

Optimierung der Mukoviszidose-Diagnostik und Überprüfung neuer Therapie-Ansätze auf
der Basis der nasalen Potentialdifferenz-Messung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Andreas Ziersch

aus

Nieder-Ohmen

Giessen 1999

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde
Funktionsbereich Pädiatrische Pneumologie und Allergologie
Leiter: Prof. Dr. Lindemann
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Lindemann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Grimminger

Tag der Disputation: 06. Dezember 1999

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Glossar	5
1	Einleitung
	6 - 14
1.1	Allgemeines
	6
1.2	Ionentransportstörungen am respiratorischen Epithel
	8
1.3	Transepitheliale Potentialdifferenz (PD)
	12
1.4	Zielsetzung
	14
2	Methodik
	15 - 52
2.1	Physiologische und pathophysiologische Grundlagen
	15
2.1.1	Unterstützung der Chlorid-Sekretion
	16
2.1.2	Blockade des Natrium-Einstroms
	17
2.2	Grundlagen der Elektroden-Technik
	19
2.3	Material- und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potentialdifferenzmessung
	21
2.4	Versuchsanordnung zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz
	23
2.4.1	Konventionelles Verfahren
	23
2.4.2	Meßaufbau des „Tholy“-Gerätes
	26

2.4.3	Aufbau und Eigenschaften früher verwendeter Elektroden	28
2.4.4	Testverfahren für die neu entwickelten Elektroden	29
2.5	Entwicklung einer Meß- und einer Referenzelektrode für das „Tholy“-Gerät	29
2.5.1	Alternative Herstellungswege	
30		
2.5.2	Isolierung der Elektroden	31
2.5.2.1	Isolierung mit Agargel-Überzug	31
2.5.2.2	Isolierung mit Silikonschlauch	32
2.5.3	Beschreibung der Herstellung des Prototyps der Meß- und Referenzelektrode	33
2.6	Vorgehen bei der Messung der transepithelialen Potentialdifferenz	37
2.7	Exemplarische Dokumentation der PD-Messung	40
2.8	Vorgehen bei der Studie	42
2.9	Pharmakologische Tests	43
2.9.1	Vorbemerkungen zur Herstellung von Inhalationslösungen	43
2.9.2	Zusammensetzung der Inhalationslösungen	44
2.9.3	Vorgehen bei den pharmakologischen Untersuchungen	45
2.9.3.1	Untersuchung der Wirkung der Medikamentenkombination von Amilorid und Fenoterol	45
2.9.3.2	Pilotstudie über die Wirksamkeit von Benzamil im Vergleich zu Amilorid	46

2.10	Untersuchungskollektive	48
2.10.1	Untersuchungskollektiv: Vergleich konventionelle Messung mit „Tholy“-Messung	48
2.10.2	Untersuchungskollektiv: Medikamentenkombination Amilorid und Fenoterol	48
2.10.3	Untersuchungskollektiv: Pilotstudie über die Wirksamkeit von Amilorid und Benzamil	50
2.11	Statistische Methoden	51
3	Ergebnisse	53 - 73
3.1	Vergleich zwischen dem konventionellen Meßverfahren und dem „Tholy“-Meßgerät, ausgestattet mit neu entwickelten Elektroden	53
3.1.1	Vergleich der PD-Werte an den einzelnen Nasenöffnungen	53
3.1.2	Vergleich der PD-Werte der gesamten Gruppe	57
3.2	Praktische Anwendung der PD-Messung	60
3.2.1	PD-Meßergebnisse von CF-Patienten und einer Kontrollgruppe	60
3.2.2	Untersuchung der Wirkung der Medikamentenkombination von Amilorid und Fenoterol	62
3.2.2.1	Ergebnisse nach der Amiloridinhalation	63
3.2.2.2	Ergebnisse nach der Fenoterolinhalation	66
3.3	Ergebnisse der Pilotstudie zur Wirksamkeit und Wirkdauer von Amilorid und Benzamil	68

4	Diskussion	74 - 90
4.1	Allgemeines zur PD-Messung	74
4.2	Entwicklung von neuen Elektroden für das PD-Meßgerät „Tholy“	76
4.2.1	Probleme mit den alten Elektroden	76
4.2.2	Vorteile subkutaner Elektroden sowie notwendige Modifikationen	76
4.2.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Nutzung der neu entwickelten Elektroden	79
4.3	Pharmakologische Untersuchungen	80
4.3.1	Allgemeines	80
4.3.2	Pharmakologische und diagnostische Ansätze	81
4.3.3	Ausgangspunkt: Eigene Sollwert- und Grenzwertbereiche; Erklärungen und Ursachen für Grenzbefunde	83
4.3.4	Einfluß von Amilorid und Fenoterol auf die PD-Ausgangswerte	84
4.4	Pilotstudie über die Wirksamkeit von Benzamil im Vergleich zu Amilorid	87
5	Zusammenfassung	91 - 93
6	Literaturverzeichnis	94 - 112

Glossar

Amilorid	= Amiloridhydrochloriddihydrat
apikal	= lumenwärtige Seite der Luftwegsmukosa
ATP	= Adenosintriphosphat
basal	= zur Submukosa gerichtete Seite der Luftwegsmukosa
c-AMP	= zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	= Mukoviszidose
CFTR	= Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Δ PD%	= initiale PD-Senkung nach nasaler Inhalation eines Medikaments
EIPA	= 5-(N- Ethyl-N-Isopropyl)-Amilorid
et. al	= und Mitarbeiter (et altera)
Gesunde	= Nicht-Mukoviszidose-Patienten, Patienten des Zentrums für Kinderheilkunde und gesunde Probanden
I_{sc}	= Kurzschlußstrom
M	= Molarität
mV	= Millivolt
PD	= Transepitheliale Potentialdifferenz
$t_{1/2}$	= Halbwertszeit
UTP	= Uridintriphosphat
WZ50	= Zeitpunkt zu dem die PD-Werte 50 % der Ausgangswerte wieder erreicht haben

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Mukoviszidose, auch als Zystische Fibrose (CF) bezeichnet, ist mit einer Prävalenz von 1:1500-2000 aller Lebendgeborenen in Mitteleuropa und den USA eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselkrankheiten unserer Zeit [40, 116].

Bereits aus dem Mittelalter sind erste Beobachtungen bekannt, die einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Schweißdrüsenfunktion und einer verkürzten Lebensdauer beschreiben: „ Das Kind stirbt bald wieder, dessen Stirne beim Küssen salzig schmeckt “ [152].

Die Bezeichnung „ Mukoviszidose “ (lat. mucus = Schleim und viscidus = zäh) geht auf Faber zurück [44].

Seit 1985 ist bekannt, daß das Mukoviszidose-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert ist [86, 141]. Von einer kanadischen Arbeitsgruppe wurde der genetische Defekt der Erkrankung 1989 präzisiert [69, 113, 115].

Es liegt allerdings kein einheitlicher Gendefekt vor, und es sind in der Zwischenzeit, durch Sequenzanalysen des Gens, mehr als 800 Mutationen bekannt, die mit den Krankheitssymptomen der Mukoviszidose korrelieren [Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium 4 / 1999].

Mittlerweile weiß man auch, daß der Genlocus aus 27 Exons und 230 Kilobasen besteht [69, 113, 115, 54].

Mit ca. 70 - 75 % ist in Mitteleuropa und den USA die häufigste Mutation eine Deletion der Aminosäure Phenylalanin in der Position 508 des Genproduktes [69, 117, 54].

Folge des Gendefektes ist eine fehlerhafte Synthese des sogenannten CFTR-Membrantransportproteins (CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), welches zu einer Permeabilitätsstörung von Ionen führt [46, 132, 130]. Das CFTR-Membranprotein fungiert nach heutigen Erkenntnissen als ein durch zyklisches Adenosinmonophosphat aktivierbarer Chlorid-Kanal (vgl. Abb. 1) [5].

Die Ionentransportstörungen wirken sich an den verschiedenen Organen unterschiedlich aus [46, 129]. So erklärt sich auch die erstmals von *Di Sant`Agnese* 1953 beschriebene abnorme Elektrolytzusammensetzung des Schweißes, die typisch für Mukoviszidose-Patienten ist [39]. Dabei wird aus dem salzhaltigen Primärschweiß in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen von CF-Patienten kaum NaCl rückresorbiert, so daß der Verlust an Natrium- und Chlorid-Ionen wesentlich höher ist als bei Gesunden [49, 12, 13, 109].

Noch heute wird die Analyse des Natrium- und Chlorionengehaltes im Schweiß nach Stimulation mit Pilocarpin zur Diagnostik der Mukoviszidose herangezogen. Dieser „Schweißtest“ wurde von *Gibson und Cooke* 1959 entwickelt [49]. In der Zwischenzeit ist jedoch auch bekannt, daß mit normalen Resultaten der Schweißanalyse eine Mukoviszidose nicht verlässlich auszuschließen ist [149, 57, 37].

1981 entwickelte die Arbeitsgruppe um *Knowles* ein weiteres Verfahren zum Ausschluß einer Mukoviszidose, die sogenannte nasale transepitheliale Potentialdifferenz-Messung [75, 77], und mit der Lokalisation des Gendefektes ist durch die DNA-Analyse eine weitere diagnostische Möglichkeit hinzu gekommen, die Erkrankung nachzuweisen [119].

Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich auf die Pathomechanismen am respiratorischen Epithel beziehen, konzentrieren sich die folgenden Ausführungen auf die Ionentransportstörungen am Bronchialsystem bei Mukoviszidose.

1.2 Ionentransportstörungen am respiratorischen Epithel

Die Ionentransportstörungen, die bei der Erkrankung der Mukoviszidose auftreten, betreffen vor allem Natrium- und Chlorid-Ionen.

Natrium-Ionen werden von der Mukosazelle der Bronchialschleimhaut in zwei Schritten absorbiert [80]:

Zuerst werden die Natrium-Ionen aufgrund eines elektrochemischen Gradienten an der luminalen bzw. apikalen Seite der Mukosazellen in die Zelle aufgenommen. In einer zweiten Phase werden die Ionen auf der basolateralen Seite aus der Mukosazelle in das Interstitium abgegeben. Bei diesem zweiten Schritt handelt es sich um einen aktiven Prozeß, bei dem Energie erforderlich ist. Diese Energie wird mittels der Na-K-ATPase-Pumpe, die sich auf der basolateralen Seite der Mukosazellen befindet, aufgebracht (s. Abb. 1).

Chlorid-Ionen werden zur Erhaltung der Elektroneutralität sowohl durch die Mukosazelle hindurch als auch parazellulär nach apikal in das Bronchiallumen transportiert. Bei diesem Prozeß handelt es sich um einen passiven Vorgang, bei dem die Chlorid-Ionen dem Natrium-Gradienten folgen. Eine aktive Chlorid-Sekretion wird unter normalen Bedingungen in diesem Bereich nicht beobachtet [20, 78, 79].

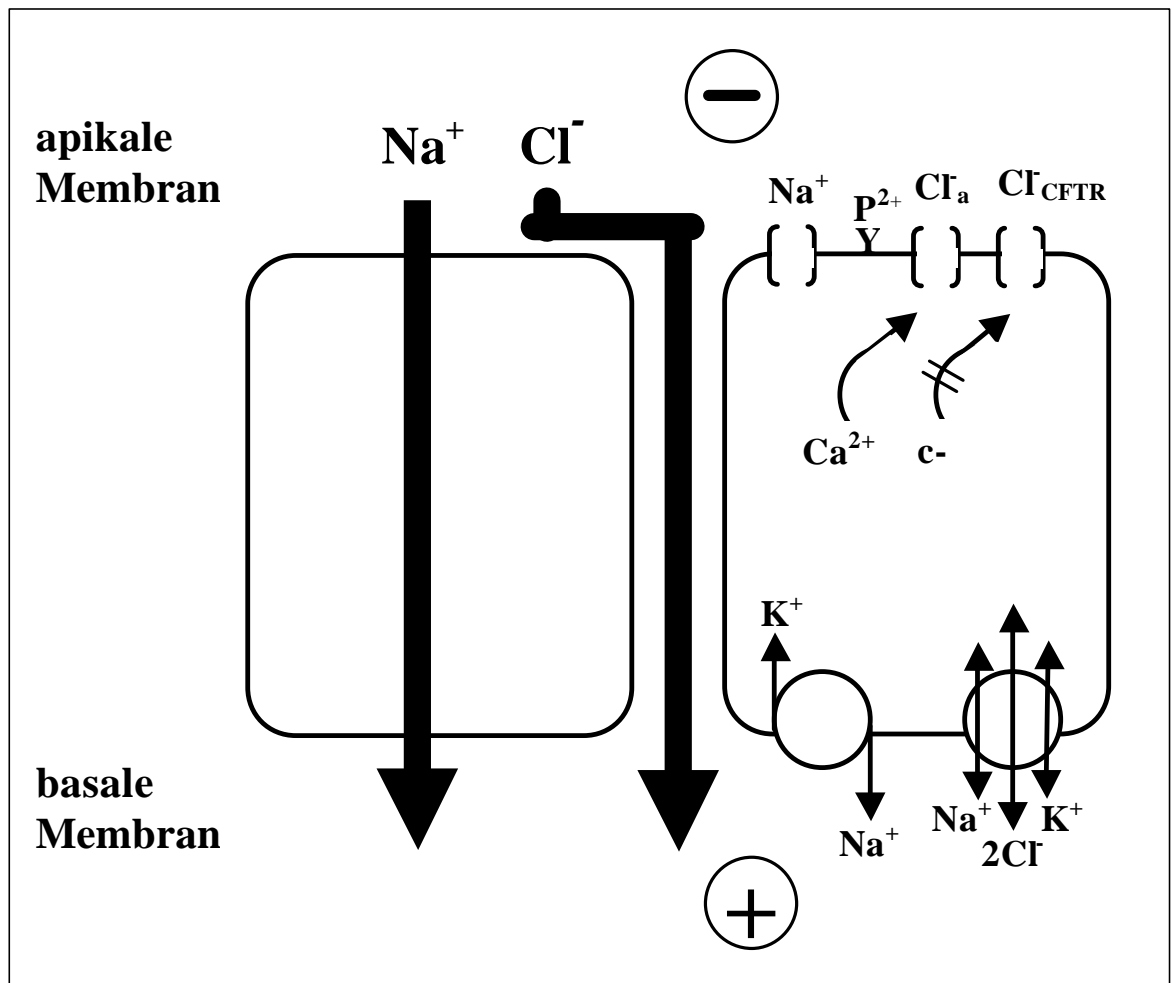


Abb. 1: Schematische Darstellung der Ionentransportstörung bei Mukoviszidose am Beispiel des respiratorischen Epithels:
 Die Chlorid-Sekretion in das Bronchiallumen über die c-AMP-regulierten CFTR-determinierten Kanäle ($\text{Cl}^-_{\text{CFTR}}$) ist defekt, die Natrium-Absorption aus dem Bronchiallumen ist gesteigert und führt zum Flüssigkeitsverlust des Bronchialsekrets. Eine unzulängliche Kompensation der Chlorid-Sekretion erfolgt durch den Ca^{2+} aktivierten („alternativen“) Kanal (Cl^-_a). [modifiziert nach Knowles et al. 1986].
 Weitere Erläuterungen im Text.

Bei der Mukoviszidose ergeben sich durch den Gendefekt nach der dominierenden Auffassung folgende pathophysiologischen Vorgänge: Die apikale Membran zum Bronchiallumen hin ist relativ impermeabel für Chlorid-Ionen und Wasser, was zu einer stark verringerten Chlorid-Sekretion führt [79, 106]. Gleichzeitig kommt es zu einer exzessiv gesteigerten Natrium-Absorption sowie zu einem transepithelialen Flüssigkeitstransport [21, 24, 87, 150, 68]. Mit dem Wasserverlust geht eine Viskositätszunahme des Bronchialsekretes einher, und die mukoziliäre Clearance ist reduziert [80, 87, 36, 128].

Die Chlorid-Undurchlässigkeit der Zellmembranen am Flimmerepithel von Mukoviszidose-Patienten ist nicht durch das völlige Fehlen von Chlorid-Kanälen bedingt, sondern in erster Linie durch eine Störung der intrazellulären Kanalaktivierung [145, 147]. Betroffen sind jedoch nur solche Chlorid-Kanäle, die per Phosphorylierung der c-AMP Moleküle gesteuert werden. Andere Chlorid-Kanäle, die über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert werden, funktionieren bei CF-Patienten genauso wie bei Gesunden und können wahrscheinlich einen Teil der defekten Chlorid-Sekretion kompensieren [5, 6]. Diese Ca^{2+} -Kanäle werden auch als „alternative“ Kanäle bezeichnet [24, 25].

Ein großer Teil des Krankheitsgeschehens der Mukoviszidose läßt sich durch diese Ionentransportstörung erklären:

Die Epithelzellen des Flimmerepithels von Mukoviszidose-Patienten sind nicht ausreichend in der Lage, Chlorid-Ionen zu sezernieren, darüber hinaus kommt es zu einer gesteigerten Natrium- und Wasser-Absorption, was wiederum zur Eindickung des Schleimes führt [46, 146, 123].

