 Reproduzierbarkeit der Basiswerte der transepithelialen Potenzialdifferenzmessung

Zur Beurteilung der kurzfristigen Reproduzierbarkeit basaler Potenzialdifferenz(PD)-Werte wurden zunächst bei Probanden ohne und mit CF im Abstand von ca. 10 min jeweils zwei Messungen der basalen PD-Werte durchgeführt.

Dabei fand sich bei Gesunden eine mittlere Variabilität der basalen PD-Werte von $11,6 \pm 10,3 \%$. Bei CF-Patienten lag sie mit $17,7 \pm 31,0 \%$ etwas höher. Die Korrelation zwischen den beiden Messungen war jeweils gleich ($r = 0,49$; $p < 0,05$).

Die Mediane der absoluten Werte (1. Messung: $-46,0$ mV; 2. Messung $-41,0$ mV) fielen bei CF-Patienten erwartungsgemäß höher aus als bei den gesunden Probanden ($-26,0$ bzw. $-24,0$ mV), wobei ein Überlappungsbereich der Einzelwerte zwischen gesunden Probanden ($-15,0$ bis $-42,0$ mV) und CF-Patienten ($-26,0$ bis $-68,5$ mV) deutlich wurde, wie er auch aus der Literatur bekannt ist [15, 48, 59]. In der Mukoviszidose-Diagnostik wird die ausschließliche Bestimmung der basalen PD-Werte daher nicht als sehr hilfreich angesehen [115].

4.3 Einfluss von Amilorid in chloridhaltigem Puffer auf die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass das Absinken der PD-Werte nach Amilorid in chloridhaltigem Puffer zu einem sehr ähnlichen Spannungsniveau bei gesunden Probanden und bei CF-Patienten führt [1, 41, 81]. Daher wurde auf eine detaillierte Darstellung dieses Sachverhaltes verzichtet und das Augenmerk auf das prozentuale Absinken nach Superfusion von Amilorid-Lösung gerichtet. Um der Aussagekraft der Ergebnisse mehr Gewicht zu verleihen, wurden bei dieser Studie größere Kollektive rekrutiert als bisher gebräuchlich (CF-Patienten: n= 132; Gesunde: n = 150; Tab. 3.5)). In der Tat war ein statistisch signifikanter Unterschied zu beobachten. Die Überlappung der Werte für Gesunde und CF-Patienten war jedoch beträchtlich (Abb. 3.4). Ein diagnostischer Fortschritt ließ sich daraus nicht ableiten. Damit bestätigte sich das Ergebnis anderer Arbeitsgruppen [41, 79, 81].

Das schmälert die Bedeutung der Testung mit chloridhaltiger Amiloridlösung im Rahmen der klinischen Forschung nicht: Die Inhibition der Natriumkanäle mit Hilfe von Amilorid ist die Voraussetzung für die Prüfung weiterer Substanzen (s.u.) [109].

Von einigen Arbeitsgruppen wird Amilorid therapeutisch genutzt. Dies basiert auf der Vorstellung, dass durch die Blockade des Natriumkanals der Natriumgehalt im Lumen steigt und dadurch eine Wasserretention erfolgt. Die Konsistenz des Bronchialsekretes verliert an Viskosität und der Schleim ist für die Patienten besser abhustbar, die mukoziliäre Clearance wird verbessert [8, 56, 65, 73, 74, 80, 85]. Außerdem bewirkt Amilorid eine erhöhte Zilienschlagfrequenz am Flimmerepithel und einen antimikrobiellen Effekt [13, 30], der aktuell im Zusammenhang mit *Burholderia*-Infektionen wieder diskutiert wird [16, 28, 29, 73]. Vor allem die zu kurze Wirkdauer und die geringen klinischen Auswirkungen sind dafür verantwortlich, dass sich der präventive Einsatz bislang nicht durchgesetzt hat [24].

4.4 Stellenwert des Zusatzes chloridfreier Pufferlösung (Natrium-Glukonat)

Die Stimulation CFTR-unabhängiger Chloridkanäle mit Natriumglukonat schien eine Möglichkeit zu sein, eine höhere diagnostische Sicherheit zu erzielen. Die Auswertung der Resultate wurde auf die prozentualen Änderungen der PD (bezogen auf das PD-Niveau nach Amilorid-Lösung in chloridhaltigem Puffer) beschränkt, da bezüglich der Absolutwerte bereits gesicherte Erkenntnisse vorlagen [41].

Die gesunden Probanden reagierten mit einem hoch signifikanten Anstieg der Potenzialdifferenz im Vergleich zu den CF-Patienten (Median: 28,6 % bzw. -3,1 %; $p = 1,5 \times 10^{-6}$). Bei letzteren war meistens sogar ein weiteres Absinken der PD nach Natriumglukonat zu beobachten. Angesichts der erheblichen Überlappungen zwischen Probanden ohne und mit CF (Tab. 3.6, Abb. 3.6) ist die geringe diagnostische Aussagekraft des Tests offenkundig.

Im Rahmen der klinischen Forschung bleibt die Frage von Interesse, in welchem Umfang bei Gesunden bzw. CF-Patienten die CFTR-unabhängigen Kanäle auf eine Stimulation durch chloridfreie Lösung reagieren: Legt man einen "cut-off" bei einer prozentualen Zunahme von > 20% zugrunde [115], so waren bei gesunden Probanden 58 %, bei CF-Patienten = 8,3 % „Responder“ zu verzeichnen. Der individuellen Reaktionsfähigkeit entsprechend wäre es mittelfristig sinnvoll, diese Testung bei jedem CF-Patienten durchzuführen, sobald therapeutische Optionen zur Verfügung stehen, wie sich dies bereits andeutet [79, 130].

Für die Routine-Diagnostik erschien die Testung der alternativen Chloridkanäle nach den vorgelegten Daten allerdings entbehrlich.

Die weiteren Bemühungen galten daher dem Ziel, die Dauer der diagnostischen PD-Messung dadurch zu verkürzen, dass auf den Einsatz chloridfreier Lösung in einer gesonderten Testung verzichtet wurde. Dass dieses Vorhaben Aussichten auf Erfolg haben könnte, wurde u.a. durch die Verlaufsbeobachtung der gegen die Zeit aufgetragenen PD-Werte während der Superfusion der verschiedenen Pharmaka nahegelegt (Abb. 3.10, Abb. 3.11).

An Probanden ohne und mit CF-Patienten wurden sowohl mit der konventionellen Vorgehensweise als auch nach Verzicht auf gesonderte Testung mit Natriumglukonat PD-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse im Hinblick auf die Repolarisation

durch ein Beta-2-Mimetikum stimmten weitgehend überein (bei Probanden ohne CF: 100,0 bzw. 88,2 %; CF-Patienten: -3,3 bzw. 0,0 %).

Die Änderung der prozentualen PD-Werte mit und ohne gesonderte Superfusion chloridfreier Lösung korrelierte gut ($r = 0,87$; $p < 0,001$). Die Korrelation war derjenigen vergleichbar, die sich bei den Doppelmessungen fand, die zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Basalwerte vorgenommen wurden ($r = 0,79$; vgl. Abb. 3.3).

Auch der Vergleich der Boxplot-Diagramme von CF-Patienten und Probanden ohne CF war überzeugend (Abb. 3.13).

Die diagnostische Sicherheit der PD-Messung wird demnach durch die Verkürzung des Tests nicht beeinträchtigt. Auf diese Weise lassen sich 4 - 5 min bei der PD-Messung einsparen. Das Messverfahren, das bisher nur für ältere Schulkinder und Jugendliche geeignet war [109], ist künftig auch bei jüngeren Kinder im Alter von etwa 5 Jahren an leichter anwendbar, sofern sie den milden Reiz der Messsonde an der Nasenschleimhaut tolerieren.

Vergleichbare Studien anderer Arbeitsgruppen zur Klärung dieser Frage liegen nicht vor.

4.5 Stimulation der CFTR-abhängigen Chloridkanäle mit Isoproterenol und Salbutamol

Eine beträchtliche organisatorische Hürde der ursprünglichen Methode der Potenzialdifferenzmessung mit Superfusion stellt die Verwendung von Isoproterenol dar, das üblicherweise zur Stimulation der CFTR-abhängigen Chloridkanäle eingesetzt wird [1, 58]. Der Einsatz dieses β -Mimetikums ist in Deutschland für die in-vivo-Anwendung nicht zulässig und muss für jede Studie von der lokalen Ethikkommission genehmigt werden. Die Verfügbarkeit eines in der Stimulation der CFTR-abhängigen Chloridkanäle gleichwertigen, auch in Deutschland zugelassenen Adrenergikums, würde eine wesentliche Erleichterung bedeuten.

Salbutamol, ein weltweit für die Asthmatherapie zugelassenes und nebenwirkungsärmeres Beta-2-Mimetikum, erschien als Alternative prädestiniert [67].