Klinisch führt der beschriebene Pathomechanismus bei Mukoviszidose-Patienten vor allem zu einer Schädigung der Lunge und des Pankreas. Durch die Viskositätszunahme des Sekretes kommt es zur Sekretretention und dadurch zur Obstruktion der Ausführungsgänge [30, 105, 85].

Im Respirationstrakt kommt es durch die reduzierte mukoziliäre Clearance zur chronischen Besiedelung mit Krankheitserregern [110]. Problemkeime wie zum Beispiel Pseudo-

monaden führen zu rezidivierenden Infektionen mit irreversibler Schädigung der Bronchialwand sowie Gewebsverlust der Lunge. Die Folge sind atelektatische, fibrotische und emphysematische Veränderungen der Gewebe. In der Spätphase der bronchopulmonalen Manifestation der Erkrankung können die Veränderungen zu Hypoxie, pulmonaler Hypertonie und Rechtsherzbelastung führen [92, 148].

Die unterschiedlichen klinischen Ausprägungen des Krankheitsbildes Mukoviszidose lassen sich auf die Vielzahl der verschiedenen Mutationen zurückführen [70]. Das Ziel der zur Zeit angewendeten Therapie ist es, die Patienten vor der Zerstörung der Atemwege durch Sekretelimination und Minderung der bakteriellen Kontamination zu schützen sowie bei bestehender Pankreasinsuffizienz die fehlenden Enzyme zu substituieren [90, 32, 98]. Bislang wurde eine kausale Therapieform für die Erkrankung jedoch noch nicht gefunden. Neben körperlichen Aktivitäten und aktiven krankengymnastischen Maßnahmen, zu denen z. B. die autogene Drainage, die PEP-Maskenatmung oder die Anwendung eines „Flutter“ gehören, stellt die Inhalationstherapie einen wichtigen Teil der Basisbehandlung dar. Der gezielte Einsatz von Antibiotika, eine antiobstruktive Therapie und eine ausreichende Kalorien- und Enzymzufuhr bei Pankreasinsuffizienz gehören zu den weiteren Maßnahmen [41].

Durch die konsequente Verbesserung der verschiedenen Therapien der Mukoviszidose-Patienten hat sich die mittlere Lebenserwartung in den letzten Jahren beträchtlich erhöht. So schätzt man das mittlere zu erwartende Alter eines jetzt geborenen Patienten auf 45-50 Jahre [41]. Vor allem eine verbesserte antibiotische Therapie und intensivierete patientengerechte Inhalations- und Physiotherapie haben zu diesen Fortschritt geführt [131, 91, 41].

1.3 Transepitheliale Potentialdifferenz (PD)

Wie auch in anderen Geweben bilden im Bereich der Nase und der Bronchien die Zellen des Flimmerepithels eine selektiv permeable Barriere für die verschiedenen Ionen und andere Bestandteile der Zellen und des Bronchialsekretes. Hauptsächlich durch aktive Ionentransporte wird die Elektrolyt-Zusammensetzung der einzelnen Kompartimente bestimmt (s. Abb. 1) [19].

Die oben beschriebenen Ionentransportvorgänge erzeugen eine meßbare Spannung, die sogenannte transepitheliale Potentialdifferenz (PD). Auch parazelluläre Ionentransportvorgänge sind an der Entstehung dieser Spannung beteiligt. Diese elektrische Spannung, in Millivolt (mV) angegeben, stellt ein durch verschiedene Ionen bedingtes Summenpotential dar und ist in Bezug auf die Submukosa lumen negativ [136, 89, 77, 78]. Die Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel von CF-Patienten wird hauptsächlich bestimmt durch die Sekretion von Chlorid-Ionen und der Absorption von Natrium-Ionen [19, 22, 100]. Prinzipiell gleiche Spannungsverhältnisse wie am respiratorischen Epithel sind am Darmepithel bekannt [137, 138, 94].

Eine deutlich erhöhte nasale transepitheliale PD ist als pathognomonisch für die Erkrankung der Mukoviszidose anzusehen, da bisher nur bei CF-Patienten erhöhte Potentialdifferenzen festgestellt wurden [121]. Die PD-Werte von heterozygoten CF-Merkmalsträgern entsprechen denen von gesunden Probanden [80].

Mittels Natrium-Kanal-Blocker (Amilorid) läßt sich eine Senkung der PD-Werte unmittelbar nach Applikation erreichen, wobei dieser Effekt bei Mukoviszidose-Patienten deutlich besser zu erkennen ist als bei gesunden Probanden. Als eine der ersten konnte die Arbeitsgruppe um *Knowles* eine PD-Absenkung bei CF-Patienten nach nasaler Superfusion von Amilorid nachweisen [77]. In der Zwischenzeit ist die Wirkung des Natrium-Kanal-Blockers auf die PD von unzähligen anderen Gruppen bestätigt worden, wobei der Einsatz in der Inhalationstherapie unterschiedlich diskutiert wird [55, 96, 52, 27, 140, 63].

Für die Erfassung der Potentiale bedient man sich verschiedener Potentialdifferenz-Messgeräte. Es gibt das zuvor bereits erwähnte Gerät von *Knowles*, bei dem die Potentiale über Fließelektroden erfaßt werden (s. Abb. 2 und 3). Ein vereinfachtes Gerät („Tholy“), wurde von der Arbeitsgruppe um *Lindemann* entwickelt (s. Abb. 4 und 5). Bei diesem Gerät werden für die Erfassung der Potentiale Silber / Silberchlorid-Elektroden eingesetzt [74, 76, 59]. Die gemessenen Spannungen bewegen sich im Bereich zwischen 0 und - 100 mV und sind definitionsgemäß lumennegativ.

Versuche der Arbeitsgruppe um *Knowles* haben gezeigt, daß das Flimmerepithel der Regio respiratoria der Nasenschleimhaut [56] qualitativ dem Flimmerepithel der Bronchialschleimhaut entspricht. Es stellt sich heraus, daß vor allem die Plazierung der Meßelektrode am respiratorischen Flimmerepithel der Nase unterhalb der Concha inferior ebenso gut geeignet ist wie am Flimmerepithel der Bronchialschleimhaut. Dies hat den großen Vorteil, daß dieser Meßort relativ einfach zu erreichen ist und so die Objektivierung der Veränderungen der PD-Werte nach lokaler medikamentöser Beeinflussung erleichtert [75, 78].

Die Potentialdifferenz-Messung stellt eine gut reproduzierbare und wenig invasive Meßmethode zur Objektivierung der Ionentransportstörungen bei Mukoviszidose dar. Das Verfahren ist in den letzten Jahren zu einem wichtigen Bestandteil in der Diagnosestellung bei der Mukoviszidose geworden, nicht zuletzt durch seine einfache und patientenfreundliche Bedienungsweise. Zusätzlich besondere Bedeutung hat dieses Verfahren erlangt, seit bekannt ist, daß es einige Mutationsformen bei dieser Erkrankung gibt, bei denen der Schweißtest negativ ausfällt, die PD-Werte und gegebenenfalls der Gentest jedoch im pathologischen Bereich liegen [126, 57, 37].

1.4 Zielsetzung

Bei dem nach *Hofmann* [59] entwickelten vereinfachten PD-Meßgerät „Tholy“ zeigte sich über eine längere Anwendungszeit, daß die bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Meß- und Referenzelektroden für den Einsatz in der Praxis nicht geeignet waren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, stabile Elektroden, d.h. sowohl Meßelektroden als auch Referenzelektroden, für das vereinfachte PD-Meßgerät „Tholy“ zu entwickeln, die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse zu prüfen und die Meßwerte mit denjenigen der konventionellen Meßmethode zu vergleichen.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit befaßte sich mit Fragestellungen der Wirksamkeit verschiedener Medikamente und Medikamentenkombinationen auf die nasale trans-epitheliale Potentialdifferenz bei Mukoviszidose-Patienten.

Insbesondere sollten in der vorliegenden Arbeit erste Untersuchungen zu dem Problemkreis durchgeführt werden, welche Auswirkungen die Kombination eines Natrium-Kanal-Blockers (Amilorid) mit einem β_2 -Mimetikum (Fenoterol) auf die PD-Werte hat und inwieweit die Ergebnisse für diagnostische und therapeutische Anwendungen bei CF-Patienten einsetzbar sind.

Darüber hinaus wurde anhand der PD-Messung in einer Pilotstudie, im Hinblick auf einen möglichen neuen Therapieansatz, die Wirksamkeit und Wirkungsdauer von zwei inhalativ verabreichten Natrium-blockierenden Medikamenten (Amilorid und Benzamil) an der Nasenschleimhaut von Mukoviszidose-Patienten miteinander verglichen.

2 Methodik

2.1 Physiologische und pathophysiologische Grundlagen

Allgemeines:

Wie eingangs beschrieben wurde, resultiert die Spannung, die bei der nasalen transepithelialen Potentialdifferenzmessung gemessen wird, aus Ionentransportvorgängen, die zum einen aktiv, zum anderen passiv über die Zellen ablaufen.

Von einigen Forschungsgruppen konnte aufgezeigt werden, daß die Submukosa der gesamten Luftwegsepithelien isoelektrisch mit der Subkutis ist [75, 4, 31]. Daher ist es möglich, die Referenz der transepithelialen Potentialdifferenz subkutan von einer gut zugänglichen Stelle des menschlichen Körpers abzugreifen (vgl. Abb. 1).

Die ersten *in vivo* Messungen der Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel des Menschen wurden von der Arbeitsgruppe um *Knowles* vorgenommen [74, 76]. Früh erkannte man, daß am Flimmerepithel gesunder Probanden eine deutlich niedrigere PD zu messen war als bei Mukoviszidose-Patienten.

Dafür verantwortlich gemacht wird die bei CF-Patienten zuvor beschriebene exzessiv gesteigerte Natrium-Absorption. Der Verlust von positiven Valenzen auf der luminalen Seite führt zu einer größeren Negativierung der PD-Werte im Vergleich zum Interstitium als es bei Gesunden der Fall ist, d.h. die Werte von Mukoviszidose-Patienten sind stärker negativ als die von Nicht-CF-Patienten.

Knowles beschreibt eine direkte Korrelation zwischen der Natrium-Absorption in die Zelle und einer erhöhten Potentialdifferenz [74].

Durch die bei der Mukoviszidose genetisch determinierte Ionentransportstörung und die damit verbundene unterschiedliche Zusammensetzung des luminalen Sekretes ist somit eine

diagnostische Unterscheidung zwischen CF-Patienten und Nicht-CF-Patienten mit der PD-Messung grundsätzlich möglich [24, 25].

Die heutigen Vorstellungen über die Ionentransportvorgänge am respiratorischen Epithel von Mukoviszidose-Patienten sowie von Gesunden wurden in Kapitel 1.2 bereits ausführlich dargestellt (vgl. Abb. 1).

Auf Grund der großen Anzahl verschiedener Ionenkanäle bestehen unterschiedliche Möglichkeiten, die Potentialdifferenz des respiratorischen Epithels pharmakologisch zu beeinflussen. Die wichtigsten Möglichkeiten, die PD und damit die Ionenzusammensetzung zu verändern, werden nun im einzelnen besprochen.

2.1.1 Unterstützung der Chlorid-Sekretion

Durch Beta-2-Sympathomimetika läßt sich über die Aktivierung der Adenylatzyklase und des zyklischen Adenosinmonophosphates bei *gesunden* Probanden eine Stimulation der Chlorid-Sekretion erzielen [20, 25, 33]. Bei *Mukoviszidose*-Patienten gelang eine Öffnung dieser Kanäle durch diese Medikamentengruppe in der Regel jedoch nicht [45, 82].

Grundsätzlich ist es bisher weder durch einen physiologischen adrenergen Reiz, noch durch eine andere Stimulation gelungen, die Chloridkanäle von CF-Patienten langfristig zu öffnen, d.h. es existiert derzeit kein Medikament, welches in der Lage wäre, die gestörte intrazelluläre Signalübertragung der apikalen epithelialen Chloridkanäle von Mukoviszidose-Patienten zu normalisieren [45, 23].

Nur das Isolieren der Epithelzellen aus dem Zellverband und eine Depolarisation des Zellmaterials bewirken eine Öffnung der von zyklischem Adenosinmonophosphat abhängigen Chloridkanäle [143, 145, 23].

Neuere Studien befassen sich auch mit der medikamentösen Beeinflussung Kalzium-regulierter Ionenkanäle. Durch die lokale Applikation von aerosolisiertem UTP (Uridintriphosphat) und ATP (Adenosintriphosphat) kann eine vorübergehende apikale Chlorid-Sekretion an diesen Kalzium-regulierten Ionenkanälen über die Aktivierung von purinergen Rezeptoren induziert werden. Entscheidender Nachteil von UTP ist die kurze Wirkdauer.

Zudem ist die Anwendung von UTP in Europa am Menschen nicht zugelassen. Die Kombination von UTP und Amilorid scheint allerdings mehr Erfolg zu versprechen [24, 25, 103, 111].

2.1.2 Blockade des Natrium-Einstroms

Eine seit längerem bekannte Möglichkeit der Beeinflussung der Ionenströme besteht in der Hemmung der Natrium-Kanäle. Natrium-Kanal-blockierende Substanzen hemmen selektiv den Einstrom von Natrium-Ionen in die Epithelzellen, beispielsweise nach nasaler, inhalativer Applikation. Damit werden den für Mukoviszidose typischen Ionentransportstörungen, die sich am respiratorischen Epithel neben der Hemmung der Chlorionen-Sekretion vor allem in Form einer gesteigerten Natrium-Absorption bemerkbar machen, durch die Gabe dieser Hemmstoffe entgegengewirkt [76, 24, 25].

Durch das Verbleiben der Natrium-Ionen auf der luminalen Seite des Flimmerepithels kommt es zu einer Erhöhung der positiven Ladung in diesem Bereich, was eine Verringerung der PD-Werte zur Folge hat [121, 125].

Für die klinische Anwendung ist zur Zeit nur *Amilorid* zugelassen. Chemisch handelt es sich um N-amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-carboxamid, es gehört somit zu den Cycloamidinen. Amilorid blockiert den Natrium-Kanal schnell und reversibel, wobei seine Affinität zu diesen Kanälen eher gering ausgeprägt ist (s. u.). Amilorid und Natrium wirken am Natrium-Kanal wie schnelle Kompetitoren [73]. Der genaue Blockierungsmechanismus und die exakte Bindungsstelle für Amilorid sind jedoch noch unaufgeklärt .

Amilorid ist als Kalium-sparendes Diuretikum seit längerem bekannt. Es blockiert im Urogenitalsystem die Natrium-Reabsorption im distalen Tubulus und vermindert das transepitheliale Potentialgefälle. Die passiv ablaufende Kalium-Exkretion wird auf Grund dieses Pathomechanismus verringert [67, 73]. Wegen seiner schwachen diuretischen Wirkung wird es ausschließlich in Kombinationspräparaten verwendet.

Wie bereits erwähnt, kommt es nach inhalativer Applikation von Amilorid zu einer Absenkung der PD-Werte. Dieser Effekt kann sowohl bei Mukoviszidose-Patienten, als

auch bei Nicht-CF-Patienten beobachtet werden. Wichtiger als die Absenkung der PD-Werte an sich ist für klinische Belange die Auswirkung des Medikamentes auf die Zusammensetzung und die Konsistenz des Bronchialsekretes. Durch die Natrium-Kanal-Blockade steigt im Mukus der Natrium- und Wassergehalt an. Die Viskosität und Elastizität des Sekretes werden verbessert und die mukoziliäre Clearance kann dadurch gesteigert werden [87, 90, 8, 81, 96].

Ferner wird berichtet, daß Amilorid eine Erhöhung der Zilienschlagfrequenz am Flimmerepithel bewirkt, und auch eine antimikrobiellen Wirkung hat [10, 32].

Neben der Ausgangssubstanz Amilorid existieren noch mehrere chemisch modifizierte Analoga. Die in physiologischen Labors am häufigsten verwendeten Amilorid-Analoga sind Benzamil, Phenamil und EIPA [34].

Im Tierphysiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde an Gewebepräparaten der Nasenschleimhaut von CF-Patienten und Nicht-CF-Patienten die Inhibierungspotenz von Amilorid und seinen Analoga auf den Natriumeinstrom getestet. Einige der dort gewonnenen Erkenntnisse waren der Anlaß für die Benzamil-Studie in der vorliegenden Arbeit [153, 151, 14].

Unter anderem konnte an ausdifferenzierten Gewebekulturen von Flimmerepithel im Vergleich zu Amilorid eine 1000-fach höhere Affinität von Benzamil zu den Natrium-Kanälen festgestellt werden. Es zeigte sich, daß Benzamil mit einer halbmaximalen Blockerkonzentration von wenigen nM, um ein Vielfaches effektiver als Amilorid wirkt [15].