Zum Nachweis der Wirkungsäquivalenz bezüglich der Aktivierung des Chloridtransportes wurden Vergleichsmessungen mit Isoproterenol und Salbutamol durchgeführt, deren Resultate überzeugend waren:

Der Median des prozentualen Wiederanstieges der PD bezogen auf das Amilorid-Niveau lag bei Gesunden nach Superfusion von Salbutamol mit 100,0 % geringfügig über den Werten, die nach Isoproterenol zu erheben waren (90,5 %).

Auch bei CF-Patienten war der Median annähernd gleich (unter Salbutamol: -4,2 %, unter Isoproterenol: 0,0 %). Beim direkten Vergleich der beiden Beta-Sympathomimetika ließ sich eine gute Übereinstimmung des prozentualen Wiederanstieges der PD dokumentieren ($r = 0,86$; $p < 0,01$). Sie lag im Bereich der Kurzzeit-Reproduzierbarkeit der Basalwerte ($r = 0,79$). Auch der Vergleich der Differenzen der Wertepaare nach Bland und Altman bestätigte eine weitgehende Übereinstimmung der Wirkung der beiden Adrenergika (Abb. 3.7).

Die Boxplotdiagramme (Abb. 3.8) wiesen keinen Überlappungsbereich zwischen den Probanden ohne CF mit regelrechter Chloridsekretion und den CF-Patienten mit gestörtem Chloridtransport auf, so dass die diagnostische Sicherheit mit Salbutamol ebenso wie mit Isoproterenol gewährleistet ist.

Salbutamol kann somit bei der Durchführung von PD-Messungen problemlos zur Testung eingesetzt werden und ist als vollwertiger Ersatz von Isoproterenol anzusehen [102, 104]. Damit ist eine wesentliche organisatorische Entlastung bei der PD-Diagnostik verbunden.

Nach neusten Erkenntnissen kommen auch Anticholinergika als Alternative für Isoproterenol in Frage [107].

Mittelfristig könnte sich der therapeutische Aspekt ebenfalls als klinisch relevant erweisen: Bei Patienten, bei denen der Nachweis einer Restfunktion der CFTR-abhängigen Chloridkanäle gelingt, wäre nach diesen Erkenntnissen der präventive Einsatz zugelassener und gut verträglicher Beta-2-Sympathomimetika problemlos realisierbar [53, 75]. Bei kontinuierlichem Einsatz wären angesichts der großen therapeutischen Breite der Anticholinergika langwirkende Substanzen wie Tiotropium besonders vorteilhaft [124].

4.6 PD-Messung an der Rektumschleimhaut

Bislang wurde die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung in der beschriebenen Form überwiegend an der Nasalschleimhaut durchgeführt [57]. Sie ist bei Kindern in der Regel erst ab ca. 6 Jahren durchführbar, da sie – auch bei zeitlicher Verkürzung - zu hohe Anforderungen an die Kooperation der Kinder stellt [41, 119]. Prinzipiell ist es möglich, die nasale PD-Messung auch bei Säuglingen durchzuführen [110, 118]. Die zeitlich aufwändige Superfusionsmethode würde jedoch in der Regel eine starke Sedierung erfordern. Diese wäre zwar zu rechtfertigen, wenn nach Schweißanalyse und Gendiagnostik diagnostische Unsicherheiten bleiben [1]. Das für die PD-Messungen geeignete Areal der Nasenschleimhaut ist aber bei Säuglingen so klein, dass es - wie eigene Pilotuntersuchungen zeigten - nicht immer gelingt, dieses aufzufinden. Darüber hinaus ist es selbst unter Schlafbedingungen bei Säuglingen schwierig, die Positionierung der Messelektrode während der Superfusion der Medikamente und zur Messung der PD über mehrere Minuten punktgenau beizubehalten, da sich Säuglinge auch im Schlaf bewegen. Ferner muss unter Sedierungsbedingungen eine erhöhte Aspirationsgefahr in Rechnung gestellt werden.

Diesen Schwierigkeiten geht man mit der PD-Messung an der Rektumschleimhaut aus dem Wege. Sie konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals etabliert werden.

Voraussetzung war, dass der transepitheliale Salztransport in gleicher Weise funktioniert wie am respiratorischen Epithel. Da PD-Messungen bereits seit einiger Zeit erfolgreich in vitro am Darmbiopsat praktiziert werden [10, 71, 83, 120], konnte davon ausgegangen werden, dass diese Vorbedingung erfüllt war.

Die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen die Erwartungen: Zwar lagen die rektalen Ausgangswerte sowohl bei den CF-Patienten als auch bei gesunden Probanden etwas niedriger als die zeitnah erhobenen nasalen PD-Werte (Tab. 3.14). Ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht ermitteln. Dies traf auch für die Reaktion der PD auf Amilorid zu.

Ausschlaggebendes Kriterium für die Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit der rektalen PD-Messung ist die Repolarisation nach Superfusion eines Beta-Adrenergikums. Bei den meisten gesunden Probanden zeigte sich sowohl nasal als auch rektal der postulierte Wiederanstieg der PD-Werte von mindestens 50%. Bei

einem Probanden fiel der PD-Anstieg mit 45,8 % zu niedrig aus (Tab. 3.12). Hierfür könnte eine milde Entzündung des Darmepithels verantwortlich gemacht werden [63, 80, 84], die bei makroskopischer Betrachtung übersehen werden kann. Bei den CF-Patienten gab es andererseits mit einer Zunahme der PD um 26,7 % einen erhöhten PD-Anstieg, der auf eine Restaktivität der CFTR-abhängiger Chloridkanäle schließen ließ.

Nur **ein** CF-Patient, stellte sich sowohl für die nasale als auch die rektale Messung zur Verfügung. Hier fehlte erwartungsgemäß die positive Reaktion auf das β -Sympathomimetikum.

Damit ließ sich nachweisen, dass die Aktivierung CFTR-abhängiger Chloridkanäle durch Salbutamol auch bei der rektalen Messung gewährleistet war und die diagnostische Sicherheit bei der Abgrenzung der Probanden ohne und mit CF gewahrt war.

Bei den beobachteten Divergenzen zwischen den Ergebnissen rektaler und nasaler PD-Messung dürften vor allem die unterschiedlichen Epithelien eine Rolle spielen. Während sich unter der Concha nasalis inferior respiratorisches Epithel, also Flimmerepithel findet, ist das Rektum cranial mit Schleimhaut und caudal mit dem Anoderm, also einem Plattenepithel ohne Hautanhangsgebilde, ausgestattet. Insgesamt sind die Epithelien aber nach einem einheitlichen Struktur- und Funktionsprinzip aufgebaut, so dass die Durchführung der PD-Messung an beiden Epithelien grundsätzlich möglich ist [101].

Bemühungen anderer Arbeitsgruppen, am Darmepithel Messungen in vivo am Menschen durchzuführen, waren bisher fehlgeschlagen [85, 116]. Lediglich bei Mäusen gab es erste erfolgreiche Messungen, die aber nicht weiter verfolgt wurden [129].

Auf eine Sedierung kann bei der rektalen Messung bei neugeborenen Säuglingen oft verzichtet werden. Falls sie sich als notwendig erweist, ist sie – wie die Ableitung eines EEGs bei Säuglingen – aus diagnostischen Gründen gerechtfertigt, zumal man sich mit einer milden Dosis begnügen kann. Ein besonderer Vorteil der rektalen PD-Messung liegt darin, dass ein Aspirationsrisiko entfällt.

Allerdings ist ein vorheriges Abführen des Darminhalts obligatorisch. Ferner sollte gewährleistet sein, dass der Darm nicht entzündet ist [63, 80, 84]. Andernfalls muss mit einem unzureichenden PD-Anstieg nach Applikation eines β -Sympathomimetikums gerechnet werden, wie er bei einem gesunden Probanden zu beobachten war.

4.7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Es lässt sich folgendes Resümee ziehen:

Die angestrebten Modifikationen der PD-Messung mittels Superfusion wurden erfolgreich realisiert. Es ließ sich zeigen, dass das international für die Asthmatherapie zugelassene Salbutamol gut für die Stimulation der CFTR-abhängigen Chloridkanäle geeignet ist und bei der PD-Messung künftig anstelle des sonst üblichen Isoproterenols ohne Einbuße an diagnostischer Sicherheit eingesetzt werden kann. Auch der Verzicht auf eine gesonderte Testung der alternativen Chloridkanäle mittels chloridfreier Lösung war ohne Beeinträchtigung der klinischen Diagnostik möglich.

Damit wurde eine bedeutsame organisatorische Erleichterung und eine spürbare zeitliche Entlastung bei der klinischen Diagnostik realisiert, die vor allem bei Kindern im Vorschulalter hilfreich ist.

Der wichtigste Schritt war die Etablierung der rektalen PD-Messung, die erstmals die Durchführung der differenzierten PD-Messung in Verbindung mit der Superfusion der verschiedenen Pharmaka im Säuglingsalter ermöglicht. Der noch ausstehende direkte Vergleich der nasalen und der rektalen Messung bei denselben Probanden ist inzwischen gelungen [106], so dass eine letzte Unsicherheit aus dem Weg geräumt ist. Auch im klinischen Alltag hat sich die rektale PD-Messung bei Säuglingen inzwischen bewährt [105].

Sensitivität und Spezifität müssen allerdings noch genauer als bisher bestimmt werden. Dazu wäre es wichtig, Ergebnisse der rektalen PD-Messung mit denjenigen zu vergleichen, die in-vitro mit der bereits bewährten Kurzschlussstrommessung am Darmbiopsat ermittelt werden [10, 71, 83, 120]. Die Vorbereitungen zu dieser sehr aufwändigen Studie sind zur Zeit im Gange.

Trotz aller Verbesserungen haben sich die Hoffnungen, der PD-Messung den Weg

für eine breitere Anwendung zu ebnet, bisher nicht erfüllt, da nur wenige Arbeitsgruppen in der Lage sind, kontinuierlich das Personal für diese spezielle Diagnostik vorzuhalten. Modifikationen, die mit weiterer wesentlicher Vereinfachung einhergehen, sind daher dringend zu postulieren.

Angesichts der eingangs beschriebenen Fortschritte in der Mukoviszidose-Therapie ist eine frühzeitige Diagnosestellung zur weiteren Verbesserung der Prognose von großer Bedeutung [77]. Von besonderem Interesse im Hinblick auf die Prognose ist die Klärung der Frage, welche Patienten über eine ausreichende Restfunktion der CFTR-abhängigen Chloridkanäle verfügen [122].

Die bisher diskutierten therapeutischen Optionen einer nachhaltigen Aktivierung des transepithelialen Chloridtransports und/oder durch Natrium-Kanal-Blockade [8, 26, 51, 56, 65, 73, 74, 80, 82, 85, 111, 131] müssen konsequent voran getrieben werden, damit der Progredienz des Krankheitsgeschehens mittelfristig Einhalt geboten werden kann.

5 Zusammenfassung

Hintergrund

Die Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD) hat einen hohen Stellenwert in der CF-Diagnostik und -Forschung, wird aber bisher nur an einigen wenigen CF-Zentren in Deutschland durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses elektrophysiologische Messverfahren durch Modifikationen der Methodik anderen Arbeitsgruppen leichter zugänglich zu machen und die Altersgrenze zu senken:

Es sollte geprüft werden, ob das international als Asthma-Medikament zugelassene Beta-2-Mimetikum Salbutamol anstelle des üblicherweise verwendeten Isoproterenol, das für die in-vivo-Anwendung am Menschen nicht zugelassen ist, ohne Wirkungseinbuße bezüglich der Stimulation von CFTR-abhängigen Chloridkanälen eingesetzt werden kann. Ferner stellte sich die Frage, ob die Aktivierung alternativer Chlorionenkanäle im Rahmen der Diagnostik entbehrlich ist. Schließlich war die Frage, ob verlässliche PD-Bestimmungen nicht nur an der nasalen Mucosa, sondern auch in der Ampulla recti möglich sind, zumal sowohl im respiratorischen als auch im Rektum-Epithel CFTR in der apikalen Membran nachweisbar ist.

Methodik

Zur Prüfung des Chloridkanal-stimulierenden Effekts von Salbutamol wurde in randomisierter Reihenfolge bei 25 Probanden ohne CF und bei 13 CF-Patienten im Alter von 14 bis 36 Jahren die Repolarisation der PD nach vorheriger Superfusion mit Amilorid und chlorfreier Lösung durch Superfusion mit Isoproterenol und Salbutamol gemessen.

Zur Klärung der Frage, ob die Stimulation alternativer Chlorionenkanäle im Rahmen der Diagnostik entbehrlich ist, wurde bei 23 gesunden Probanden und 19 CF-Patienten im Alter von 8 bis 53 Jahren die PD-Messung (nach Amilorid und Salbutamol) mit oder ohne vorherige Applikation chloridfreier Lösung durchgeführt.

An 56 gesunden Probanden und 12 CF-Patienten im Alter von 1 Monat bis 62 Jahren wurden mit Hilfe eines Otoskops für Pferde mit sonst gleichartigem Vorgehen die PD-Messung an der rektalen Schleimhaut durchgeführt, nachdem die Probanden zuvor mittels eines Miniklistiers oder eines Klysmas abgeführt worden waren; Säuglinge

und Kleinkinder wurden bei Bedarf mit Esketamin / mit Chloralhydrat mild sediert.

Ergebnisse

Der prozentuale Wiederanstieg der PD nach Applikation von Isoproterenol bzw. Salbutamol wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die Repolarisation der Potenzialdifferenz nach Gabe beider Beta-2-Mimetika korrelierte signifikant ($r = 0,86$, $p < 0,01$).

Bei Verzicht auf chloridfreie Lösung, und somit fehlender Aktivierung der calciumabhängigen alternativen Chloridkanäle, zeigte sich eine Repolarisation der PD nach Superfusion eines Beta-2-Mimetikums in der gleichen Größenordnung unabhängig von der vorherigen Gabe einer chloridfreien Lösung. Der prozentuale Wiederanstieg der PD mit Superfusion chloridfreier Lösung korrelierte eng mit demjenigen ohne vorherige Aktivierung der alternativen Chloridkanäle ($r = 0,87$; $p < 0,001$). Mit beiden Methoden war eine eindeutige Trennung zwischen einer Chlorionentransportstörung bei CF und einer regelrechten Funktion der CFTR*-abhängigen Chloridkanäle bei gesunden Probanden zu beobachten.

Bei der rektalen PD-Messung zeigten sowohl die Basalwerte als auch die Potenzialdifferenzwerte nach Gabe von Amilorid keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den Werten der nasalen PD-Messung.

Die Differenzierung zwischen einer regelrechten Chloridsekretion bei Gesunden und einer defekten Chloridsekretion bei CF-Patienten war bei rektaler und nasaler PD-Messung gleichwertig. Der mediane Wiederanstieg der PD betrug bei den Gesunden nach Verabreichung von Salbutamol rektal 90,5 %, nasal 100,0 %, bei CF-Patienten rektal 0,0 %, nasal -4,2 %.

Fazit

Der Nachweis, dass Salbutamol dem Isoproterenol hinsichtlich der Aktivierung der CFTR*-abhängigen Chloridkanäle ebenbürtig ist, führt zu einer wesentlichen organisatorischen Erleichterung bei der Durchführung der PD-Messung.

Eine weitere Vereinfachung der PD-Messung ist durch den Verzicht auf gesonderte

·CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Testung mit chloridfreier Lösung möglich. Es stellte sich heraus, dass durch diese Modifikation die diagnostische Aussagekraft der Potenzialdifferenzmessung nicht reduziert wird. In der Routine-Diagnostik bedeutet dies eine Zeitersparnis von 6-7 Minuten. Dadurch wird die Anwendung der Superfusionsmethode bei jüngeren Kindern (ab einem Alter von 5-6 Jahren) erleichtert.

Eine weitere Senkung der Altersgrenze wurde durch die Einführung der rektalen PD-Messung erreicht. Diese ist als besonderer Fortschritt anzusehen, da sich damit auch im Säuglingsalter die CF-Diagnostik optimieren lässt

Summary

Background

Measuring the potential-difference (PD) has become more and more important in the diagnostic and the research of CF, but it is only done in few CF centres in Germany. The aim of this research paper is to make this kind of electro-physical measurement more popular and accessible for other research groups.

Aim of this study was to test if isoproterenol can be replaced by salbutamol without losing the effect of stimulating the CFTR*-dependent chloride-canals. Isoproterenol is not approved for in-vivo application in human beings.

Furthermore, it was of utmost interest whether omitting the chloride-free solution, which stimulates alternative chloride-canals, would reduce the results of PD measurement.

Finally, the question had to be answered if rectal measurement of PD would be possible, because CFTR*-canals are found in both the respiratory and rectal epithelium.

Methods

To examine the chloride-canal stimulating effect of salbutamol the repolarisation of the PD under superfusion of salbutamol and isoproterenol after the application of amiloride and the chloride-free solution was assessed in 25 non-CF controls and 13 CF patients from the age of 14 to 36 years in random order.

To prove that the stimulation of alternative chloride-canals does not play an important role for the CF diagnostic, measurements of PD were started in 23 healthy persons and 19 CF patients from the age of 8 to 53 years (after amiloride and salbutamol) with and without the application of chloride-free solution.