Die Wirkung von Benzamil auf den epithelialen Natrium-Kanal menschlicher Nasenschleimhaut von Gesunden und Mukoviszidose-Patienten erwies sich wie bei Amilorid als vollkommen reversibel [16].

Daher stellte sich die Frage, ob Benzamil *in vivo* nicht eine bessere Wirksamkeit entfalten könnte als das zur Zeit in der Aerosolbehandlung eingesetzte Amilorid.

2.2 Grundlagen der Elektroden-Technik

Der Transfer von Ionenleitungen im Gewebe zur metallischen Elektronenleitung geschieht in der Regel unter Verwendung von Elektroden. Für das Abgreifen dieser bioelektrischen Signale stehen sowohl Oberflächenelektroden als auch subkutan bzw. intravenös zu platzierende Elektroden zur Verfügung. Die Elektroden bestehen zumeist aus einer Meß- und einer Referenzelektrode. Beide zusammen werden auch als Meßkette bezeichnet [42]. Das Ableiten der Signale von der Körperoberfläche hat den Vorteil, daß es zu keiner Gewebsschädigung kommt. Der Vorteil subkutaner / intravenöser Elektroden besteht darin, daß das Milieu im menschlichen Körper zumeist sehr konstant gehalten wird und die Signale, die erfaßt werden sollen, weniger stark äußeren Einflüssen ausgesetzt sind.

Charakteristisch für Elektroden ist die Verbindung eines Metalls mit einem Elektrolyten [108, 42]. Für die Qualität der Übertragung sind verschiedene Faktoren wichtig, so zum Beispiel der Metall-Elektrolyt-Übergang, der Elektrolyt-Haut-Übergang und die Zusammensetzung des Elektrolyten (z.B. Elektrodengel) [89, 53].

Am Metall-Elektrolyt-Übergang entsteht zumeist eine geringe Spannung, welche als „Offset-Potential“ oder „Halbzellen-Potential“ bezeichnet wird. Diese Spannung kommt zustande, einerseits durch den Übertritt von Ionen aus der Elektrode in die Lösung und andererseits durch das Übertreten von Ionen aus dem elektrolythaltigen Gel in die Elektrode [72]. Sie entspricht dem Elektrodenpotential des Metalls in Referenz zur Wasserstoff-Normalelektrode [47, 53]. Unter der Verwendung von Silber / Silberchlorid-Elektroden ist das geringste Elektrodenpotential zu beobachten. Elektroden aus Quecksilber-Quecksilber I-chlorid (Kalomel-Elektroden) oder Zink / Zinksulfat weisen ähnliche Elektrodeneigenschaften auf, haben aber den Nachteil, daß sie toxisch auf den menschlichen Organismus einwirken können und empfindlicher gegenüber Temperaturschwankungen sind [28]. Diese Formen der Elektroden, die aus einem Metall und einem schwerlöslichen Salz desselben Metalles bestehen, werden auch als Elektroden „zweiter Art“ bezeichnet [53]. Wird für Meß- und Referenzelektrode das gleiche Material verwendet, so ist das Potential, das sich zwischen den einzelnen Elektroden aufbaut, geringer als bei der Verwendung von

Elektroden verschiedener Materialien. Silber / Silberchlorid-Elektroden sind die am weitest verbreiteten Elektroden [89, 101].

Die Verwendung von Silber / Silberchlorid-Elektroden bietet sich auch aus einem weiteren Grund an, denn diese Elektroden polarisieren *nicht*. Polarisieren bedeutet, daß ein durch die Elektrode fließender Strom das Potential verändern kann. Dies ist bei der Silber / Silberchlorid-Elektrode nicht der Fall [139, 29].

Die Silber / Silberchlorid-Elektrode wird durch Elektrolyse hergestellt, wobei Feinsilber unter Spannung chloriert wird. Der Sinn der Chlorierung besteht in der Reduzierung der Eigenimpedanz der Elektrode auf ein Minimum [48, 28].

Dadurch, daß die Elektrode mit einer Schicht eines unlöslichen Elektrolyten überzogen wird, entsteht aus dem metallischen Silber und dem zugehörigen Metallsalz eine unpolarisierbare Elektrode. Dies bedeutet, daß bei Stromdurchgang durch ein unpolarisierbares Elektrodenpaar an der Kathode das vorhandene Metallsalz zu Metall reduziert wird und an der Anode das metallische Silber in sein zugehöriges Metallsalz überführt wird. Bei der Silber / Silberchlorid-Elektrode treten dabei nur minimale widerstands- oder spannungswirksame Veränderungen auf [89, 133, 42].

2.3 Material- und Gerätebeschreibung zur transepithelialen Potentialdifferenzmessung

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

- Millivoltmeter der Wissenschaftlichen-Technischen Werkstätten GmbH, WTW PH 530, Weilheim
- 2 Silberchlorid-Elektroden: Standardbezugselektrode Typ 373 von Ingold GmbH, PH-Meßtechnik, Steinbach i. Taunus
- 2 Infusionspumpen, Typ Injektomat der Firma Fresenius
- 50 ml Injektomat-Spritzen
- Injektomat-Leitungssysteme
- 3-Wege-Hähne
- Venenverweilkanüle, Typ Surflo 24G
- Nabelarterienkatheter, Typ Argyle 3,5 Ch x 38 cm
- 2 Agargelbrücken in Plastikschläuchen, gefüllt mit isotonischer Kochsalzlösung in Hochagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Agargelbrücken in U-förmigen Glasröhrchen, gefüllt mit 3-molarer KCl-Lösung in Hochagar der Firma Difco, Augsburg
- 2 Erlenmeyerkolben (Weithals) 200 ml mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllt, passende Kautschukstopfen mit Bohrungen
- 100 ml Fläschchen isotonischer Kochsalzlösung
- Pflaster zur Fixierung der Verweilkanüle
- Kaltlichtquelle der Firma Storz, Typ 559
- Glasfaserkabel der Firma Storz
- Konnektierbares Nasenspekulum mit Fiberglas-Lichtträger, 13,5 cm
- Nasenspekulum nach HALLE-TIECK für Kleinkinder, 13 cm
- Zweikanalschreiber Philips Two Line PM 8272

- KCl-haltiges EKG-Elektrodengel, Firma Hellige
- PD-Meßgerät „Tholy“, mit Meßgriffel für die Aufnahme der Meßelektrode und einem Verbindungskabel für den Anschluß der Referenzelektrode mittels Bananenstecker; Firma Medicap, Ulrichstein

Material zur Herstellung der Elektroden:

- Silberdraht rein; Durchmesser: 0,7 mm und 0,3 mm
- HCl- Lösung 1mol
- Chromschwefelsäure
- Salpetersäure 65 %
- Konstantstromquelle
- Zirkonoxid-Yttrium stabilisiertes Keramik Diaphragma der Firma Juchheim, Fulda, mit einer Porosität von 34 ± 6 %
- Silikonschlauch: Innendurchmesser 1mm, Wandstärke 0,2 mm
- Teflon-Schrumpfschlauch
- Silikonkleber
- Mini-Einpressbuchse
- Ethanol 80 %
- Silberchloridpulver
- Kunststoffbehälter aus Polycarbonat

2.4 Versuchsanordnung zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz

2.4.1 Konventionelles Verfahren

Zur Messung der Potentialdifferenz wurden ein hochohmiges Voltmeter (WTW PH 530) mit 2 Silberchloridelektroden (Standardbezugselektroden) und einem Y/t-Schreiber (Philips Two Line PM 8272) verschaltet. Diese Silberchloridelektroden wurden jeweils in einen mit 3-molarer Kaliumchloridlösung gefüllten Erlenmeyerkolben eingeführt; das Gefäß wurde mit entsprechend vorgebohrten, verdunstungsdichten Gummistopfen verschlossen. Zwei U-förmig gebogene Glasröhrchen, mit 5 mm Innendurchmesser, wurden mit Agargel gefüllt und jeweils ein Schenkel in die beiden Erlenmeyerkolben eingeführt. Der zweite Schenkel, der mit 3-molarer KCl-Lösung angesetzten Agargelbrücken, mündete jeweils in einem 100 ml Fläschchen mit isotonischer Kochsalzlösung. Diese beiden zum Versuchsaufbau gehörenden Fläschchen enthielten ferner eine zweite mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Agargelbrücke, die aus mit Hochagar befüllten Kunststoffschläuchen bestand. Die Enden dieser Agargelbrücken wurden mit dem Seitenanschluß eines Dreiwegehahns gekoppelt.

Weiterhin waren je zwei Injectomat-Infusionsschläuche mit diesen 3-Wege-Hähnen verbunden. Beide Injectomat-Infusionsschläuche waren an 50 ml Injektomat-Injektomatspritzen angeschlossen, die isotonische Kochsalzlösung aus einer Infusionspumpe durch die Schläuche förderte. Das Ende der Schläuche wurde, entsprechend dem Verwendungszweck, entweder mit der Meßelektrode oder der Referenzelektrode konnektiert (s. Abb. 2 und 3).

Als Meßelektrode diente ein Nabelarterienkatheter (Argyle 3,5 Ch x 38 cm) und als Referenzelektrode diente eine kleinkalibrige Venenverweilkanüle (surflo 24 G).

Die Verschaltung und Anordnung der Gelbrücken, Lösungen und Elektroden geht in dieser Form auf die Arbeitsgruppe um *Boucher* zurück [19].

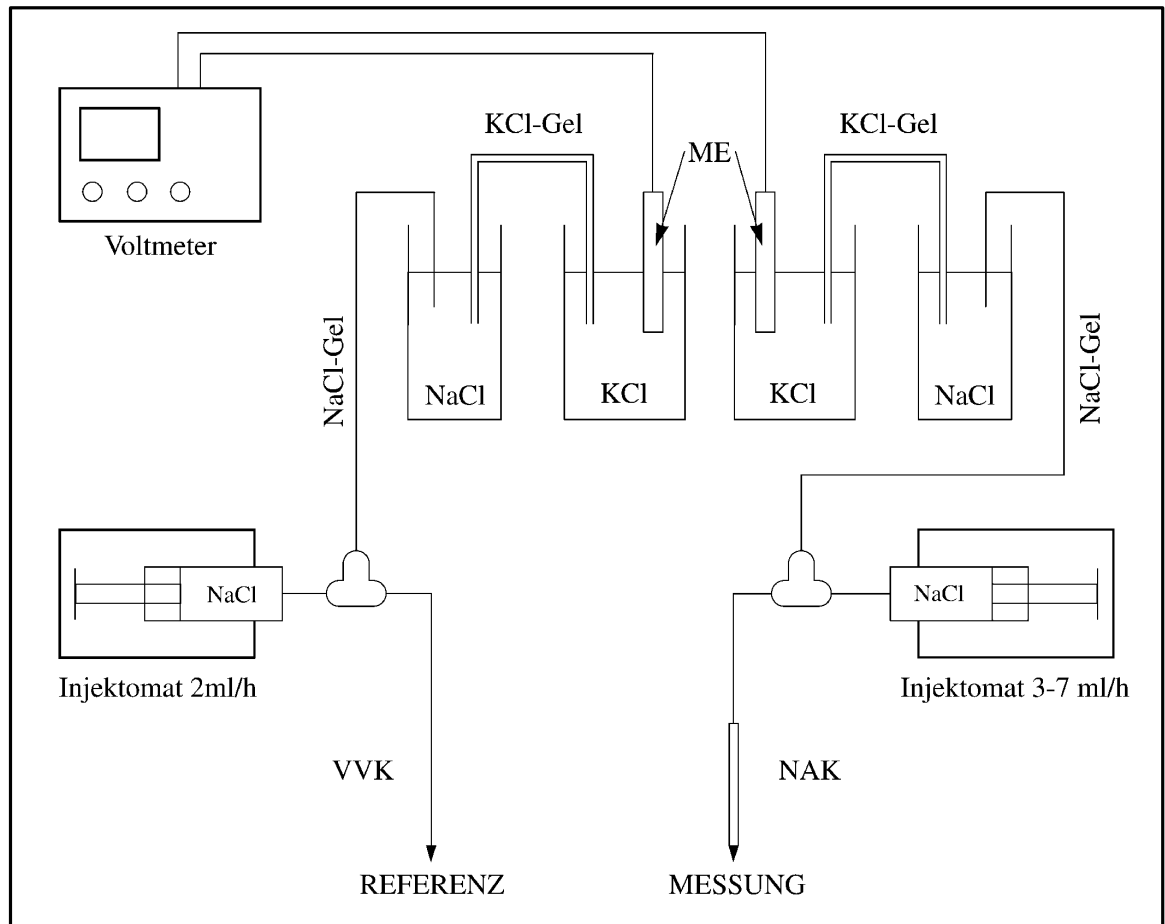


Abb. 2: Schematische Darstellung des konventionellen Versuchsaufbau zur transepithelialen Potentialdifferenz-Messung (PD).

- KCl-Gel: Agargelbrücke mit 3-molarer Kaliumchloridlösung gefüllt in ein U-förmiges Glasröhrchen
 NaCl-Gel: Agargelbrücke mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt in eine Infusionsleitung
 ME: Silberchlorid-Meßelectrode
 VVK: Venenverweilkanüle = Referenzelectrode
 NAK: Nabelarterienkatheter = Meßelectrode



Abb. 3: Fotografische Aufnahme des konventionellen Meßaufbau zur Bestimmung der transepithelialen Potentialdifferenz aus dem PD-Labor der Universitäts-Kinderklinik Giessen.

2.4.2 Meßaufbau des „Tholy“-Gerätes

Das Prinzip des vereinfachten PD-Meßgerätes beruht auf der direkten Verkabelung eines hochohmigen Voltmeters mit einer Meßelektrode und einer feststehenden Referenzelektrode, wodurch die transepitheliale Potentialdifferenz einfacher gemessen werden kann. Bei dem zur Verfügung stehenden vereinfachten Potentialdifferenz-Meßgerät handelte es sich um ein von *Hofmann et al.* entwickeltes PD-Meßgerät, welches in Zusammenarbeit mit der Firma Medicap zu dem für diese Arbeit verwendeten Gerät weiterentwickelt wurde (s. Abb. 4) [58. 59].

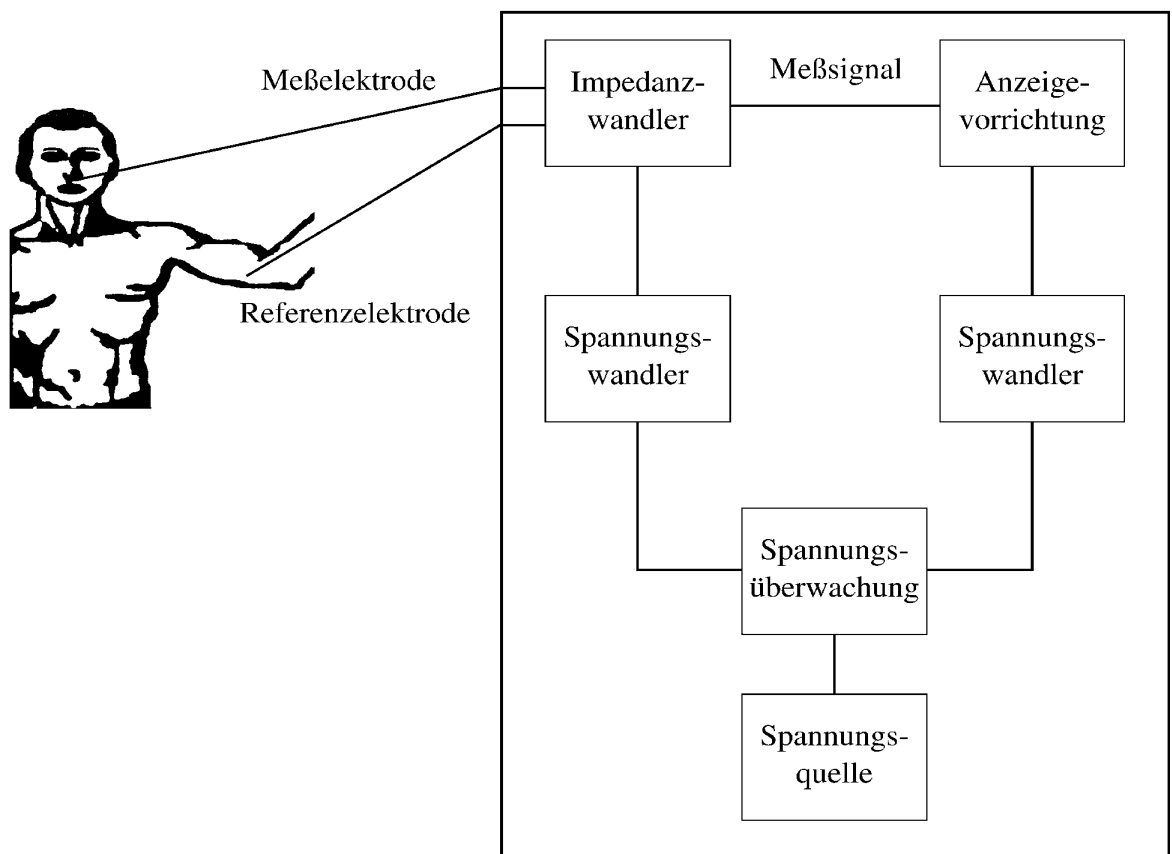


Abb. 4: Schematische Darstellung des vereinfachten Potentialdifferenz-Meßgerätes („Tholy“).