Rectal measurements of PD were performed using an otoscope for horses in 56 non-CF controls and 12 CF patients (age 1 month to 62 years) after being purged with a clyisma. Infants and very young children were sedated with chloral hydrate before starting the PD.

Results

The increase in percentage of PD after the application of isoproterenol and salbutamol revealed no difference. The repolarisation of the PD after the

administration of both beta-adrenergic drugs showed highly significant positive correlation ($r = 0,86$, $p < 0,01$).

Comparison of the PD with and without the application of chloride-free solution showed a similar increase of PD (correlation, $r = 0,87$, $p < 0,01$) allowing to differentiate between a defective and a normal function of the CFTR-dependent chloride-canal with both methods.

Findings of rectal basal PD were in principle not different from nasal measurement. The range of PD values in CF patients and non-CF controls did not overlap. Median increase of the PD after superfusion of salbutamol was in healthy persons about 90,5 %, (rectal PD) and 100,0 % (nasal PD), in CF patients 0,0 % and -4,2 %, respectively.

Conclusion

These findings suggest that there is no difference between the two beta-adrenergic drugs regarding the stimulation of the CFTR*-dependent chloride-canal, and that salbutamol can be used without impairing the results of the PD measurement.

Omitting the chloride-free solution the PD measurement is not influenced. So the time of measurement can be reduced by about 6 to 7 minutes and we are able to use the method of superfusion also with younger patients (at the age of 5 to 6 years).

The introduction of rectal PD measurement is the most important advance, because PD measurement now is possible even in infants.

Thus the goal of this thesis, to make the PD-measurement more easy and applicable to young children was achieved.

* CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

6. Literaturverzeichnis

1. AG Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie: Lindemann H., Schüler D., Ballmann M., Hebestreit A., Hofmann T., Kersting U., Mall M., Reinhardt D.: Klinischer Stellenwert der modernen elektrophysiologischen Diagnostik bei Mukoviszidose (zystische Fibrose). *Monatsschr. Kinderheilkd.* 49: 258-264 (2001)
2. Agrons, G.A., Corse, W.R., Markowitz, R.I., Suarez, E.S., Perry, D.R.: Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 16: 871-893 (1996)
3. Alton, E.W.F.W., Currie, D., Logan-Sinclair, R., Warner, J.O., Hodson, M.E., Geddes, D.M.: Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 3: 922-926 (1990)
4. Anderson, C.M., Freemantle, M.: Sweat test results in normal persons of different ages compared with families with fibrocystic disease of the pancreas. *Arch. Dis. Child.* 35: 581-587 (1960)
5. Anderson, C.M., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., Welsh, M.J.: Generation of cAMP-Activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251: 679-682 (1991)
6. Anderson, C.M., Welsh, M.J.: Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6003-6007 (1991)
7. Anonymous. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N. Engl. J. Med.* 329: 1308-1313 (1993)
8. App, E.M., King, M., Helfesrieder, R., Köhler, D., Matthys, H.: Acute and long-term amiloride inhalation in cystic fibrosis lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 605-612 (1990)
9. Ballke, E.H.: Die transepitheliale elektrische Potentialdifferenz (tPd) der respiratorischen und gastrointestinalen Schleimhaut im Kindesalter. *Diss. Univ. Greifswald* (1990)
10. Ballke, E.H., Wiersbitzky, S., Mahner, B., König, A.: The effect of N-acetyl-cysteine (Mucosolvin) on the transmural potential difference of the mucosa in children. *Pediatr. Grenzgeb.* 31: 97-101 (1992)
11. Bangel, N., Rudack, C., Weber, W.-M., Kusche, K.: Different expression levels of ENaC from human nasal epithelium in CF and non-CF tissue. *Acta Physiologica Congress* (2006) Abstract 12914
12. Bangel, N., Dahlhoff, C., Sobczak, K., Weber, W.-M., Kusche, K.: Upregulated expression of ENaC in human nasal epithelium. *J. Cystic Fibrosis* (2007) in press
13. Benedetto, G.D., Lopez-Vidriero, M.T., Carratu, L., Clarke, S.W.: Does amiloride affect ciliary beat frequency? *Eur. Respir. J.* 1: 312 (1988) abstract
14. Bland, J.M., Altmann, D.G.: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* I: 307-311 (1986)
15. Boucher, R.C., Bromberg, P.A., Gatzky, J.T.: Airway transepithelial electric potential in vivo: species and regional differences. *J. Appl. Physiol.* 48: 169-176 (1980)

16. Boucher, R.C., Knowles, M.R., Stutts, M.J., Gatzky, J.T.: Epithelial dysfunction in cystic fibrosis lung disease. *Lung* 161: 1-17 (1983)
17. Boucher, R.C., Stutts, M.J., Knowles, M.R.: Sodium-transport in cystic fibrosis nasal epithelia: Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *Clin. Res.* 33: 467 A (1985)
18. Boucher, R.C., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Cantley, L., Gatzky, J.T.: Na-transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. *J. Clin. Invest.* 78: 1245-1252 (1986)
19. Boucher, R.C., Cotton, C.U., Gatzky, J.T., Knowles, M.R., Yankaskas, J.R.: Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *J. Physiol.* 405: 77-103 (1988)
20. Boucher, R.C.: Human airway ion transport. Part one. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 271-281 (1994)
21. Boucher, R.C.: Human airway ion transport. Part two. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 581-593 (1994)
22. Bowler, I.M., Kelman, B., Worthington, D., Littlewood, J.M., Watson, A., Conway, S.P., Smye, S.W., James, S.L., Sheldon, T.W.: Nebulised amiloride in respiratory exacerbations of cystic fibrosis: a randomised controlled trial. *Arch. Dis. Childh.* 73: 427-430 (1995)
23. Buch, E., Hinojosa, J., Lledo, S., Bulbena, O., Navarro, C., Fernandez, C.: Transmucosal potential difference in experimental colitis in rats. *Inflammation* 19: 445-455 (1995)
24. Burrows, E., Southern, K.W., Noone, P.: Sodium channel blockers for cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. Art. No.: CD005087. DOI: 10.1002/14651858.CD005087.pub2.
25. Chernick, W.S., Barbero, G.J.: Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis. *Pediatrics* 24: 739-745 (1959)
26. Clancy, J.P., Bebok, Z., Ruiz, F., King, C., Jones, J., Walker, L., Greer, H., Hong, J., Wing, L., Macaluso, M., Lyrene, R., Sorscher, E. J., Bedwell, D. M.: Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 1683-1692 (2001)
27. Clarke, L.L.: Chloride secretory response to extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia. *Am. J. Physiol.* 263: C348-C356 (1992)
28. Cogswell, J.J., Risdon, R.A., Taylor, B.: Chronic suppurative lung disease in sisters mimicking cystic fibrosis. *Arch. Dis. Childh.* 49: 520-524 (1974)
29. Cohn, R.C., Rudzienski, L., Putnam, R.W.: In vitro antimicrobial activity of amiloride analogs against *Pseudomonas*. *Chemotherapy* 38: 232-237 (1992)
30. Cohn, R.C., Rudzienski, L.: Substituted amines synergistic with tobramycin against *Burkholderia cepacia* in vitro. *Chemotherapy* 43: 100-107 (1997)
31. Cotton, C.U., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis nasal epithelium. *Clin. Res.* 33: 463 A (1985)
32. Cuthbert, A.W., Brayden, D.J., Dunne, A., Smyth, R.L., Wallwork, J.: Altered sensitivity to amiloride in cystic fibrosis. Observations using cultured sweat glands. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 29: 227-234 (1990)
33. Cutting, G.R.: CLC-2 channels and CF. *Pediatr. Pulmonology* 17: 123-124 (1998)