Das endgültige Modell des „Tholy“-PD-Meßgerätes beinhaltet einen mikroprozessor-gesteuerten Meßwertaufnehmer mit integriertem Meßwertspeicher, sowie einen Thermodrucker zur Dokumentation der aufgenommenen Meßwerte. Ein Griffel zur Aufnahme der Meßelektrode und ein Verbindungskabel für den Anschluß der Referenzelektrode sind daran angeschlossen (s. Abb. 5).

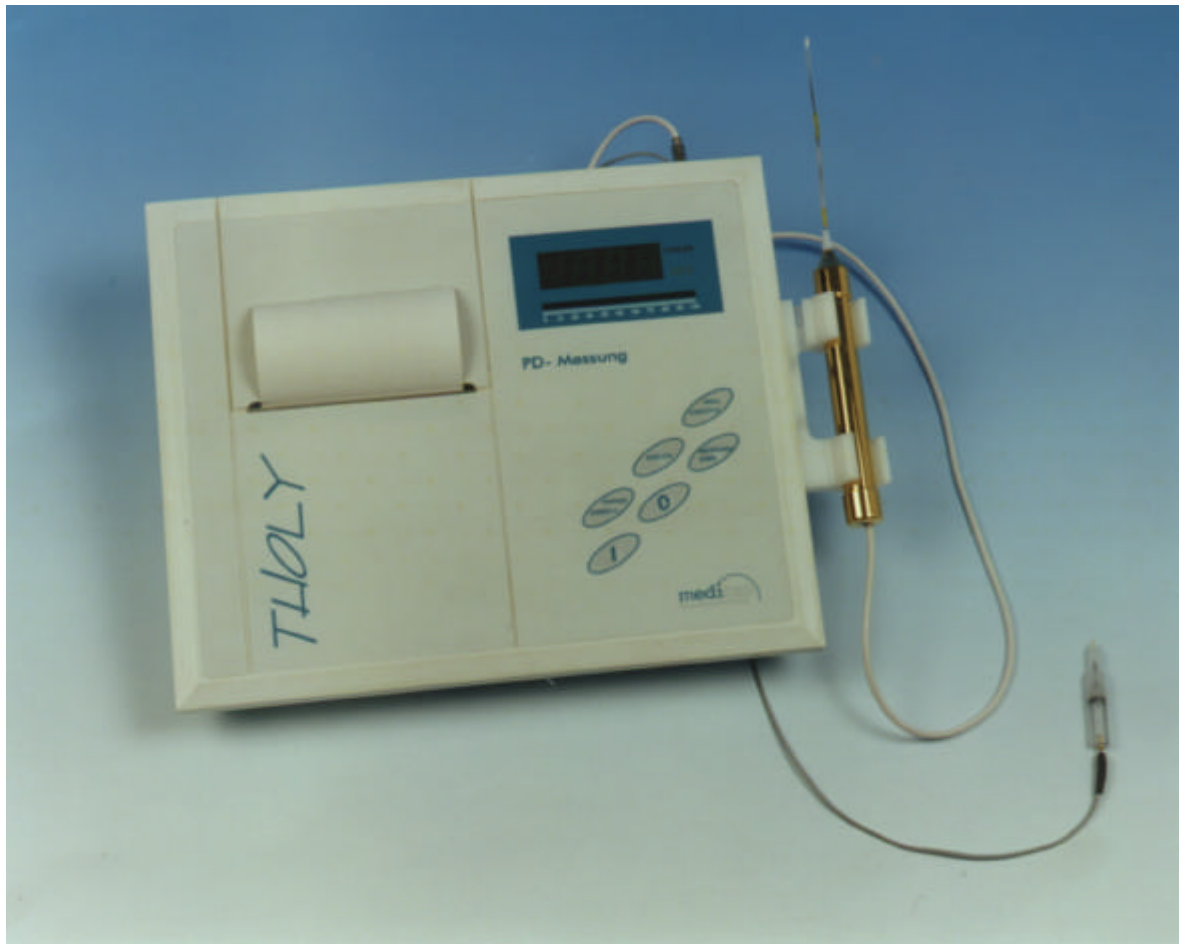


Abb. 5: Fotografische Aufnahme des vereinfachten PD-Meßgerätes „Tholy“.

2.4.3 Aufbau und Eigenschaften früher verwendeter Elektroden

Bei den bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Elektroden des PD-Meßgerätes „Tholy“ handelte es sich um eine ca. 15 cm lange, in Sonderfertigung hergestellte Silber / Silberchlorid Elektrode und eine handelsübliche EKG-Klebelektrode (Ag / AgCl), die als Referenzelektrode, epikutan am rechten Unterarm plaziert wurde [62].

Herstellung der früher verwendeten Meßelektrode

Ein ca. 15 cm langer Silberdraht wurde an der Spitze zu einer Kugel geschmolzen. Der so entstandene Rohling wurde mit einem alternierenden Elektrolyseverfahren, bei einer Gleichspannung von 5 Volt, in zwei-molarer HCl-Lösung chloriert. Das alternierende Elektrolyseverfahren, d.h. die Umpolungen, dienten der Reduktion von Polarisierungseffekten [58].

Verhalten der früher verwendeten Elektroden

Wie bereits dargestellt, lieferte diese Zusammensetzung von Meß- und Referenzelektrode im Vergleich zur konventionellen Meßmethode zwar korrekte Spannungswerte, jedoch zeigten die Elektroden nach kurzer Zeit die Tendenz, Potentiale teilweise in den positiven oder in den negativen Meßbereich auszubilden. Die sich aufbauenden Potentiale zeigten keine Konstanz, d.h. es war weder möglich, eine Voraussage zu treffen, in welche Richtung sich die Potentiale aufbauten, noch wie stark die Ausprägung der Meßwerte sein würden. Ein Subtrahieren, bzw. Addieren, wie es bei einer bekannten und definierten Störgröße anwendbar ist, war bei diesen Potentialen somit nicht möglich [42].

2.4.4 Testverfahren für die neu entwickelten Elektroden

Um vor einer Messung die Funktionstüchtigkeit und Stabilität der verwendeten Elektroden zu überprüfen, wurde die Kurzschlußspannung per Nullabgleich ermittelt. Nullabgleich bedeutete in diesem Zusammenhang, daß man Meß- und Referenzelektrode in direkten Kontakt brachte. Bei vollständiger Leitfähigkeit des Systems zeigte das Voltmeter keine Spannung an; die verwendeten Elektroden wurden dann als funktionstüchtig angesehen. Diese Methode des Nullabgleichs diente im weiteren Verlauf der Elektrodenentwicklung als erstes Testverfahren für die Stabilität und damit die Verwendbarkeit der neu entwickelten Elektroden. Erst nachdem diese bei der Nullabgleichsmessung keine oder nur noch sehr geringe und konstante Spannungswerte aufzeigten, wurden sie auch bei Messungen an Patienten getestet.

2.5 Entwicklung einer Meß- und einer Referenzelektrode für das „Tholy“-Gerät.

Zu Beginn der Entwicklung neuer Elektroden wurden die bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Elektroden mit dem zuvor beschriebenen Nullabgleichsverfahren ausgetestet. Dabei zeigte sich, daß die Meßwerte für einen längeren Zeitraum stabil waren, wenn anstelle der EKG-Klebelektrode zwei Meßelektroden miteinander kurzgeschlossen wurden. Aus dieser Erkenntnis heraus entstand der Entschluß, von der EKG-Klebelektrode abzurücken und eine eigene Referenzelektrode herzustellen. In verschiedenen Untersuchungen mit *epikutaner* Referenz traten Schwierigkeiten bei der Herstellung und der Anwendung dieser Elektroden auf, so daß die Planung bei der Neuentwicklung auf eine *subkutane* Referenzelektrode ausgelegt wurde [75, 3, 59]

2.5.1 Alternative Herstellungswege

Um ein alternatives Herstellungsverfahren für die Elektroden zu finden, wurden einzelne Schritte der bisherigen Elektrodenherstellung verändert. Es wurde versucht, das oben beschriebene Herstellungsverfahren beizubehalten und nur Einzelkomponenten davon zu variieren [58].

Veränderung der HCl-Konzentration:

Die Elektroden wurden in ein-molarer bzw. drei-molarer HCl-Lösung chloriert, wobei die Anzahl der Umpolungen und die Spannung konstant gehalten wurden.

Chlorierung der Elektroden in KCl-Lösung:

Anstelle der sonst üblichen zwei-molaren HCl-Lösung, wurden die Elektroden in dieser Versuchsreihe in ein-molarer, zwei-molarer und drei-molarer KCl-Lösung chloriert.

Veränderung der Spannung:

Hierbei wurden die Elektroden bei einer angelegten Spannung von 2 (zwei), 4 (vier) und 6 (sechs) Volt chloriert. Wegen zu starker Gasblasenbildung bei der chemischen Reaktion war es nicht möglich, eine Chlorierung mit höherer Spannung vorzunehmen.

Veränderung der Anzahl der Umpolungen:

Bei diesen Bemühungen, eine geeignete Elektrode herzustellen, wurde die Anzahl der Umpolungen variiert. Das ursprüngliche Verfahren sah 6 (sechs) Umpolungen vor. Es wurden verschiedene Elektroden hergestellt mit 4 (vier), 8 (acht) und 10 (zehn) Umpolungen.

Alle diese Herstellungsmethoden führten zu keiner Verbesserung gegenüber der unter Kapitel 2.4.3 beschriebenen Herstellungsweise der Elektroden. Dies bestätigte sich nicht nur bei Nullabgleichsmessungen, sondern auch bei exemplarischen Einsätzen an Versuchspersonen.

2.5.2 Isolierung der Elektroden

Ein weiterer Schwerpunkt bei der Neuentwicklung lag darin, die Elektroden in Anlehnung an den Aufbau von pH-Elektroden vollständig zu isolieren, um die Einflüsse, die von außen auf die Elektroden einwirken, zu minimieren [118]. Diese Idee basierte auf der Erkenntnis, daß zu Beginn einer jeden Nullabgleichsmessung die Elektroden nur für eine kurze Zeit die zu erwartenden Werte anzeigten, bevor sich Potentiale aufbauten. Die Elektroden waren von diesem Zeitpunkt an für die Anwendung am Patienten unbrauchbar, weil bei den Messungen immer eine Unsicherheit über die Verlässlichkeit der gemessenen Werte zurückblieb.

2.5.2.1 Isolierung mit Agargel-Überzug

Nach der Chlorierung der Elektroden auf die herkömmliche Weise, wurden diese in eine erwärmte und damit flüssige Agargel-Lösung eingetaucht. Zur Herstellung des Agargels wurde ein Standard-Hochagar der Firma Difco verwendet. Dieser wurde in einer Konzentration von zwei, drei und vier Prozent in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Nach Erkalten des Agargelüberzugs wurde mit zwei Elektroden eine Nullabgleichsmessung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten durchgehend konstante Spannungswerte, die auch nach längerem Kurzschluß keine eigenständigen Potentiale aufbauten.

Bei Testungen der Gelelektrode an Versuchspersonen zeigte sich allerdings, daß die verschiedenen Agargelmischungen der mechanischen Beanspruchung nicht stand hielten, so daß keine Patientenmessung durchgeführt werden konnte.

2.5.2.2 Isolierung mit Silikonschlauch

Ein weiterer Versuch der Isolierung erfolgte mit Hilfe eines weichen Silikonschlauches, in den die chlorierte Elektrode vollständig eingeführt wurde. Um den Kontakt nach außen zur Schleimhaut aufrecht zu erhalten, wurde der Schlauch mit Kochsalzlösung gefüllt und anschließend am oberen, offenen Ende mit Zellulosewatte verschlossen. Durch das Aufschrumphen eines Teflonschlauches war es möglich, das hintere Ende des Silikonschlauches abzudichten. Es wurden sowohl Nullabgleichsmessungen als auch Patientenmessungen durchgeführt und bei beiden Messungen mit diesen Elektroden die erhofften Ergebnisse hinsichtlich Stabilität und Reproduzierbarkeit der Meßwerte erreicht.

Um die Elektroden noch stabiler und die galvanisch aufgebrauchte Chloridschicht der Elektrode noch länger haltbar zu machen, wurde in einem weiteren Schritt die Kochsalzlösung mit Silberchlorid (AgCl) gesättigt. Dies wirkte sich zwar nur gering auf die Stabilität der Elektroden bei der Messung aus, verlängerte aber die Überlebenszeit der aufgebrauchten Chloridschicht erheblich, ohne daß eine Verschlechterung der Meßgenauigkeit nachzuweisen war [28].

Des weiteren wurde die Zellulosewatte durch ein Keramikdiaphragma ersetzt, was sowohl die Herstellung vereinfachte, als auch die Elektrode besser vor Austrocknung schützte. Die Beschaffenheit von Keramikdiaphragmen, die in dieser Form eingesetzt werden, muß verschiedenen Anforderungen genügen. So sollten sie chemisch inert sein, nur einen kleinen elektrischen Widerstand bei geringen Durchfluß von Elektrolyt aufweisen und keine Ionenaustauscher-Eigenschaften besitzen. Feinporige Keramikdiaphragmen erfüllen diese Bedingungen weitgehend [29].

2.5.3 Beschreibung der Herstellung des Prototyps der Meß- und Referenzelektrode

Das exakte Vorgehen bei der Herstellung der bei den Vergleichsmessungen verwendeten Elektroden stellte sich wie folgt dar:

Meßelektrode:

Ein 0,7 mm dicker Draht aus reinem Feinsilber wurde auf eine Länge von 10 cm gekürzt und mittels Chromschwefelsäure und 65 % Salpetersäure oberflächlich gereinigt. Die Dicke des Drahtes wurde aus Stabilitätsgründen gewählt. Um die Verletzungsgefahr und die mechanische Reizung der Nasenschleimhäute bei den Patienten so gering wie möglich zu halten, wurde ein ca. 0,3 mm dicker und 5 cm langer Silberdraht mit dem vorderen Ende des 0,7 mm dicken Silberdrahtes verschweißt. Die Spitze des so entstandenen Rohlings wurde in 1 molarer HCl-Lösung über eine Zeit von 40-60 Minuten anodisch galvanisiert.

Bei der Fertigung dieser Elektroden wurde mit Hilfe einer Konstantstromquelle eine konstante Stromdichte gewährleistet. Die optimale Stromdichte für die Herstellung von Silber / Silberchlorid-Elektroden beträgt $0,5-2 \text{ mA/cm}^2$ und sollte auf keinen Fall 10 mA/cm^2 überschreiten [47]. Die sehr poröse und oft schlecht haftende Chloridschicht konnte durch die Begrenzung und Konstanthaltung des Stromes in einer Form aufgebracht werden, die der mechanischen Beanspruchung gewachsen war.

Im Anschluß an die Chlorierung wurde die Elektrode isoliert. Dazu wurde ein Schrumpfschlauch aus Teflon über das hintere, nicht chlorierte Ende des Silberdrahtes gezogen und durch Erwärmung aufgeschrumpft. Um den chlorierten Teil der Elektrode zu isolieren, wurde in einen Silikonschlauch, mit einem Innendurchmesser von 1 mm und einer Wandstärke von 0,2 mm, ein Keramikdiaphragma, mit der Länge von 2 mm und einem Durchmesser von 1,0 mm, mittels Silikonkleber eingeklebt. Dieses Schlauchstück wurde mit gesättigter Silberchlorid-Lösung befüllt und über die Spitze der chlorierten Meßelektrode gezogen. Durch das Verkleben der sich überlappenden Schläuche mit Silikonkleber war eine Fixierung und Abdichtung des befüllten Silikonschlauches gegeben. Zusätzlich wurde auch der nicht-chlorierte Teil der Elektrode, der normal nicht mit dem Patienten in

Berührung kommt, mittels Teflon- und Silikonschlauch isoliert, um einer Beeinflussung auf diesem Wege entgegen zu wirken (s. Abb. 6 und 7).