34. Dankert-Roelse, J.E., Meerman G.J.: Long term prognosis of patients with cystic fibrosis in relation to early detection by neonatal screening and treatment in a cystic fibrosis centre. *Thorax* 50: 712-718 (1995)
35. de la Cruz, A., Garcia, B., Valls, M.: Cystic fibrosis: a new disease in adults. *An. Esp. Pediatr.* 46: 24-28 (1997)
36. Delmarco, A., Pradal, U., Cabrini, G., Bonizzato, A., Mastella, G.: Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. *Eur. Respir. J.* 10: 1145-1149 (1997)
37. Drumm, M.L.: Modifier genes and variation in cystic fibrosis. *Respir. Res.* 2: 125-128 (2001)
38. Frizzell, R.A., Rechkemmer, G., Shoemaker, R.I.: Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science* 233: 558-560 (1986)
39. Frömter, E.: Die Ionentransportstörung bei der Mukoviszidose. *Aktueller Wissensstand. Pneumologie* 44: 1144-1146 (1990)
40. Gallati, S.: Molekularbiologische Methoden für den Mutationsnachweis. In: Reinhardt, D., Götz, M., Kraemer, M., Schöni, M.H. (Hrsg.). *Cystische Fibrose*. Springer, Berlin 2003, S. 214-15
41. Geidel, C.: Die transepitheliale Potenzialdifferenzmessung: Einführung der Superfusionsmethode zur Verbesserung der Mukoviszidose-Diagnostik. *Inaug. Diss. Gießen* 2008
42. Goldstein, J.L., Nash, N.T., Al-Bazzaz, F., Layden, T.J., Rao, M.C.: Rectum has abnormal ion transport but normal cAMP-binding proteins in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* 254, C7: 19-24 (1988)
43. Goldstein, J.L., Shapiro, A.B., Rao, M.C., Layden, T.J.: In vivo evidence of altered chloride but not potassium secretion in cystic fibrosis rectal mucosa. *Gastroenterology* 101: 1012-1019 (1991)
44. Gowen, C.W.jr, Gowen, M.A., Knowles, M.R.: Colonic transepithelial potential difference in infants with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 118: 412-415 (1991)
45. Graham, A., Hasani, A., Alton, E.W., Martin, G.P., Marriott, C., Hodson, M.E., Clarke, S.W., Geddes, D.M.: No added benefit from nebulized amiloride in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 6: 1243-1248 (1993)
46. Greer, R., Shepherd, R., Cleghorn, G., Bowling, F.G., Holt, T.: Evaluation of growth and changes in body composition following neonatal diagnosis of cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 13: 52-58 (1991)
47. Griese, M., Hüls, G., Lindemann, H.: Atemwege und Lunge. In: Lindemann, H., Tümmler, B., Dockter, G.: *Mukoviszidose - Zystische Fibrose*. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart - New York 2004, S. 35 – 94
48. Hay, J.G., Geddes, D.M.: Transepithelial potential difference in cystic fibrosis. *Thorax* 40: 493-496 (1985)
49. Heppt, W., Tasman, A.J., Goertler, K.: Diagnostische Zytologie der Nasenschleimhaut. *Allergologie* 16: 2-7 (1993)
50. Highsmith, W.E., Burch, L.H., Zhou, Z., Olsen, J.C., Boat, T.E., Spock, A., Gorfroy, J.D., Quittell, L., Friedman, K.J., Silverman, L.M., Boucher, R.C., Knowles, M.R.: A novel mutation

in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentration. *N. Engl. J. Med.* 331: 974-980 (1994)

51. Hirawat, S., Welch, E.M., Elfring, G.L., Northcutt, V.J., Paushkin, S., Hwang, S., Leonard, E.M., Almstead, N.G., Ju, W., Peltz, S.W., Miller, L.L.: Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 47: 430-444 (2007)
52. Hofmann, T., Bohmer, O., Hüls, G., Terbrack, H.G., Bittner, P., Klingmuller, V., Heerd, E., Lindemann, H.: Conventional and modified nasal potential-difference measurement in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 155: 1908-1913 (1997)
53. Hofmann, T., Senier, I., Bittner, P., Hüls, G., Schwandt, H.J., Lindemann, H.: Aerosolized amiloride: dose effect on nasal bioelectric properties, pharmacokinetics and effect on sputum expectoration in patients with CF. *J. Aerosol Med.* 10: 147-158 (1997)
54. Hwang, T.C, Lu, L., Teitlin, P.L., Gruenert, D.C., Haganir, R., Guggino, B.: Chloride-channels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP dependent protein kinase. *Science* 244: 1351-1353 (1989)
55. Jiang, C., W.E., Widdicombe, J.H., McCray, P.B., Miller, S.S.: Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262: 424-427 (1993)
56. 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)
57. Knowles, M.R., Murray, G.F., Shallal, J.A., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Bioelectric properties and ion transport in excised human bronchi. *Physiologist* 23: 100 (1980)
58. Knowles, M.R., Carson, J.L., Collier, A.M., Gatzky, J.T., Boucher, R.C: Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* 124: 484-490 (1981)
59. Knowles, M.R., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 305: 1489-1495 (1981)
60. Knowles, M.R., Buntin, W.H., Bromberg, P.A., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Measurements of transepithelial electric potential difference in the trachea and bronchi of human subjects in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126: 108-112 (1982)
61. Knowles, M.R., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J. Clin. Invest.* 71: 1410-1417 (1983)
62. Knowles, M.R., Stutts, M.J., Spock, A., Fischer, N., Gatzky, J.T., Boucher, R.C: Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221: 1067-1069 (1983)
63. Knowles, M.R., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Aldosterone metabolism and transepithelial potential difference in normal and cystic fibrosis subjects. *Pediatr. Res.* 19: 676-679 (1985)
64. Knowles, M.R., Stutts, M.J., Yankaskas, J.R., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Clin. Chest Med.* 7: 285-297 (1986)

65. Knowles, M.R., Church, N.L., Waltner, W.E., Yankaskas, J.R., Gilligan, P., King, M., Edwards, L.J., Helms, R.W., Boucher, R.C.: A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 322: 1189-1194 (1990)
66. Knowles, M.R., Clarke, L.L., Boucher, R.C.: Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 325: 533-538 (1991)
67. Knowles, M.R., Paradiso, A.M., Boucher, R.C.: In vivo nasal potential difference: techniques and protocol for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum. Gene. Ther.* 6: 445-455 (1995)
68. Knowles, M.R., Robinson, J.M., Wood, R.E., Pue, William, C.A., Mentz, M., Gilbert, C., Wager, G.C., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.: Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J. Clin. Invest.* 100: 2588-2595 (1997)
69. Knowlton, R.G., Cohen-Haguenaer, O., Van Cong, N., Frezal, J., Brown, V.A., Barker, D., Braman, J.C., Schumm, J.W., Tsui, L.-C., Buchwald, M., Donis-Keller, H.: A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318: 380-382 (1985)
70. Lassen, U.V., Rasmussen, B.E.: Use of microelectrodes for measurement of membrane potentials. In: Giebisch, G.: *Membrane transport in biology*, Berlin 1978, S: 169-203
71. Levin, R.J., Parker, A.J.: Rectal electrogenic secretion - is it a putative indicator of intestinal secretory status induced by nutritional deprivation in the rat? *Exp. Physiol.* 75: 609-611 (1990)
72. Lindemann, H.: Mukoviszidose and precapillary pulmonary hypertension. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 135: 728-734 (1987)
73. Lindemann, H., Becker, T., Bittner, P., Boldt, A., Hofmann, T., Schwandt, H.J.: Sputum elimination in CF patients supported by aerosolized amiloride. *Pneumologie* 44: 1148-1150 (1990)
74. Lindemann, H.: Pulmonaler Verlauf der Mukoviszidose beim Kind. *Atemw.-Lungenkrkh.* 11: 503-509 (1993)
75. Lindemann, H.: Mukoviszidose: Standardtherapie und Perspektiven. *Atemw.-Lungenkrkh.* 30: 109-119 (2004)
76. Lindemann, H., Hüls, G.: Mukoviszidose, Therapiestandards und Perspektiven. *Pädiatr. Praxis* 65: 43-56 (2004)
77. Lindemann, H., Tümmler, B., Dockter, G.: *Mukoviszidose - Zystische Fibrose*. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart- New York 2004
78. Mall, M., Bleich, M., Schürlein, M., Kühr, J., Seydewitz, H.H., Brandis, M., Greger, R., Kunzelmann, K.: Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am. J. Physiol.* 275: 1274-1281 (1998)
79. Mall M., Wissner A., Gonska T, Calenborn D., Kuehr J., Brandis M., Kunzelmann K.: Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na⁺ absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23: 755-761 (2000)