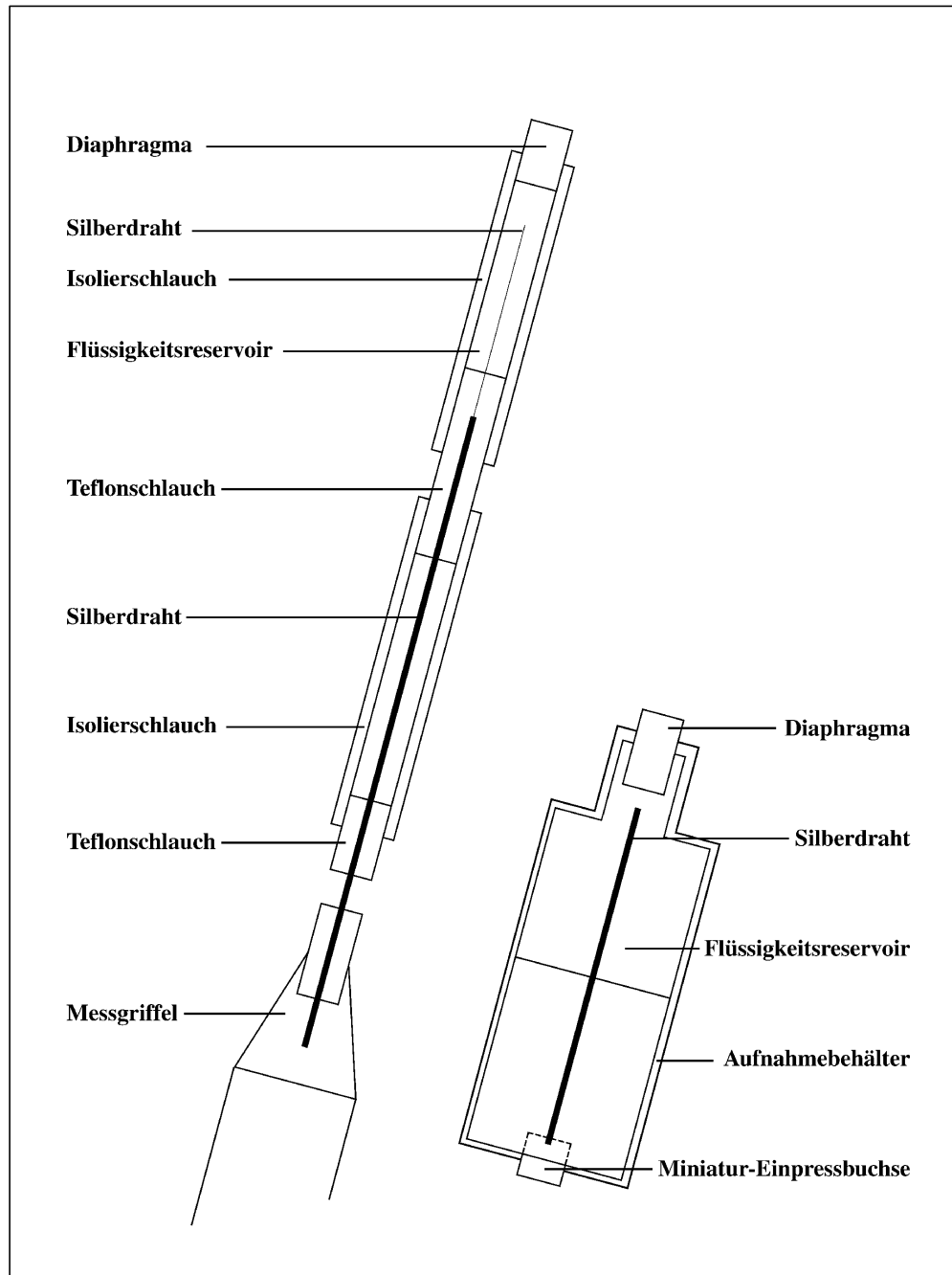


Abb. 6: Skizze der neu entwickelten Meß- und Referenzelektrode für das vereinfachte Potentialdifferenz-Meßgerät „Tholy“ im Längsschnitt.

Für die Potentialdifferenzmessung mußte die so entstandene Meßelektrode nun noch in den dafür vorgesehenen Meßgriffel eingeführt werden.

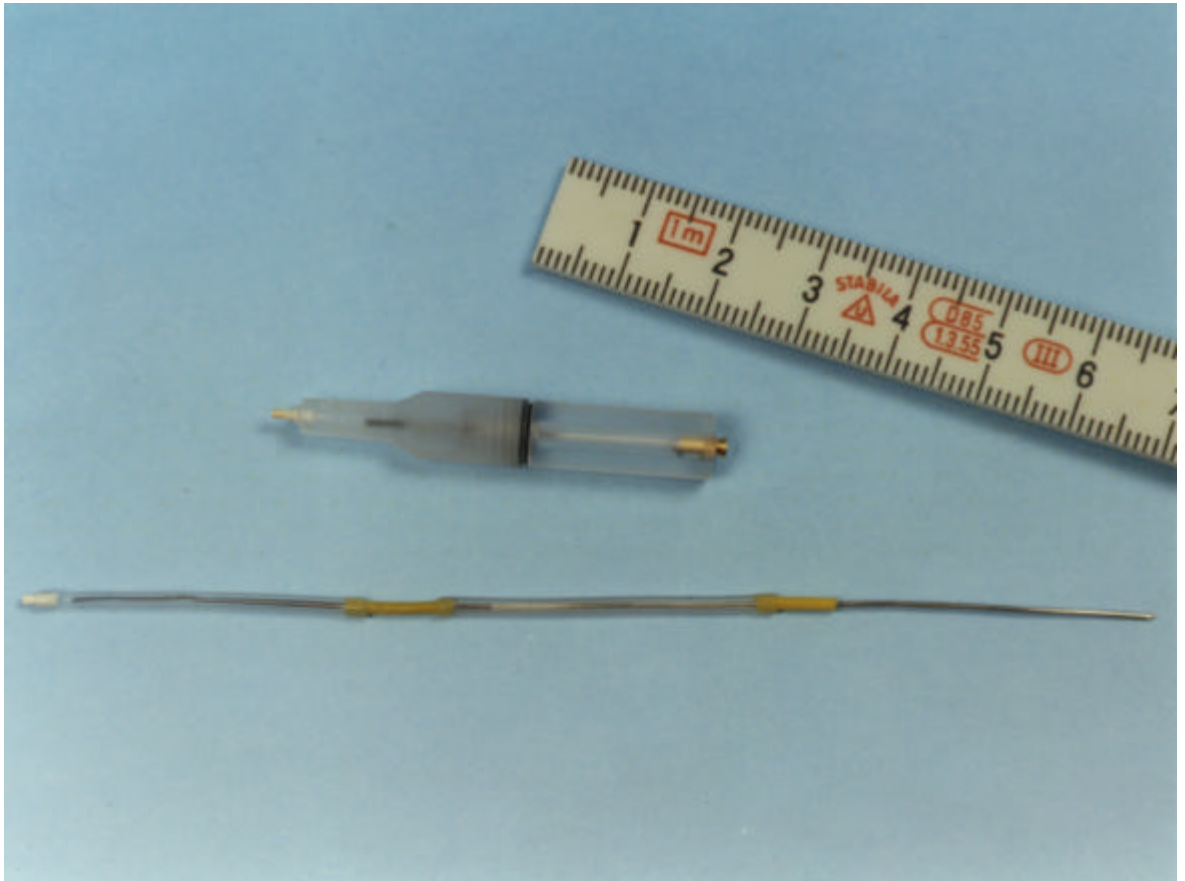


Abb. 7: Fotografische Darstellung der beiden Elektroden für das „Tholy“-Meßgerät (vgl. Abb. 5).

Referenzelektrode:

Der grundsätzliche Aufbau der Referenzelektrode gleicht dem der oben beschriebenen Meßelektrode.

Ein kleines Gefäß zur Aufnahme der Referenzelektrode stellte die Basis für die Herstellung der neuen Elektrode dar. Dieser röhrenförmige Aufnahmebehälter wurde in Eigenarbeit aus einem Polycarbonatstab hergestellt, da ein passendes Gefäß nicht erhältlich war. In die Spitze dieses Behälters, die mit einem i.v.-Katheter konnektierbar war, wurde entsprechend der Meßelektrode ein Keramikdiaphragma eingesetzt.

Die Referenzelektrode an sich bestand wie die Meßelektrode aus Silber / Silberchlorid. Im Unterschied zur Meßelektrode betrug die Länge der Referenzelektrode allerdings nur 2,5 cm. Dieser kleine Silberdraht wurde auf die oben beschriebene Weise gereinigt und chloriert. Anschließend wurde das hintere Ende des Drahtes mit einer Miniatur-Einpressbuchse verlötet. Die Miniatur-Einpressbuchse war nötig, um die Verbindung zwischen Silberdraht und Meßgerät mittels eines Miniatur-Bananensteckers herstellen zu können. Nach Befüllung des Aufnahmebehälters mit gesättigter Silberchloridlösung wurde die Einpressbuchse mit dem chlorierten Silberdraht in das Kunststoffröhrchen eingepresst und alles mit Silikonkleber abgedichtet (s. Abb. 6).

Für den Anschluß der Referenzelektrode wurde der zum Meßgerät gehörende Bananenstecker in die Buchse eingesteckt und die Spitze der Elektrode mit dem subkutan liegenden Venenverweilkatheter am Oberarm des Patienten konnektiert.

Referenz- und Meßelektrode wurden nach Fertigstellung mit 80 %igem Ethanol gereinigt und in Kunststoffröhrchen, die mit gesättigter Silberchloridlösung befüllt waren, aufbewahrt. Die Flüssigkeit in den Aufbewahrungsröhrchen wurde nach jeder Entnahme verworfen und durch frische Silberchloridlösung ersetzt. Für die nachfolgend beschriebenen Vergleichsmessungen wurden 80 Meß- und Referenzelektroden dieser Bauart hergestellt.

In enger Zusammenarbeit mit Herrn *Winfried Keipp*, Leiter der Entwicklungsabteilung der Firma *Medicap* und Herrn *Oliver Böhmer*, Student der Biomedizintechnik an der FH Gießen, wurden die oben beschriebenen Elektroden entwickelt und hergestellt.

2.6 Vorgehen bei der Messung der transepithelialen Potentialdifferenz

Bei den Patienten wurde eine kleinkalibrige Venenverweilkanüle im Bereich der Außenseite des linken Oberarmes subkutan plaziert und diese, nach Entfernung der Nadel, mit Pflaster fixiert. Diese Venenverweilkanüle diente sowohl bei der konventionellen Messung als auch bei der „Tholy“-Messung als Anschluß für die jeweilige Referenzelektrode. Die subkutane Plazierung der Elektrode an der Außenseite des Oberarmes geht in dieser Form auf *Knowles* zurück [74].

Konventionelle Messung:

Für die konventionelle Messung wurde die Venenverweilkanüle direkt mit der Infusionsleitung verbunden und die Injektomatpumpe auf eine Fördergeschwindigkeit von 1-2 ml / Stunde eingestellt. Auf die Infusionsleitung der Meßelektrode wurde ein langer, weicher Nabelarterienkatheter aufgesetzt und die dazugehörige Injektomatpumpe auf eine Förderleistung von 3-5 ml / Stunde eingestellt. Die Unterschiede in den Förderleistungen erklären sich mit der größeren Länge und dem Durchmesser des Nabelarterienkatheters [66, 59]. Vor dem Anschluß der Referenzelektrode an den Katheter wurde ein Kurzschluß zwischen den beiden Elektroden hergestellt. Dabei sollte die Anzeige des Millivoltmeters keine Spannung anzeigen („Nullabgleich“; s. Kap. 2.4.4). Werte zwischen -1 mV und +1 mV wurden toleriert.

Mit Hilfe des an der Kaltlichtquelle angeschlossenen Nasenspekulums wurde das Naseninnere des Patienten eingesehen. Dabei wurde darauf geachtet, daß der fixierte Kopf des Patienten leicht rekliniert war, damit die Concha inferior deutlich zu erkennen war. Bei der eigentlichen Messung war das Meßgerät so plaziert, daß sich sowohl die Anzeige als auch der Patient im Sichtfeld des Untersuchers befanden. Unter Sicht wurde die Meßelektrode mit der rechten Hand des Untersuchers unterhalb der Concha inferior nach lateral dorsal, circa 5 cm tief in die Nase eingeführt, wobei der eigentliche Meßort nicht einzusehen war (s. Abb. 8).

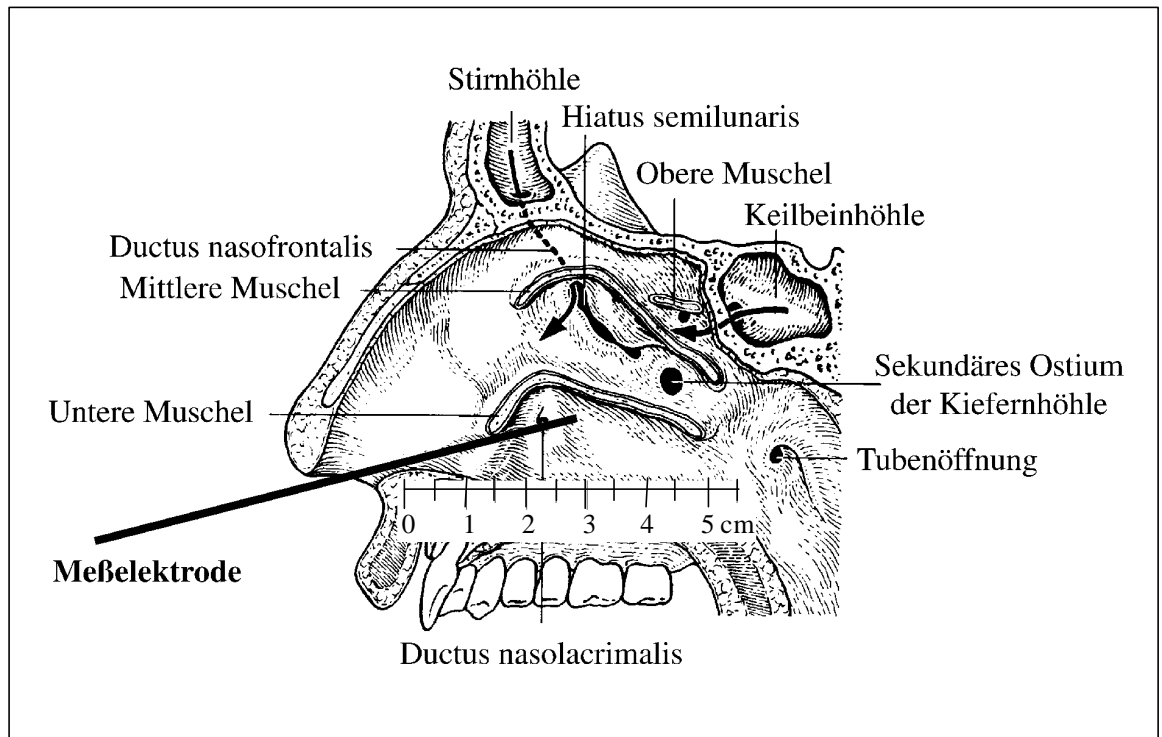


Abb. 8: Skizze zur Lage der Meßelektrode unterhalb der unteren Nasenmuschel mit Darstellung der Größenverhältnisse. Abbildung modifiziert nach H.G. Boenninghaus [18].

„Tholy“-Messung:

Bei der Messung mit dem „Tholy“-Gerät wurde in die ebenfalls am Oberarm fixierte Venenverweilkanüle zur besseren Kontaktaufnahme mittels einer Spritze ein kleiner Bolus isotonische Kochsalzlösung eingespritzt. Beim Entfernen der Spritze befüllte man den gesamten Katheter luftfrei mit Kochsalzlösung.

Auch die Elektroden des „Tholy“-Gerätes wurden durch Kurzschließen von Meß- und Referenzelektrode auf ihre aktuelle Verwendbarkeit überprüft und Werte zwischen -1 mV und + 1 mV toleriert. Im Anschluß daran wurde die Referenzelektrode in die Venenverweilkanüle eingeführt und beide mit einem Klebestreifen auf der Haut fixiert. Zur Überprüfung des ordnungsgemäßen Zustandes des Referenzteils wurde die Meßelektrode

auf eine feuchte Hautstelle unterhalb der Einstichstelle aufgesetzt. Bei korrektem Anlegen der Referenzelektrode zeigte das Meßgerät einen Wert von einigen Millivolt an. Nun wurde, analog zur oben beschriebenen Messung, das Naseninnere des Patienten mit dem Spekulum eingesehen und die Meßelektrode mit der rechten Hand unter die Concha inferior eingeführt. Um bei dieser Meßmethode einen sicheren Schleimhautkontakt zu haben, war es nötig, die Spitze der Elektrode um 30-40 Grad nach oben zu biegen. Wie bei der konventionellen Messung, befanden sich auch bei dieser Messung Meßgerät und Patient im Gesichtsfeld des Untersuchers.

Zu erwarten waren Potentialdifferenzen in der Größenordnung von 0 bis -100 mV. Bei Werten, die außerhalb dieses Bereiches lagen, wurde die Lage der Meßelektrode und der Referenzelektrode kontrolliert und die Messung wiederholt. Allerdings wurden auch solche Werte, die außerhalb dieses Erwartungsintervalls lagen, beobachtet und registriert. Durch langsames Bewegen der Elektrode wurde, unter möglichst permanentem Schleimhautkontakt, die Stelle mit dem höchsten Meßwert aufgesucht, die mindestens 2 Sekunden lang stabil war. Die Meßelektrode wurde am nasalen Flimmerepithel entlang von okzipital nach rostral in Richtung Nasenöffnung herausgezogen. Von diesem Epithel ist bekannt, daß es morphologisch mit dem Flimmerepithel der Lunge vergleichbar ist und daß sein Biopotential dem der unteren Atemwege weitgehend entspricht, somit den Basisdefekt der Mukoviszidose repräsentiert [75, 78].