80. Middleton, P.G., Geddes, D.M., Alton, E.W.: Effect of amiloride and saline on nasal mucociliary clearance and potential difference in cystic fibrosis and normal subjects. *Thorax* 48: 812-816 (1993)
81. Middleton, P.G., Geddes, D.M., Alton E.W.F.W.: Protocols for in vivo measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. *Eur. Respir. J.* 7: 2050-2056 (1994)
82. Middleton, P.G., Kidd, T.J., Williams, B.: Combination aerosol therapy to treat Burkholderia cepacia complex. *Eur. Respir. J.* 26: 305-308 (2005)
83. Moran, W.M., Valentichm J.D.: Cl-secretion by cultured shark rectal gland cells. II. Effects of forskolin on cellular electrophysiology. *Am. J. Physiol.* 260: 824-831 (1990)
84. Morris, L.J., Mascia, A.V., Farnsworth, P.B.: Cystic fibrosis: making a correct and early diagnosis. *J. Fam. Pract.* 6: 749-756 (1978)
85. Mylett, J., Johnson, L., Knowles, M.: Alternate therapies for cystic fibrosis. *Sem. Respir. Crit. Care. Med.* 15: 426-433 (1994)
86. Noone, P.G., Olivier, K.N., Knowles, M.R.: Modulation of the ionic milieu of the airway in health and disease. *Annu. Rev. Med.* 45: 421-434 (1994)
87. Orlando, R.C., Powell, D.W., Croom, R.D., Berschneider, H.M., Boucher, R.C., Knowles, M.R.: Colonic and esophageal transepithelial potential difference in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 9: 1041-1048 (1989)
88. Patton, C.J., Jenkins, M.Q., Briggman, J.V., Spicer, S.S.: Effect of amiloride on potential difference across rectal mucosa in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.* 16: 1035-1036 (1982)
89. Perez-Aguilar, F., Ferrer-Calvete, J., Nicolas, D., Berenguer, J., Ponce, J.: Digestive alterations in cystic fibrosis. Retrospective study of a series of 46 adult patients. *Gastroenterol. Hepatol.* 22: 72-78 (1999)
90. Pienkowski, P., Fioramonti, J., Frexinos, J.: Rectal potential differences in irritable bowel syndrome and in inflammatory bowel diseases in man. *J. Intern. Med.* 226: 423-427 (1989)
91. Pienkowski, P., Fioramonti, J., Skalli, F., Frexinos, J.: Effects of corticoids, 5-aminosalicylic acid and sucralfate on the potential difference of the rectum in inflammatory colitis in man. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 13: 202-207 (1989)
92. Potter, J.L., Matthews, L.R.W., Spector, S., Lemm, J.: Osmolality and the ionic environment on pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and laryngectomy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 96: 83-87 (1967)
93. Regnis, J.A., Robinson, M., Bailey, D.L., Cook, P., Hooper, P., Chan, H-K., Gonda, I., Bautovich, G. Bye, P.T.P.: Mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis and in normal subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 66-71 (1994)
94. Report of the Committee for a study for evaluation of testing cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 88: 711-750 (1976)
95. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., Tsui, L.-C.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 24: 1066-1073 (1989)

96. Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B.-S., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L.-C., Collins, F.S.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065 (1989)
97. Rosenstein, B.J., Zeitlin, P.L.: Recent advances in cystic fibrosis. *Cur. Op. Pediatr.* 3: 392-398 (1991)
98. Rozmahel, R., Gyomerey, K., Plyte, S., Nguyen, V., Wilschanski, M., Durie, P., Bear, C.E., Tsui, L.C.: Incomplete rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by the human CFTR cDNA. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1153-1162 (1997)
99. Sachs, L.: *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin 1974
100. Sauder, R.A., Chesrown, S.E., Loughlin, G.M.: Clinical application of transepithelial potential difference measurements in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 111: 353-358 (1987)
101. Schmidt, R., Thews, G.: *Physiologie des Menschen*. 26. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1995
102. Schüler, D., Moerkerk, W., Alter, H., Weber, K., Geidel, C., Hüls, G., Lindemann, H.: Salbutamol: eine Alternative zu Isoproterenol bei der nasalen transepithelialen Potentialdifferenzmessung mittels Superfusion. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 148: 57 (2000), abstract
103. Schüler, D., Moerkerk, W., Weber, K., Alter, H., Geidel, C., Hüls, G., Lindemann, H.: Vereinfachung der CF-Diagnostik bei der transepithelialen Potentialdifferenzmessung mittels Superfusion. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 148: 327 (2000), abstract
104. Schüler, D., Moerkerk, W., Weber, K., Alter, H., Geidel, C., Hüls, G., Lindemann, H.: Salbutamol: eine Alternative zu Isoproterenol bei der nasalen transepithelialen Potentialdifferenzmessung mittels Superfusion. *Pneumologie* 5: 46 (2000), abstract
105. Schüler, D., Weber, K., Moerkerk, W., Hüls, G., Lindemann, H.: Rectal measurement of potential difference in infants: a new sensitive tool for routine use in the diagnostic field of cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis, Abstracts of the 24th European Cystic Fibrosis Conference 6-9 June 2001, Vienna Austria, P118*
106. Schüler, D., Weber, K., Moerkerk, W., Wagner, J., Hüls, G., Lindemann, H.: Vergleich von rektaler und nasaler Potentialdifferenzmessung in vivo. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 149: 194 (2001) abstract
107. Schüler, D., Alter, H., Hüls, G., Lindemann, H.: Influence of ipratropium bromide on nasal transepithelial potential difference. In: L. Romano, G. Manno, L.J.V. Galletta (Hrsg.) *Proceedings of 25th European Cystic Fibrosis Conference, Genoa (Italy), 33-37, June 20-23 (2002)*
108. Schüler, D., Moerkerk, W., Wagner, J., Hüls, G., Lindemann, H.: Potentialdifferenzmessung an der Rektalschleimhaut in vivo. *Pneumologie* 55, 77 (2001).
109. Schüler, D., Semet-Gaudelus, I., Wilschanski, I., Ballmann, M., Dechau-Edelmann, A., Hug, M., Leal, T., Lebacqz, J., Lenoir, G., Stanke Wallemacq, P., Tümmler, B., Knowles, M.R.: Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurement. *J. Cyst. Fibros.* 3: 151-155, European Thematic Network for Cystic Fibrosis (2004)

110. Schüler, D., Moerkerk, W., Weber, K., Alter, H., Geidel, C., Hüls, G., Lindemann, H.: Diagnostik bei zystischer Fibrose (Mukoviszidose). In: Lindemann, H. (Hrsg.) Update Pädiatrische Pneumologie. Dustri, München – Orlando 2005, S. 67-80
111. Schüler, D., Weber, K., Barth, C., Reineck, P., Pabst, J., Bittner-Dersch, P., Geidel, C., Fegbeutel, C., Schulz, R., Lindemann, H.: Systemisch applizierte Flavonoide steigern die Chloridpermeabilität an der apikalen Membran des respiratorischen Epithels bei CF-Patienten. *Atemw.-Lungenkrkh.* 31: 148-149 (2005)
112. Standaert T.A., Boitano L., Emerson J., Milgram L.J.H., Konstan M.W., Hunter J., Berclaz P.Y., Brass L., Zeitlin P.L., Hammond K., Davies Z., Foy C., Noone P.G., Knowles M.R.: Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: An outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatric Pulmonology* 37: 385 –392 (2004)
113. Strong, T.V., Smit, L.S., Hon, C.T., Markiewicz,D., Petty, T.L., Craig, M.W., Rosenow, E.C., Tsui,L.-C., Iannuzzi, M.C., Knowles, M.R., Collins, F.S.: Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N. Engl. J. Med.* 325: 1630-1634 (1991)
114. Stutts, M.J., Milgram, S.L., Knowles, M.R., Boucher, R.C.: Molecular link of CFTR to other ion transport process. *Pediatr. Pulmonolog.* 17: 121 (1998)
115. Tabcharani, J.A., Rommens, J.M., Hou, Y.X., Chang, X.B., Tsui, L.C., Riordan, J.R., Handrahan, J.W.: Multi-ion pore behaviour in the CFTR chlorid channel. *Nature* 366: 79-82 (1993)
116. Teune, T.M., Timmers-Reker, A.J., Bouquet, J., Bijman, J., De Jonge, H.R., Sinaasappel, M.: In vivo measurement of chloride and water secretion in the jejunum of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.* 40: 522-527 (1996)
117. Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R.G., Schumm, J.W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy D., Plavsic, N. Zsiga, M., Markiewicz, D., Akoto, G. Brown, V., Helms, C. Granvins, T., Parker, C., Rediker, K., Donis-Keller, H.: Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230: 1054-1057 (1985)
118. Unal-Maelger, Ö.H., Urbanek, R.: Stellenwert der Messung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD) am respiratorischen Epithel in der Mukoviszidose-Diagnostik. *Monatsschr. Kinderheilkd* 136: 76-80 (1988)
119. Ussing, H.H., Zerahn, K.: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta phys. Scandinav.* 23: 110-127 (1950)
120. Veeze, H.J., Sinaasappel, M., Bijman, J., Bouquet, J., De Jonge, H.R.: Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 101: 398-403 (1991)
121. Wainright, B.J., Scambler, P.J., Schmidtke, J., Watson, E.A., Law Hai-Yang, Faval, M., Cooke, H.J., Eiberg, H., Williamson, R.: Location of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 318: 384-385 (1985)

122. Walker, L.C., Venglarik, C.J., Aubin, G., Weatherly, M.R., Mccarty, N.A., Lesnick, B., Ruiz, F., Clancy, J.P., Sorscher, E.J.: Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 1684–1689 (1997)
123. Waters, D.L., Wilcken, B., Irwing, L., Van Asperen P., Mellis, C., Simpson, J.M., Brown, J., Gaskin K.J.: Clinical outcomes of newborn screening for cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonat.* 80: 1-7 (1999)
124. 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)
125. Welsh, M.J.: Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia; *FASEB J.* 4: 2718-2725 (1990)
126. Welsh, M.J., Smith, A.E.: Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251-1254 (1993)
127. Welsh, M.J., Tsui, L., Boat, T.F., Beaudet, A.L.: Cystic Fibrosis. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Frederickson, D.S. (eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* McGraw-Hill, New York 1995, pp. 3799-3876
128. Willumsen, N.J., Boucher, R.C.: Shunt resistance and ion permeabilities in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Am. J. Physiol.* 256: C1054-1063 (1989)
129. Wilschanski, M.A., Rozmahel, R., Beharry, S., Kent, G., Li.C., Tsui, L.C., Durie, P., Bear, C.E.: In vivo measurements of ion transport in long-living CF mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 753-759 (1996)
130. Zeitlin P., A. Brody, D. Waltz, K. Mccoy, T.L. Williams, L. Molina: A safety and pharmacokinetic assessment of inhaled administration of Moli 1901 in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* 24: 259 (2002), abstract
131. Zeitlin, P.L., Boyle, M.P., Guggino, W.B., Molina, L.: A phase I trial of intranasal Moli1901 for cystic fibrosis. *Chest* 125: 143–149 (2004)
132. Zielenski, J., Tsui, L.C.: Cystic fibrosis: genotype and phenotyp variations. *Annu. Rev. Genet.* 29: 777-807 (1995)
133. Zielenski, J.: Genotype and phenotyp in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 117-133 (2000)

7 Anhang

7.1 Tabellen

7.1 Transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) vor bzw. nach Amilorid (Ami): Absolutwerte und prozentuale Änderungen, bezogen auf den Ausgangswert bei Gesunden (ges.) und Patienten mit CF (CF)

n	PD (mV)t vor Ami, ges.	PD (mV) vor Ami, CF	PD (mV) nach Ami, ges.	PD (mV) nach Ami, CF	Abfall der PD in % nach Ami, gesund	Abfall der PD in % nach Ami, CF
1.	-24	-6	-18	-3	25,00	50,00
2.	-33	-40	-17	-17	48,48	57,50
3.	-30	-46	-5	-31	83,33	32,61
4.	-45	-26	-20	-11	55,56	57,69
5.	-40	-28	-18	-12	55,00	57,14
6.	-40	-54	-19	-16	52,50	70,37
7.	-30	-48	-18	-20	40,00	58,33
8.	-22	-70	-9	-24	59,09	65,71
9.	-29	-17	-8	-9	72,41	47,06
10.	-20	-28	-4	-8	80,00	71,43
11.	-27	-33	-11	-12	59,26	63,64
12.	-49	-40	-27	-20	44,90	50,00
13.	-35	-43	-10	-13	71,43	69,77
14.	-34	-39	-12	-3	64,71	92,31
15.	-36	-46	-15	-5	58,33	89,13
16.	-29	-45	-15	-8	48,28	82,22
17.	-28	-41	-13	-18	53,57	56,10
18.	-21	-42	-7	-15	66,67	64,29
19.	-37	-33	-25	-8	32,43	75,76
20.	-25	-40	-14	-16	44,00	60,00
21.	-26	-58	-8	-25	69,23	56,90
22.	-18	-65	-7	-15	61,11	76,92
23.	-23	-56	-10	-12	56,52	78,57
24.	-22	-29	-8	-5	63,64	82,76
25.	-25	-33	-8	-11	68,00	66,67
26.	-20	-28	-10	-8	50,00	71,43
27.	-29	-82	-10	-25	65,52	69,51
28.	-40	-82	-18	-25	55,00	69,51
29.	-30	-60	-13	-18	56,67	70,00
30.	-30	-50	-12	-14	60,00	72,00
31.	-43	-50	-21	-8	51,16	84,00
32.	-30	-74	-22	-12	26,67	83,78
33.	-31	-44	-14	-16	54,84	63,64
34.	-46	-42	-23	-13	50,00	69,05
35.	-31	-50	-17	-5	45,16	90,00
36.	-21	-35	-11	-12	47,62	65,71
37.	-23	-40	-12	-19	47,83	52,50
38.	-18	-47	-11	-10	38,89	78,72
39.	-34	-74	-22	-33	35,29	55,41
40.	-17	-26	-7	-6	58,	76,92
41.	-42	-45	-12	-7	71,43	84,44
42.	-26	-61	-5	-27	80,77	55,74
43.	-26	-63	-9	-22	65,38	65,08
44.	-25	-66	-13	-21	48,00	68,18
45.	-15	-28	-8	-8	46,67	71,43

46.	-24	-35	-13	-14	45,83	60,00
47.	-22	-28	-6	-12	72,73	57,14
48.	-22	-47	-6	-7	72,73	85,11
49.	-21	-18	-15	-8	28,57	55,56
50.	-25	-58	-7	-18	72,00	68,97
51.	-34	-45	-14	-12	58,82	73,33
52.	-16	-49	-7	-9	56,25	81,63
53.	-40	-40	-22	-10	45,00	75,00
54.	-34	-50	-17	-14	50,00	72,00
55.	-22	-22	-10	-10	54,55	54,55
56.	-31	-18	-19	-10	38,71	44,44
57.	-26	-39	-8	-9	69,23	76,92
58.	-22	-34	-8	-7	63,64	79,41
59.	-20	-33	-6	-14	70,00	57,58
60.	-24	-38	-6	-10	75,00	73,68
61.	-33	-32	-12	-8	63,64	75,00
62.	-35	-25	-12	-9	65,71	64,00
63.	-25	-19	-12	-7	52,00	63,16
64.	-26	-42	-8	-12	69,23	71,43
65.	-34	-60	-15	-21	55,88	65,00
66.	-24	-36	-10	-4	58,33	88,89
67.	-15	-40	-7	-10	53,33	75,00
68.	-44	-42	-11	-10	75,00	76,19
69.	-15	-38	-4	-7	73,33	81,58
70.	-26	-26	-10	-15	61,54	42,31
71.	-24	-25	-7	-8	70,83	68,00
72.	-22	-30	-10	-12	54,55	60,00
73.	-28	-60	-13	-12	53,57	80,00
74.	-13	-44	-5	-11	61,54	75,00
75.	-22	-52	-10	-4	54,55	92,31
76.	-21	-12	-8	-2	61,90	83,33
77.	-18	-57	-6	-26	66,67	54,39
78.	-28	-32	-14	-17	50,00	46,88
79.	-25	-20	-11	-3	56,00	85,00
80.	-44	-32	-22	-8	50,00	75,00
81.	-31	-24	-4	-12	87,10	50,00
82.	-20	-38	-12	-8	40,00	78,95
83.	-19	-37	-11	-15	42,11	59,46
84.	-11	-35	-1	-15	90,91	57,14
85.	-12	-37	-4	-15	66,67	59,46
86.	-19	-55	0	-11	100,00	80,00
87.	-32	-60	-13	-15	59,38	75,00
88.	-19	-42	-15	-23	21,05	45,24
89.	-37	-22	-20	-5	45,95	77,27
90.	-47	-20	-28	-7	40,43	65,00
91.	-39	-40	-15	-8	61,54	80,00
92.	-22	-41	-5	-19	77,27	53,66
93.	-25	-16	-9	-3	64,00	81,25
94.	-15	-32	-5	-12	66,67	62,50
95.	-8	-54	-2	-8	75,00	85,19
96.	-15	-38	-7	-19	53,33	50,00
97.	-19	-38	-12	-17	36,84	55,26
98.	-25	-40	-15	-6	40,00	85,00
99.	-22	-35	-8	-11	63,64	68,57
100.	-18	-48	-5	-20	72,22	58,33
101.	-18	-41	-6	-12	66,67	70,73
102.	-32	-46	-10	-28	68,75	39,13
103.	-22	-59	-10	-25	54,55	57,63
104.	-14	-56	-5	-15	64,29	73,21