Es wurde jeweils der Mittelwert aus zwei aufeinander folgenden Messungen einer Nasenseite protokolliert (s. Abb. 9 und 10).

Exemplarische Dokumentation der PD-Messung

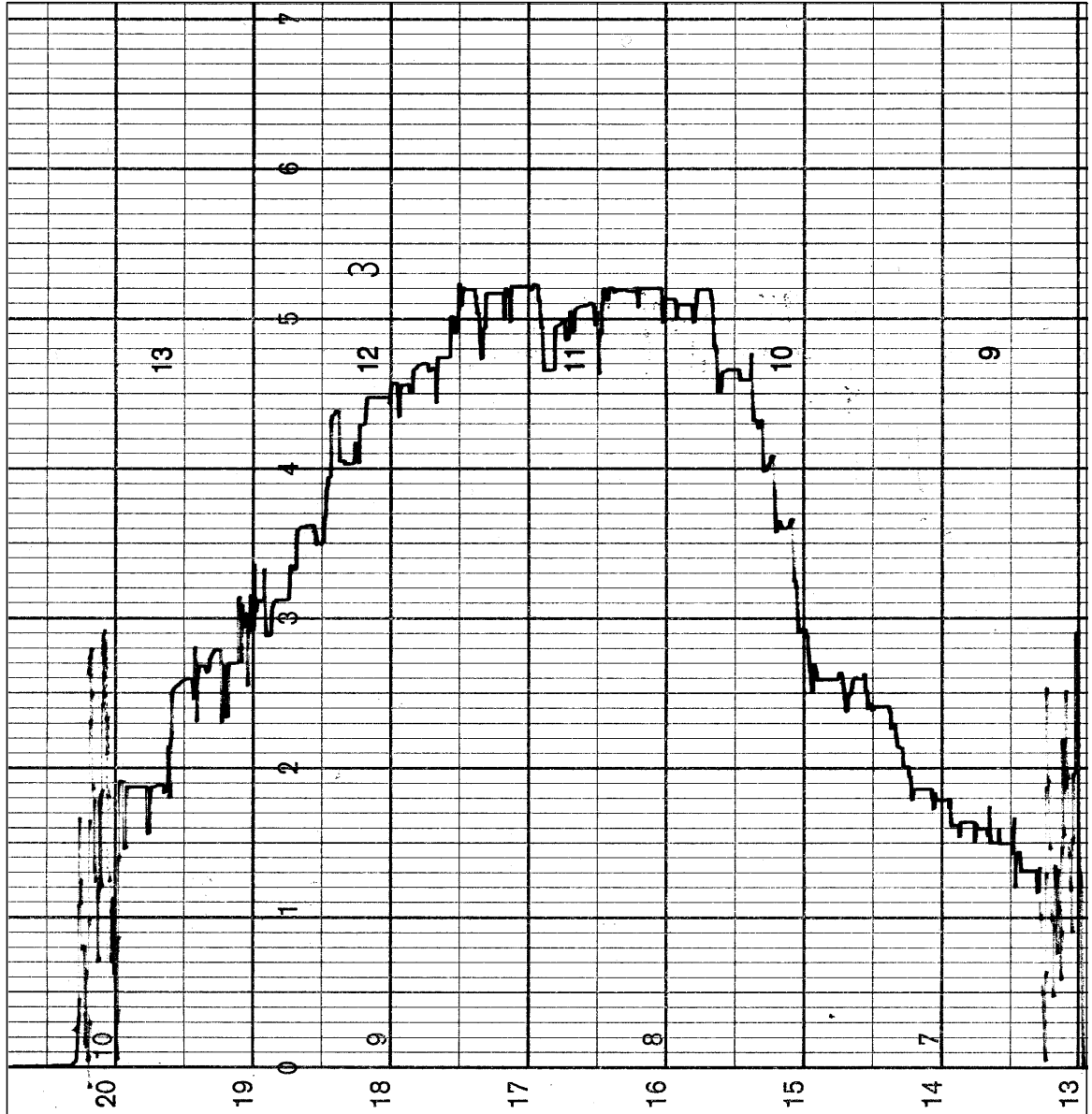


Abb. 9: Exemplarische Dokumentation einer PD-Messung der rechten Nasenöffnung bei einem CF-Patienten (M.H., männlich, 25 Jahre) mit dem konventionellen Meßgerät

Auswertung: Maximalwert der PD in diesem Fall: -52 mV

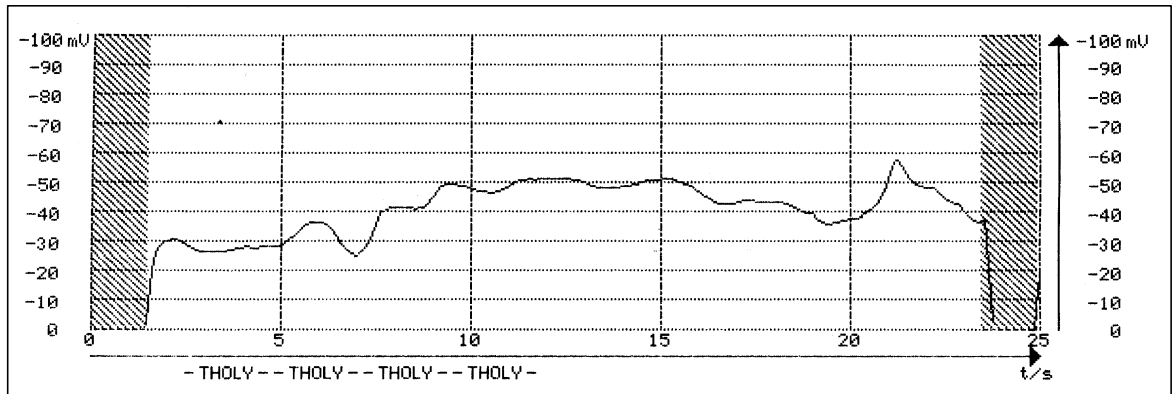


Abb. 10: Exemplarische Dokumentation einer PD-Messung bei einem CF-Patienten (M.H., männlich, 25 Jahre) der rechten Nasenöffnung mit dem „Tholy“-Meßgerät.

Auswertung: Maximalwert der PD: -51 mV.

2.8 Vorgehen bei der Studie

Mit 30 Mukoviszidose-Patienten, die sich freiwillig für diese Studie zur Verfügung gestellt hatten, wurde eine Vergleichsmessung zwischen dem konventionellen Potentialdifferenz-Meßgerät und dem „Tholy“-Meßgerät durchgeführt, das mit den neu entwickelten Elektroden ausgestattet war.

Bei beiden Messungen wurde mit der gleichen Venenverweilkanüle als Anschluß für die Referenzelektrode gearbeitet. Mittels einer Randomisierungsliste wurde vor Beginn der Untersuchungen festgelegt, mit welchem Gerät jeweils begonnen werden sollte. Beide Messungen erfolgten kurz hintereinander, d.h. die Messung wurde mit einem der beiden Geräte begonnen, an beiden Nasenöffnungen des Patienten jeweils zwei mal gemessen und der Mittelwert für jede Nasenöffnung notiert. Im Anschluß daran wurden die Meßgeräte ausgetauscht und die jeweils andere Referenzelektrode an demselben Katheter am Oberarm angeschlossen. Nach einem Intervall von mindestens 5 Minuten wurde mit dem zweiten Gerät ebenfalls an beiden Nasenöffnungen des Patienten zweimal hintereinander die PD gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.9 Pharmakologische Tests

Da noch keine Erfahrungen über die Beeinflussung der Elektroden für das „Tholy“-Gerät durch Medikamente vorlagen, wurden alle pharmakologischen Untersuchungen mit dem konventionellen Potentialdifferenz-Meßgerät durchgeführt.

2.9.1 Vorbemerkungen zur Herstellung von Inhalationslösungen

Für die geplanten Untersuchungen waren stabile Inhalationslösungen Voraussetzung. Daher wurde im HPLC-Labor der Kinderklinik der JLU-Gießen, die Stabilität der zu inhalierenden Stoffe überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die Stabilität von der Konzentration der Amilorid- bzw. Benzamillösung und der zugesetzten Kochsalzlösung abhängig war. Bis zu einer Konzentration von 0,6 mg / ml Amiloridlösung und einer Konzentration von 0,17 mg / ml Benzamillösung in isotonischer Kochsalzlösung, bestand keine Gefahr des Wirkungsverlustes. Bei höheren Konzentrationen bestand die Möglichkeit, daß die Wirkung zum Beispiel durch Ausflocken der Substanzen verringert oder sogar ganz aufgehoben wurde. Für Amilorid ist die begrenzte Löslichkeit in isotonischer Kochsalzlösung oder anderen Elektrolytlösungen bereits seit längerem bekannt [95].

Die Konsequenz aus diesen Vorversuchen war, daß die Lösung von Amilorid bis zu einer Konzentration von 0,6 mg / ml und die Lösung von Benzamil in der vorgesehenen Konzentration von 0,17 mg / ml in isotonischer Kochsalzlösung hergestellt wurden. Alle Inhalationslösungen höherer Konzentration wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Die Löslichkeitsgrenze von Benzamil in destilliertem Wasser lag bei einer Konzentration von 0,7 mg / ml. Die Konzentration der beiden Benzamillösungen wurden aufgrund der Löslichkeitsgrenze gewählt und erst im Anschluß in die Einheit mg / ml umgerechnet. Daraus erklärt sich, daß die Benzamillösungen gegenüber den Amiloridlösungen nicht äquimolar sind.

Die gewünschte Konzentration von 0,25 mg / ml der Fenoterol-Inhalationslösung wurde durch Verdünnen einer 2 mg / ml Ausgangslösung mit isotonischer Kochsalzlösung hergestellt.

2.9.2 Zusammensetzung der Inhalationslösungen

Zur Durchführung der pharmakologischen Tests wurden folgende Lösungen verwendet:

A) Für die Untersuchung der Medikamentenkombination Amilorid / Fenoterol:

- Amilorid in isotonischer Kochsalzlösung: 0,3 mg / ml
- Fenoterol in isotonischer Kochsalzlösung: 0,25 mg / ml

B) Für die Untersuchung der Wirksamkeit von Amilorid im Vergleich zu Benzamil:

- Amilorid in isotonischer Kochsalzlösung: 0,1 mg / ml
- Amilorid in isotonischer Kochsalzlösung: 0,3 mg / ml
- Amilorid in isotonischer Kochsalzlösung: 0,6 mg / ml
- Amilorid in destilliertem Wasser: 1 mg / ml

- Benzamil in isotonischer Kochsalzlösung: 0,17 mg / ml
- Benzamil in destilliertem Wasser: 0,7 mg / ml

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

2.9.3 Vorgehen bei den pharmakologischen Untersuchungen

2.9.3.1 Untersuchung der Wirkung der Medikamentenkombination von Amilorid und Fenoterol

Für die Untersuchung der Wirkung der Medikamente Amilorid und Fenoterol wurden die in der Therapie normalerweise eingesetzten Konzentrationen von 0,3 mg/ml für Amilorid und 0,25 mg/ml für Fenoterol gewählt [63].

Nachdem mit dem oben beschriebenen Verfahren bei allen Probanden die Ausgangswerte der Potentialdifferenz bestimmt worden waren, wurden die vorgesehenen Lösungen appliziert. Dazu wurden je 2 ml der jeweiligen Substanzen in die Inhalette des Inhaliergerätes „Master“ der Firma Pari (Paul Ritzau Pari-Werk / Starnberg) eingefüllt.

Das Gerät produziert einen mittleren Luftstrom von 5,2 l / min, der mediane Massendurchmesser der Tröpfchenpartikel wird mit 3,1 µm angegeben. Dadurch ist eine gute Partikeldeposition im Bronchialsystem gewährleistet [38]. Im Rahmen dieser Studie kam es vor allem auf die Deposition in der Nase an. Daher wurde bei dieser Studie eine Nasenmaske (Child No.3, Firma Laerdal) zur Inhalation verwendet.

Die Patienten wurden angewiesen, durch Betätigung einer Unterbrechertaste, die entsprechende Lösung ausschließlich während der Einatmungsphase über die Nase zu inhalieren.

Jede der teilnehmenden Personen inhalierte direkt nach der Bestimmung der Basis-PD-Werte zuerst 2 ml der Amiloridlösung. Nach Beendigung der Inhalation wurden die PD-Werte erneut an beiden Nasenöffnungen gemessen und der Mittelwert aus zwei Messungen protokolliert.

Anschließend wurde nach einem zuvor festgelegtem Zeitintervall von 3 Minuten eine weitere Kontrollmessung vorgenommen. Dadurch wurde sichergestellt, daß die höchsten, d.h. die am wenigsten negativen PD-Werte nach der Amiloridinhalation aufgezeichnet wurden.

Daran schloß sich die Inhalation der zweiten Lösung an. In das Inhaliergerät wurden nun 2 ml der Fenoterollösung eingefüllt und den Probanden zur selbständigen Inhalation angereicht.

Der letzte Schritt der Untersuchung bestand in einer weiteren Messung der PD-Werte nach Inhalationsende sowie einer Kontrollmessung nach 3 Minuten, wobei auch hier der Mittelwert aus zwei Messungen protokolliert wurde.

2.9.3.2 Pilotstudie über die Wirksamkeit von Benzamil im Vergleich zu Amilorid

Um die Wirkungsweise von Benzamil im Vergleich zu Amilorid aufzeigen zu können, wurden verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Inhalationslösungen hergestellt (s. Kap. 2.10.3). Vor der Inhalation eines der beiden Medikamente wurden bei allen an dieser Untersuchung teilnehmenden Mukoviszidose-Patienten die Ausgangs-PD-Werte bestimmt.

Der Natrium-blockierende Effekt von Amilorid und Benzamil am respiratorischen Epithel, und damit die maximale Absenkung der nasalen PD-Werte, wurde als prozentuale Abweichung von den Basis-PD-Werten dargestellt. Diese initiale Inhibition der Natriumabsorption wird im folgenden als $\Delta PD\%$ bezeichnet [60, 61].

Um eine Information über die Dauer der Wirksamkeit der Medikamente zu erhalten, wurden in festgelegten Zeitabständen wiederholt PD-Werte bestimmt, wobei zu Beginn und zum Ende der Meßreihe hin die Zeitabstände individuell abgeändert wurden. Die Kontrollmessungen wurden - wenn möglich - bis zum Erreichen der Ausgangswerte ($\pm 10\%$ der Basis-Werte) weitergeführt bzw. die letzte Messung wurde, unabhängig von den Meßergebnissen, 6 Stunden nach der Medikamenteninhalation vorgenommen, um die Patienten nicht zu überfordern.

Da die Reduzierung der Basis-PD-Werte um 50 % eine rechnerisch und graphisch gut zu ermittelnde Größe darstellt, wurde für alle Probanden dieser Zeitpunkt bestimmt. Dieser Zeitwert wird im folgenden als Wirkzeit 50 (WZ50) bezeichnet und als der Zeitpunkt definiert, zu dem die PD-Werte 50 % der Ausgangswerte wieder erreicht hatten (s. Abb. 11) [60].

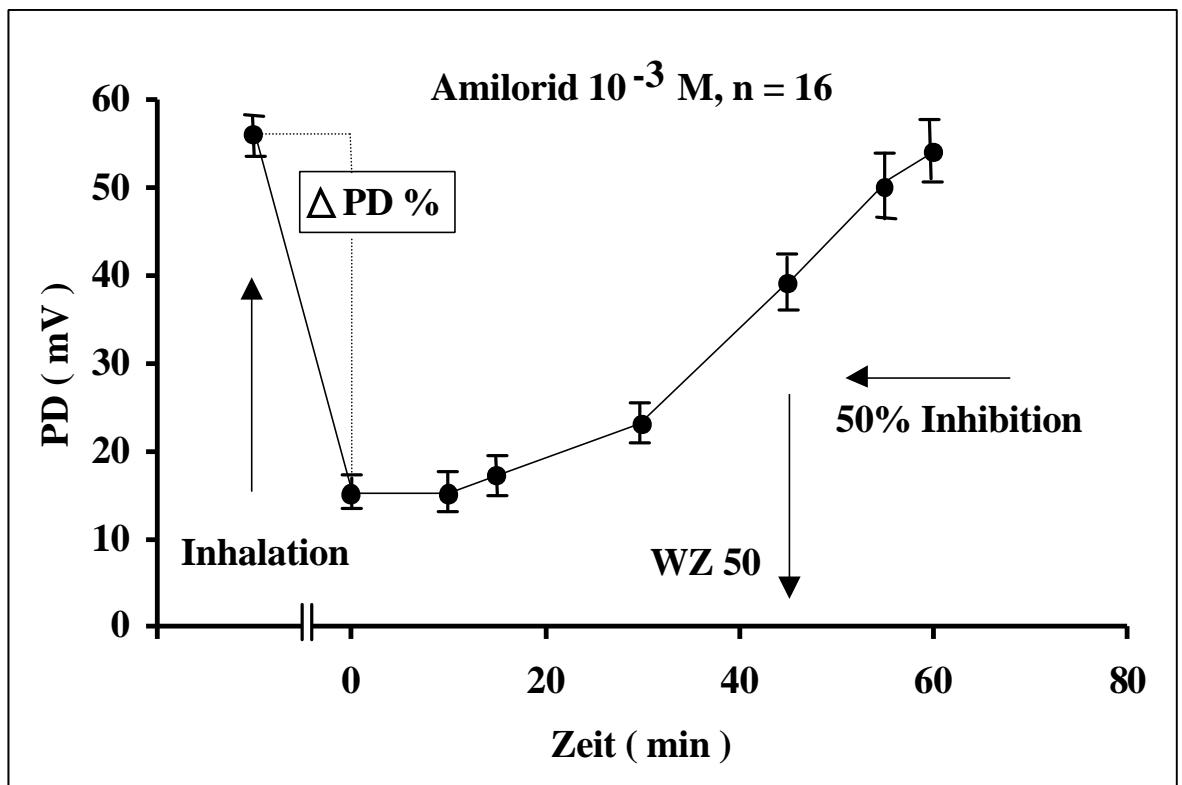


Abb. 11: Skizze zur Veranschaulichung der Dokumentation der PD-Messungen bei der Pilotstudie mit Amilorid und Benzamil (vgl. Abb. 16):

Δ PD% = initiale Natriumkanal-Blockade

WZ50 = Zeit bis zum Wiederanstieg der PD-Senkung auf 50 % der Ausgangs-PD-Werte.

2.10 Untersuchungskollektive

Insgesamt nahmen 142 Probanden an den Untersuchungen teil, wovon 104 CF-Patienten und 38 gesunde Probanden waren.

2.10.1 Untersuchungskollektiv: Vergleich konventionelle Messung mit „Tholy“-Messung

Das Kollektiv der insgesamt 30 Mukoviszidose-Patienten, die an dieser Untersuchung teilnahmen, setzte sich aus 11 weiblichen und 19 männlichen Patienten zusammen.

Alle Teilnehmer befanden sich am Zentrum für Kinderheilkunde in Gießen in ambulanter oder stationärer Behandlung. Ihr Alter lag zwischen 5 und 33 Jahren ($\bar{x} = 21,5$). Die Diagnose Mukoviszidose war durch die typische Krankengeschichte, klinische und radiologische Untersuchungen, sowie durch wiederholt positive Schweißanalysen gesichert. Klinische Kriterien spielten bei der Selektion der Patienten keine Rolle. Alle PD-Messungen geschahen mit dem Einverständnis der Probanden und gegebenenfalls ihrer Eltern.

Die Vergleichsmessungen zwischen dem konventionellen Potentialdifferenzmeßgerät und dem „Tholy“-Meßgerät wurden in der Zeit von Juni 1995 bis Dezember 1995 durchgeführt.

2.10.2 Untersuchungskollektiv: Medikamentenkombination Amilorid und Fenoterol

Die Untersuchungen der Wirkung der Medikamentenkombination Amilorid / Fenoterol wurden mit 33 Mukoviszidose-Patienten und 38 gesunden Probanden durchgeführt. Die Gruppe der Mukoviszidose-Patienten setzte sich aus 16 weiblichen und 17 männlichen Teilnehmern, im Alter von 9 - 29 Jahren ($\bar{x} = 20,3$), zusammen. Das Vergleichskollektiv bildeten 19 weibliche und 19 männliche Probanden, im Alter von 9 - 34 Jahren ($\bar{x} = 22,1$),

die aus Patienten der Pneumologischen Ambulanz ohne CF (vor allem Asthmatiker) und gesunden Studenten der Justus-Liebig-Universität rekrutiert wurden.

Durch wiederholt positive Schweißanalysen bzw. Potentialdifferenzmessungen sowie klinische Untersuchungen und die Krankengeschichten war die Diagnose der Mukoviszidose bei den teilnehmenden CF-Patienten gesichert.

Alle Teilnehmer waren über den Sinn der Untersuchung aufgeklärt, und die PD-Messungen geschahen mit dem Einverständnis der Probanden und ihrer Eltern. Das Einverständnis der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen für die inhalative Anwendung der Testsubstanzen lag vor.

Ausschlußkriterien für diese Untersuchungen waren:

- Patienten, die in einem Zeitraum von 8 Stunden eines oder beide der zu testenden Medikamente inhaliert hatten;
- 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;
- ein Patientenalter unter 6 Jahren; erst ab diesem Alter ist mit einer gewissen Kooperation bei den Teilnehmern zu rechnen, die für die Potentialdifferenzmessung und die nasale Inhalation nötig ist.

Bedingt durch die Schwere der Erkrankung wurde die zu diesem Zeitpunkt verordnete Medikation der CF-Patienten beibehalten, wobei unterschiedliche Medikationen der einzelnen Patienten nicht als Ausschlußkriterium herangezogen wurden.

2.10.3 Untersuchungskollektiv: Pilotstudie über die Wirksamkeit von Amilorid und Benzamil

An dieser Studie nahmen 41 Mukoviszidose-Patienten im Alter von 5-35 Jahren ($\bar{x} = 24,4 \pm 0,7$) teil. Die Gruppe setzte sich aus 19 weiblichen und 22 männlichen Teilnehmern zusammen, die alle regelmäßig zur Betreuung in die Gießener Universitätsklinik kamen. 6 Patienten stellten sich freiwillig für mehrere Untersuchungen zur Verfügung. Auch bei diesen Patienten war durch klinische Untersuchungen, Vorgeschichte und Schweißanalysen die Diagnose Mukoviszidose gesichert worden.

Aus Tabelle 1 ist die Einteilung der CF-Patienten in verschiedene Gruppen zu entnehmen, aufgegliedert nach den Konzentrationen der Inhalationslösungen der beiden Medikamente:

Tab. 1: Einteilung der Probanden in verschiedene Gruppen nach Menge und Art des Inhalates, sowie die Auflistung der Altersverteilung der Gruppen.

Konzentration Inhalationslösungen	Anzahl der Probanden	Alter der Probanden
Amilorid 0,1 mg/ml	16	5-35 Jahre
Amilorid 0,3 mg/ml	9	13-32 Jahre
Amilorid 0,6 mg/ml	7	17-30 Jahre
Amilorid 1,0 mg/ml	3	22-28 Jahre
Benzamil 0,17 mg/ml	7	18-35 Jahre
Benzamil 0,7 mg/ml	5	18-35 Jahre

Der klinische Zustand der Patienten spielte bei dieser Untersuchung keine Rolle, es wurde jedoch darauf geachtet, daß keiner der Teilnehmer zum Zeitpunkt der Messungen ein Medikament inhalierte. Die individuelle Medikation der Patienten wurde beibehalten und

nicht als Ausschlußkriterium herangezogen. Patienten mit einer akuten Rhinitis, einer Polyposis nasi oder mit Zustand nach Polypektomie wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Die Einverständniserklärung der Ethikkommission Gießen zu dieser Pilotstudie lag vor. Da Benzamil nicht zur Therapie des Menschen zugelassen ist, wurde die Auflage erteilt, daß nur CF-Patienten über 18 Jahren an dieser Studie teilnehmen durften. Alle Patienten waren über die bevorstehenden Untersuchungen aufgeklärt und hatten ihre Zustimmung gegeben.

2.11 Statistische Methoden

Die deskriptive Statistik diente der Beschreibung, Darstellung und Strukturierung der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse.

Dabei gibt n den Stichprobenumfang, d.h. die Anzahl der PD-Messungen der Patienten bzw. die Anzahl der gemessenen Nasenöffnungen der Probanden an.

Die jeweiligen Zielgrößen wie z.B. Wirksamkeit und Wirkungsdauer des postinhalativen PD-Abfalls bzw. Wiederanstiegs wurden anhand von Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichungen (s), Standardabweichungen des Mittelwertes ($S\bar{x}$), Median ($Med.$) sowie der größten und der kleinsten Merkmalsausprägung ($Max.$ und $Min.$) dargestellt. Die Standardabweichung des Mittelwertes wurde ausschließlich bei der Pilotstudie über die Wirksamkeit und Wirkdauer von Amilorid und Benzamil angewandt.

Die Berechnungen der Korrelationskoeffizienten (r) und der linearen Regression wurden nach den üblichen statistischen Verfahren vorgenommen [120]. Der im Ergebnisteil aufgeführte Fehler 1. Art (p) gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Ablehnung der Nullhypothese an. Zur Auswertung wurden die Statistikprogramme „Statgraphics Vers. 2.6“ und „WinStat Vers. 3.1“ eingesetzt.

Für den direkten Vergleich des konventionellen PD-Meßgerätes mit dem „Tholy“-Gerät wurden der U-Test von *Mann and Whitney* für abhängige Stichproben verwendet. Der

Korrelationskoeffizient (r) und die Regressionsgleichung ($y = a + bx$) wurden für die einzelnen Nasenöffnungen und anschließend für die gesamte Gruppe bestimmt.

Die Ergebnisse der Medikamentenkombination Amilorid und Fenoterol wurden mittels unabhängigem t-Test miteinander verglichen. Ein Ergebnis für $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Zur Überprüfung der Nullhypothese, inwieweit Amilorid und Benzamil die gleiche Wirksamkeit und Wirkdauer haben, wurden lineare Regressionsanalysen für beide Gruppen durchgeführt. Zusätzlich wurden mit dem t-Test für unpaarige Stichproben die Ergebnisse der PD-Werte der verschiedenen Amiloridlösungen miteinander verglichen, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich zwischen dem konventionellen Meßverfahren und dem „Tholy“-Meßgerät, ausgestattet mit neu entwickelten Elektroden

Nach Entwicklung einer neuen Meß- und Referenzelektrode für das vereinfachte Potentialdifferenz (PD) - Meßgerät „Tholy“ und erfolgreichem Abschluß der Vorversuche mit dem zuvor beschriebenen Nullabgleichs-Testverfahren konnten die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen durchgeführt werden.

Für die Überprüfung der neuen Elektroden des „Tholy“-Gerätes wurden an 30 Mukoviszidose-Patienten PD-Messungen vorgenommen.

3.1.1 Vergleich der PD-Werte an den einzelnen Nasenöffnungen

Die Ergebnisse wurden zunächst nach einzelnen Nasenöffnungen aufgeschlüsselt.

Die gute Übereinstimmung von Mittelwert und Median ließ eine Normalverteilung der Werte vermuten, so daß auch die Berechnung der Standardabweichung gerechtfertigt war.

Für die rechten Nasenöffnungen ergaben sich eine durchschnittliche Potentialdifferenz von $\bar{x} = -50,0$ mV für die konventionelle Messung und von $\bar{x} = -50,3$ mV für die Messung mit dem „Tholy“-Gerät. Die Standardabweichungen und Spannbreiten lagen in vergleichbarer Größenordnung (s. Tab. 2). Die Regressionsanalyse ergab eine sehr gute Korrelation ($r = 0,93$; $p < 0,001$). Der Interzept lag mit $y = -0,81 + 1,02 x$ nahe am Koordinatenursprung (s. Abb. 12).

Tab. 2: Beschreibende Statistik der Ergebnisse der Potentialdifferenzmessung am respiratorischen Epithel der Nase für die Messung an den **rechten** Nasenöffnungen (Nö) bei 30 Mukoviszidose-Patienten

	konv.Messung rechte Nö	Tholy-Messung rechte Nö
n	30	30
\bar{x}	-50,0 mV	-50,3 mV
Med.	-51,5 mV	-50,5 mV
s	13,6 mV	15,0 mV
Min.	-20 mV	-20 mV
Max.	-72 mV	-78 mV

Mittels Punktwolkendiagramm und Regressionsgeraden ist das Ergebnis graphisch dargestellt. (s. Abb. 12)

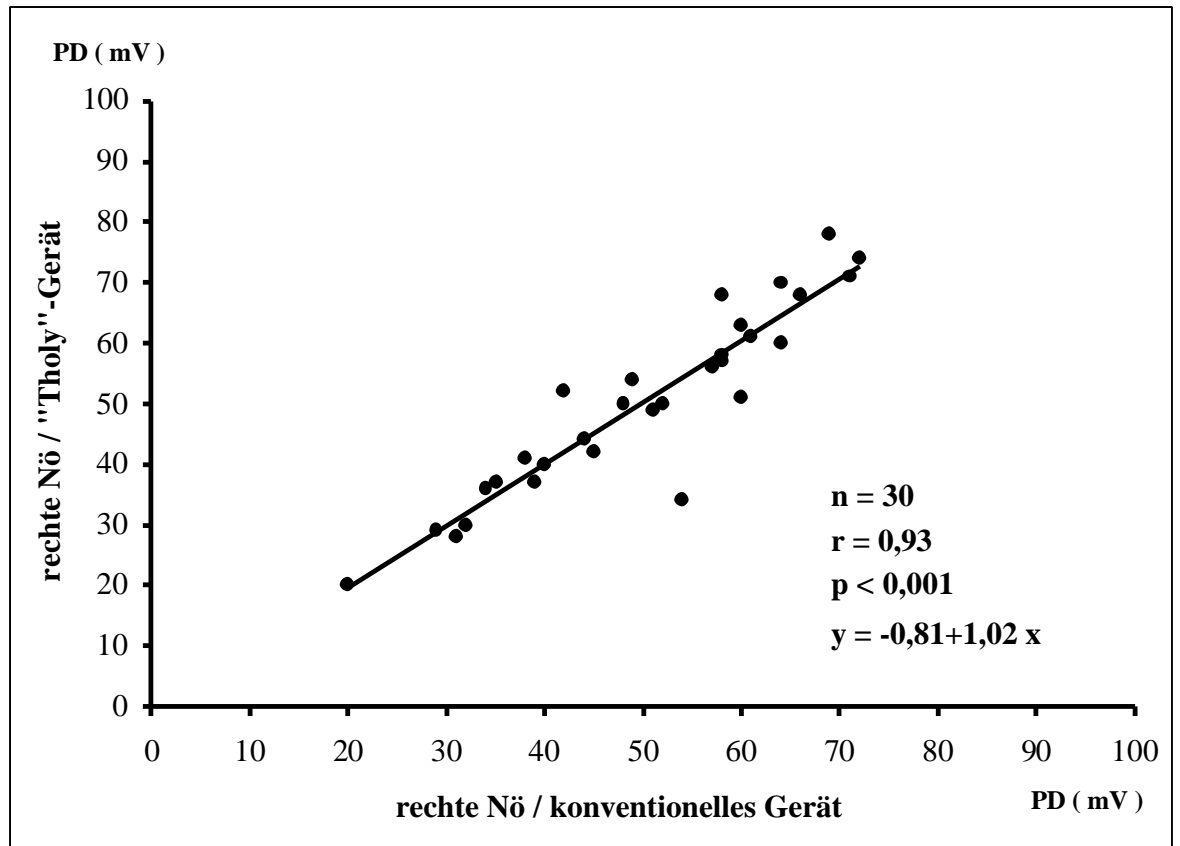


Abb. 12: Darstellung der Regressionsgeraden der vergleichenden Potentialdifferenzmessung zwischen der konventionellen und der „Tholy“-Messung für die rechte Nasenöffnung (Nö) bei 30 Mukoviszidose-Patienten.

Beim Vergleich der Ergebnisse für die jeweils linken Nasenöffnungen wurden geringfügig höhere Potentialdifferenzwerte, sowohl für die konventionelle Methode von durchschnittlich $\bar{x} = -52,9 \text{ mV}$ als auch für die „Tholy“-Messung von $\bar{x} = -53,8 \text{ mV}$ ermittelt. Die Standardabweichungen und Spannbreiten waren insgesamt etwas größer als an der rechten Nasenöffnung (s. Tab. 3). Der Schnittpunkt mit der Y-Achse lag bei $y = 1,83$, wobei die Steigung der Geraden $0,98 \times$ betrug; die Regressionsanalyse ergab auch für diese Nasenöffnung eine sehr gute Korrelation ($r = 0,92$; $p < 0,001$).

Tab. 3: Beschreibende Statistik der Ergebnisse der Potentialdifferenzmessungen am respiratorischen Epithel der Nase für die **linken** Nasenöffnungen (Nö) bei 30 Mukoviszidose-Patienten, bestimmt mit dem konventionellen (konv.) und dem „Tholy“-Meßgerät.

	konv.Messung linken Nö	Tholy-Messung linken Nö
n	30	30
\bar{x}	-52,9 mV	-53,8 mV
Med.	-50,5 mV	-49,5 mV
s	19,3 mV	20,6 mV
Min.	-28 mV	-24 mV
Max.	-100 mV	-100 mV

3.1.2 Vergleich der PD-Werte der gesamten Gruppe

Aufgrund der gut übereinstimmenden Korrelationskoeffizienten sowie der nur wenig voneinander abweichenden Interzepte und Steigungen der Regressionsgeraden erschien es zulässig, die Werte der Vergleichsmessungen an beiden Nasenöffnungen zusammen zu betrachten und statistisch auszuwerten (s. Tab. 4 und Abb. 13).