105.	-16	-37	-9	-13	43,75	64,86
106.	-16	-54	-6	-7	62,50	87,04
107.	-16	-35	-7	-8	56,25	77,14
108.	-22	-35	-8	-10	63,64	71,43
109.	-24	-34	-7	-21	70,83	38,24
110.	-20	-30	-6	-14	70,00	53,33
111.	-30	-38	-8	-25	73,33	34,21
112.	-21	-58	-6	-10	71,43	82,76
113.	-23	-38	-6	-21	73,91	44,74
114.	-23	-51	-5	-9	78,26	82,35
115.	-23	-43	-4	-16	82,61	62,79
116.	-14	-33	-5	-12	64,29	63,64
117.	-29	-12	-9	-1	68,97	91,67
118.	-24	-37	-5	-10	79,17	72,97
119.	-17	-38	-4	-20	76,47	47,37
120.	-15	-76	-4	-38	73,33	50,00
121.	-22	-30	-8	-15	63,64	50,00
122.	-23	-32	-11	-16	52,17	50,00
123.	-17	-44	-4	-15	76,47	65,91
124.	-27	-23	-12	-7	55,56	69,57
125.	-26	-46	-8	-18	69,23	60,87
126.	-19	-33	-13	-23	31,58	30,30
127.	-12	-23	-7	-9	41,67	60,87
128.	-12	-33	-7	-9	41,67	72,73
129.	-8	-23	-3	-9	62,50	60,87
130.	-34	-35	-4	-16	88,24	54,29
131.	-32	-46	-17	-24	46,88	47,83
132.	-18	-50	-7	-11	61,11	78,00
133.	-13		-4		69,23	
134.	-16		-12		25,00	
135.	-30		-7		76,67	
136.	-12		-3		75,00	
137.	-25		-4		84,00	
138.	-16		-3		81,25	
139.	-17		-9		47,06	
140.	-12		-4		66,67	
141.	-24		-18		25,00	
142.	-32		-15		53,13	
143.	-14		-4		71,43	
144.	-10		-4		60,00	
145.	-40		-14		65,00	
146.	-38		-10		73,68	
147.	-18		-4		77,78	
148.	-27		-10		62,96	
149.	-23		-12		47,83	
150.	-17		-6		64,71	

Tab. 7.2: Absolutwerte und prozentuale Änderungen der rektalen PD (bezogen auf den Ausgangswert) nach Superfusion von Amilorid bei 12 CF-Patienten und 56 gesunden Probanden

n	Abfall der rektalen PD nach Amilorid (mV), Gesund	Abfall der rektalen PD nach Amilorid (%), Gesund	Abfall der rektalen PD nach Amilorid (mV), CF	Abfall der rektalen PD nach Amilorid (%), CF
1.	35	140,0	8	50,0
2.	11	34,4	27	108,0
3.	11	44,0	23	127,8
4.	12	37,0	69	87,3
5.	15	50,0	14	107,7
6.	6	30,0	20	180,0
7.	11	29,0	14	127,3
8.	18	64,3	49	84,5
9.	29	85,3	28	133,3
10.	19	46,3	32	47,8
11.	12	48,0	12	60,0
12.	6	42,9	15	75,0
13.	12	34,3		
14.	6	17,7		
15.	20	57,1		
16.	12	34,3		
17.	24	77,4		
18.	24	75,0		
19.	22	71,0		
20.	21	70,0		
21.	11	50,0		
22.	35	140,0		
23.	41	102,5		
24.	10	23,8		
25.	14	31,8		
26.	36	70,6		
27.	33	86,8		
28.	30	66,7		
29.	13	39,4		
30.	21	47,7		
31.	18	32,7		
32.	19	48,7		
33.	26	83,9		
34.	10	20,4		
35.	22	56,4		
36.	25	73,5		
37.	7	116,7		
38.	13	108,3		
39.	20	62,5		
40.	16	38,1		
41.	18	81,8		
42.	12	42,9		
43.	12	42,9		
44.	22	44,9		

45.	10	66,7		
46.	10	23,8		
47.	21	56,8		
48.	17	37,8		
49.	13	39,4		
50.	12	70,6		
51.	10	33,3		
52.	7	25,9		
53.	12	44,4		
54.	8	100,0		
55.	11	50,0		
56.	7	21,9		

Tab. 7.3: Absolutwerte und prozentuale Änderungen der rektalen PD (bezogen auf die Differenz zwischen Ausgangswert und Messwert nach Amilorid-Applikation) nach Superfusion von Salbutamol

n	Anstieg (mV) der rektalen PD nach Salbutamol, Gesund	Anstieg (%) der rektalen PD nach Salbutamol, Gesund	Anstieg (mV) der rektalen PD nach Salbutamol, CF	Anstieg (%) der rektalen PD nach Salbutamol, CF
1.	18	51,4	-3	-37,5
2.	7	63,6	-7	-25,9
3.	7	63,6	-4	-17,4
4.	8	66,7	-8	-11,6
5.	10	66,7	0	0,0
6.	4	66,7	0	0,0
7.	8	72,7	0	0,0
8.	14	77,8	1	2,0
9.	23	79,3	3	10,7
10.	16	84,2	5	15,6
11.	11	91,7	2	16,7
12.	6	100,0	4	26,7
13.	12	100,0		
14.	7	116,7		
15.	26	130,0		
16.	22	183,3		
17.	11	45,8		
18.	12	50,0		
19.	11	50,0		
20.	11	52,4		
21.	6	54,5		
22.	20	57,1		
23.	25	61,0		
24.	7	70,0		
25.	10	71,4		
26.	26	72,2		
27.	25	75,8		
28.	23	76,7		
29.	10	76,9		
30.	17	81,0		
31.	15	83,3		
32.	16	84,2		
33.	23	88,5		
34.	9	90,0		
35.	20	90,9		
36.	23	92,0		
37.	7	100,0		
38.	13	100,0		
39.	20	100,0		
40.	16	100,0		
41.	19	105,6		
42.	13	108,3		
43.	13	108,3		
44.	24	109,1		
45.	12	120,0		

46.	12	120,0		
47.	26	123,8		
48.	22	129,4		
49.	17	130,8		
50.	16	133,3		
51.	15	150,0		
52.	11	157,1		
53.	20	166,7		
54.	16	200,0		
55.	29	263,6		
56.	21	300,0		

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Wiebke Elisabeth Marie Bergmann, geb. Moerkerk
Geburtstag: 10.10.1975
Geburtsort: Bünde
Eltern: Adrianus Moerkerk
Elke Moerkerk, geb. Brandmeier
Konfession: evangelisch
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung:

1982-1986 Besuch der Grundschule Südlengern-Dorf
1986-1995 Besuch des Gymnasiums am Markt in Bünde
Juni 1995 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife

Universitäre Ausbildung und Prüfungen:

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen bis zum 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001-2002 Praktisches Jahr im Klinikum Kreis Herford, Lehrkrankenhaus der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster
September 1997 Ärztliche Vorprüfung
August 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang:

Juli 2002 Ärztin im Praktikum in der Kinder- und Jugend-Klinik des Klinikums Kreis Herford
Januar 2004 Assistenzärztin in der Kinder- und Jugend-Klinik des Klinikums Kreis Herford
November 2007 Absolvieren der Facharztprüfung zur Kinder – und Jugendärztin vor der Ärztekammer Westfalen-Lippe

7.3 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lindemann bedanken, der mir in all den Jahren mit Rat und Tat bei sämtlichen Fragen und Problemen zur Seite gestanden hat.

Gleiches gilt für Herrn Dr. Daniel Schüler, der v.a. den praktischen Teil dieser Arbeit engagiert unterstützt und mich sehr gut angeleitet hat.

Der größte Dank jedoch geht an alle „kleinen“ und „großen“ Mukoviszidose - Patienten, die sich trotz des großen Zeitaufwandes regelmäßig und selbstverständlich für sämtliche Messungen zur Verfügung gestellt und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Dieses gilt natürlich auch den freiwilligen, „gesunden“ Probanden, stellvertretend allen voran meinem Mann Jens, meiner Mutter, meinen Brüdern Kai und Till, meiner Schwester Freya, meiner Nichte Frauke, meiner Patentante Christa, meiner Freundin Dodo, sowie allen Freunden/innen, Bekannten und Kommilitonen/innen.

Ganz herzlich möchte ich mich zudem beim Team der Lungenfunktionsabteilung bedanken (Heike Hinkelthein, Monika Johnson, Holger Keller, Renate Pe Lindemann, Annette Simon, Christine Seip und Marlene Wrobel), das immer ein ermunterndes Wort, eine Tasse Kaffee oder sonstige Unterstützung für mich übrig hatte.

Ein besonderer Dank gebührt auch meinen Mitdotoranden Heike und Christian Geidel und natürlich Katrin Weber. Vor allem mit Katrin verbindet mich bis heute eine Freundschaft und wir hatten neben der Arbeit viel Spaß zusammen, ganz lieben Dank dafür.

Des Weiteren verdient die Eigenherstellungsabteilung der Apotheke der Uniklinik Gießen, allen voran Martina Auringer und Hannelore Kreckel ein großes Lob.

Auch meinen jetzigen Kollegen/innen der Kinderklinik Herford möchte ich für ihre unnachahmliche Art und „wertvollen“ Tips danken, mit der sie mich immer wieder zum „Weitermachen“ und „Nicht-Aufgeben“ ermuntert haben.

Zu guter Letzt aber nochmals ein ganz großes Dankeschön an meinen Mann Jens, meinen Eltern Elke und Arie Moerkerk sowie den Rest der Großfamilie Bergmann/Moerkerk, die immer ein offenes Ohr für mich während der Zeit meines Studiums, der Promotion und meines beruflichen Werdeganges hatten und mich sowohl tatkräftig als auch seelisch unterstützt haben.