Die durchschnittliche Potentialdifferenz der gesamten Gruppe lag bei $\bar{x} = -51,5$ mV für die konventionelle Messung und $\bar{x} = -52,1$ mV für die Messung mit dem „Tholy“-Gerät.

Tab. 4: Beschreibende Statistik der Ergebnisse der Potentialdifferenzmessung am respiratorischen Epithel der Nase mit der konventionellen (konv.) Meßmethode und der vereinfachten Methode („Tholy“) bei 30 Mukoviszidose-Patienten.

	konv. Messung	„Tholy“-Messung
n	60	60
\bar{x}	-51,5 mV	-52,1 mV
Med.	-51 mV	-50 mV
s	16,8 mV	18,1 mV
Min.	-20 mV	-20 mV
Max.	-100 mV	-100 mV

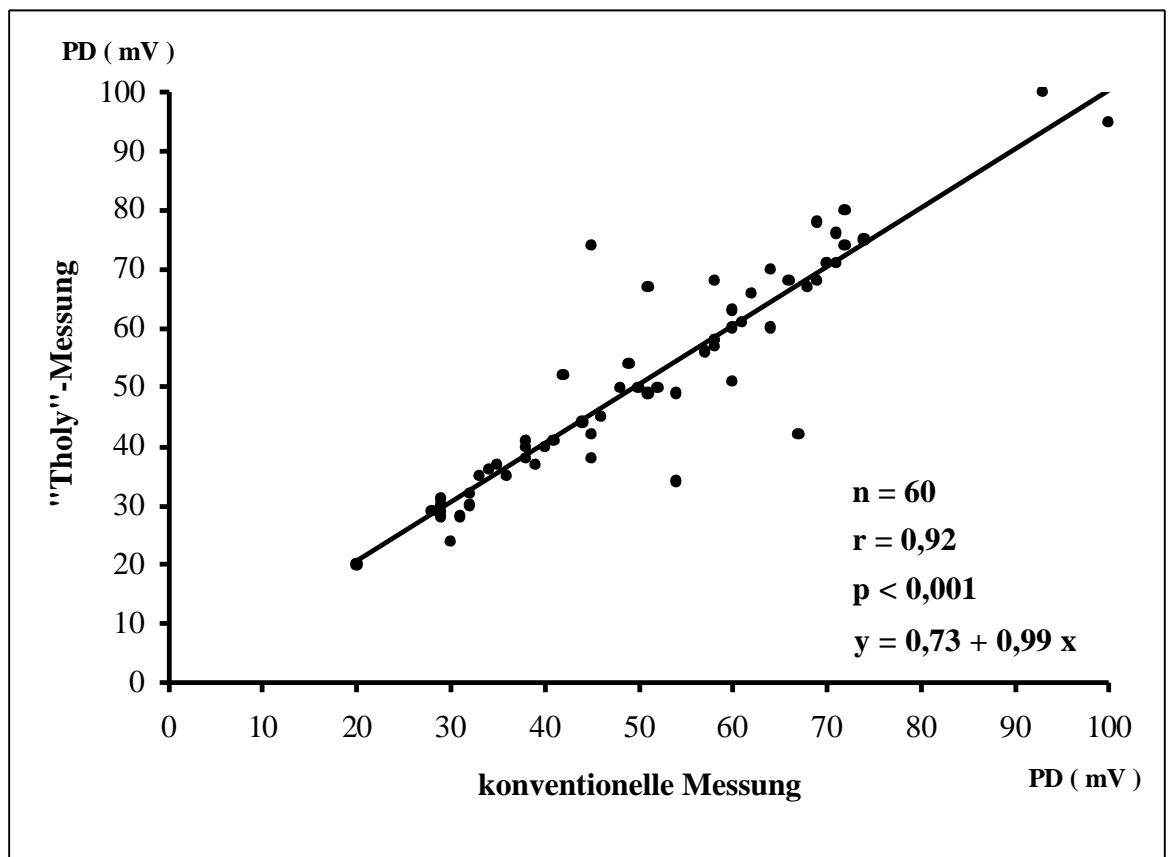


Abb. 13: Ergebnisse der vergleichenden Potentialdifferenz-Messung zwischen der konventionellen und der „Tholy“-Messung. Darstellung aller Vergleichspaare in einer Graphik.

Die nachfolgende Zusammenfassung der Ergebnisse der einzelnen Regressionsanalysen und Regessionsgleichungen verdeutlicht noch einmal, daß mit den beiden eingesetzten Meßgeräten annähernd gleiche PD-Werte gemessen werden. Es zeigt sich auch, daß trotz der geringfügig höheren durchschnittlichen Meßwerte der linken Nasenöffnungen sowohl die Schnittpunkte der Y-Achse als auch die Regressionsanalysen vergleichbare Werte liefern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Gesamtbetrachtung beider Seiten im Sinne einer einzigen Regressionsanalyse durchgeführt. Der unverändert hohe Korrelationskoeffizient für die gesamte Probandengruppe rechtfertigt dieses Vorgehen bei der Auswertung (vgl. Tab.5).

Tab. 5: Übersicht über die Regressionsanalyse anhand der Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgleichungen ($y = a + bx$) für die Vergleichsuntersuchungen zwischen konventioneller und vereinfachter Meßmethode der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz, aufgeschlüsselt nach Nasenöffnungen und als Gesamtgruppe.

	r	y = a + bx
Vergleich re. Nö	0,930	$y = -0,81 + 1,02 x$
Vergleich li. Nö	0,918	$y = 1,83 + 0,98 x$
Gesamtvergleich	0,923	$y = 0,73 + 0,99 x$

Die vergleichenden Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß man beide Meßgeräte zur Bestimmung der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz in der Praxis einsetzen kann, da die gemessenen Werte der beiden Geräte gleichzusetzen sind.

3.2 Praktische Anwendung der PD - Messung

Für die weiteren Untersuchungen wurde auf die konventionelle Meßmethode zurückgegriffen, da es für die „Tholy“-Elektroden noch keine Untersuchungen über die Beeinflussung durch Medikamente gab (vgl. Kap. 2.9). Darüber hinaus hat das konventionelle Meßverfahren den Vorteil, daß es für mehrmalige Messungen am Patienten besser geeignet ist und vor allem einen geringeren Materialaufwand mit sich bringt.

3.2.1 PD-Meßergebnisse von CF-Patienten und einer Kontrollgruppe

Bei der statistischen Auswertung von größeren Patientenkollektiven, die mit dem konventionellen Verfahren der Potentialdifferenzmessung untersucht wurden, zeigte sich eine Normalverteilung der gemessenen Ausgangs-PD-Werte sowohl bei Mukoviszidose-Patienten als auch bei gesunden Probanden (s. Abb. 14).

Aus der nachfolgenden Abbildung ist zu entnehmen, daß es zwischen -26 und -42 mV einen Überlappungsbereich zwischen den PD-Werten von Gesunden und Mukoviszidose-Patienten gibt.

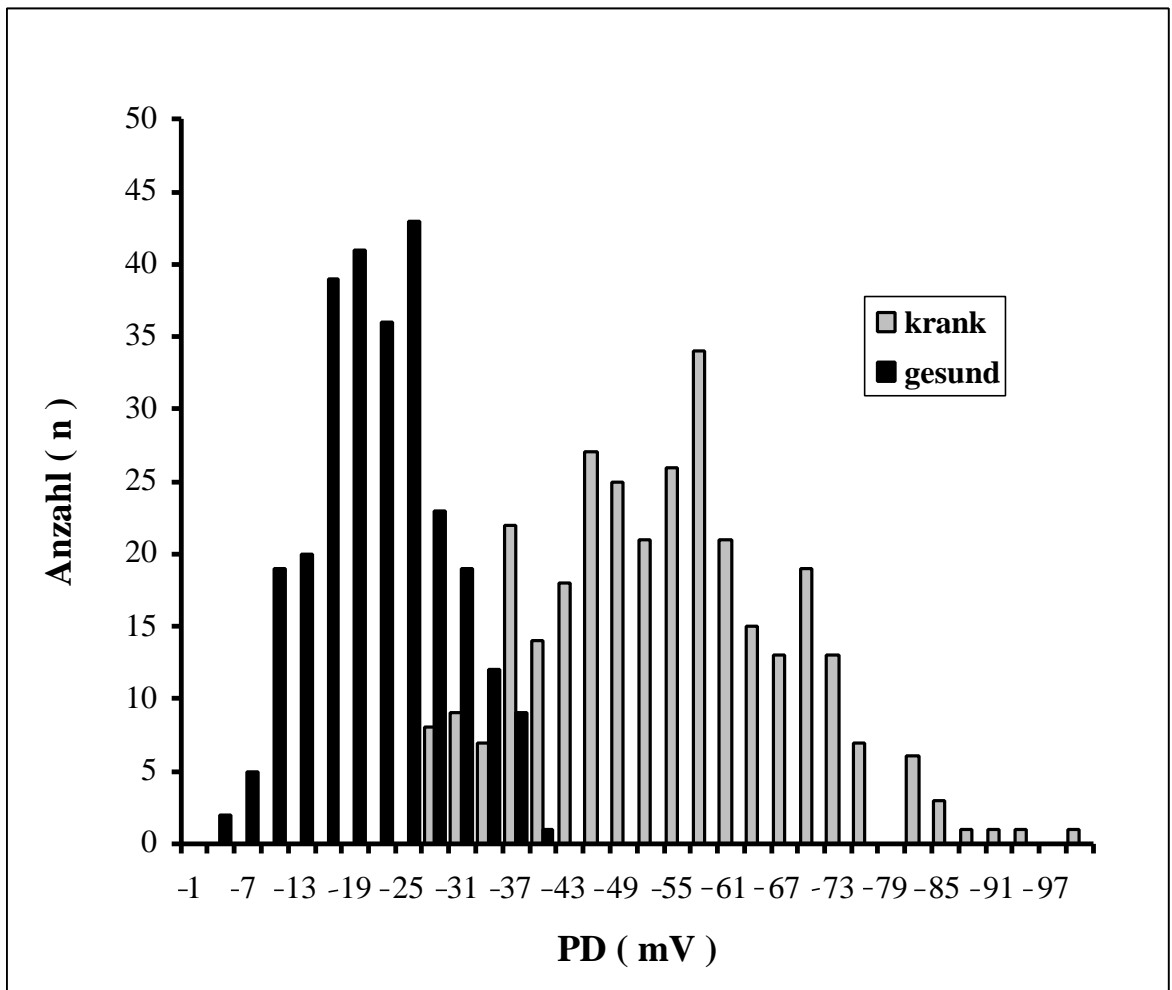


Abb. 14: Nasale transepitheliale Potentialdifferenz:
 Verteilung der Sollwertbereiche bei gesunden Probanden ($n = 492$) und der Basis-PD-Werte bei Mukoviszidose-Patienten ($n = 282$) ohne Rhinitis.
 Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der konventionellen Meßmethode ermittelt.

3.2.2 Untersuchung der Wirkung der Medikamentenkombination von Amilorid und Fenoterol

Ziel dieser Untersuchung mit der Medikamentenkombination war es, eine weitere Differenzierung von Patienten, deren PD-Werte sich im beobachteten Überlappungsbereich befanden, zu ermöglichen. Untersucht wurde die Veränderung der PD nach nasaler inhalativer Applikation von Fenoterol im Anschluß an Amilorid in der Hoffnung, spezifische Reaktionen der beiden Untersuchungsgruppen zu erhalten.

Die Untersuchungen wurden an 33 CF-Patienten (Alter 9-29 Jahre) und 38 Nicht-CF-Probanden (Alter 9-34 Jahre) durchgeführt.

Für die Gruppe der Mukoviszidose-Patienten ergaben sich durchschnittliche Basis-PD-Werte von $\bar{x} = -36,9 \pm 15,2$ mV, die zu Beginn jeder Untersuchung erfaßt wurden. Deutlich niedrigere Ausgangswerte von $\bar{x} = -16,2 \pm 8,3$ mV wurden für die Vergleichsgruppe ermittelt (s. Tab. 6).

Tab.6: Ausgangswerte der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz von CF- und Nicht-CF-Probanden

	CF-Patienten	Nicht-CF-Patienten
n	33	38
\bar{x}	-36,9 mV	-16,2 mV
Med.	-41 mV	-15 mV
s	15,2 mV	8,3 mV
Min.	-10 mV	-5 mV
Max.	-67 mV	-41 mV

3.2.2.1 Ergebnisse nach der Amiloridinhalation

Nach Inhalation von Amilorid, einem spezifischen Natrium-Kanal-Blocker, sanken die PD-Werte bei allen Probanden ab. Die erneute Bestimmung der Potentialdifferenz wurde direkt nach Beendigung der Inhalation vorgenommen.

Das Absinken der Basis-PD-Werte von beiden Gruppen nach Blockade des Natriumeinstromes läßt sich durch die Kumulation positiver Valenzen auf der luminalen Seite erklären (vgl. Abb. 1).

Das Vorgehen ist in Abbildung 15 exemplarisch dargestellt.

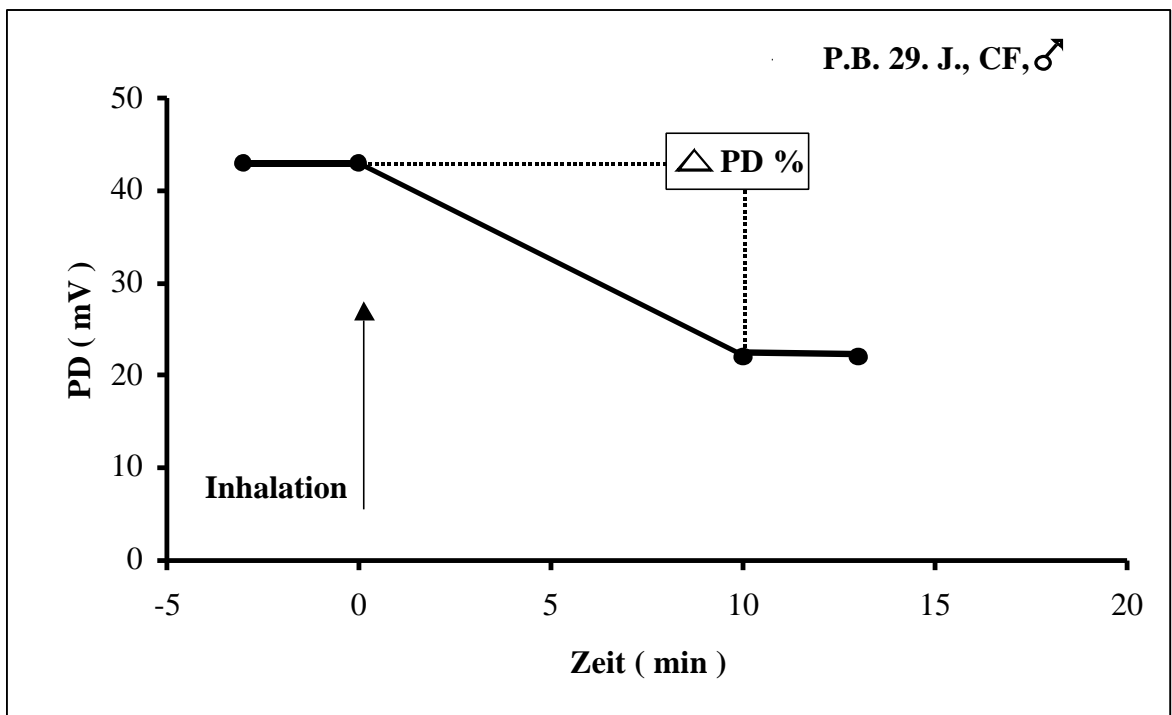


Abb. 15: Exemplarische Darstellung der Amiloridantwort nach Inhalation von 2 ml Amilorid in einer Konzentration von 0,3 mg / ml bei einem 29jährigen CF-Patienten.

Für das Vergleichskollektiv ergab sich ein prozentualer Abfall der PD-Werte um durchschnittlich 35,2 % und für die Gruppe der CF-Patienten von 53,4 %.

In der Abbildung 16 sind die gewonnenen Ergebnisse graphisch dargestellt, in Tabelle 7 sind die statistischen Daten zusammengestellt.

Tab.7: Ergebnisse der Potentialdifferenzen beider Probandengruppen nach der Inhalation von 0,3 mg / ml Amilorid

	CF-Patienten	Nicht-CF-Patienten
n	33	38
\bar{x}	-17,2 mV	-10,5 mV
Med.	-16 mV	-10 mV
s	9,0 mV	4,8 mV
Min.	-6 mV	-3 mV
Max.	-40 mV	-23 mV

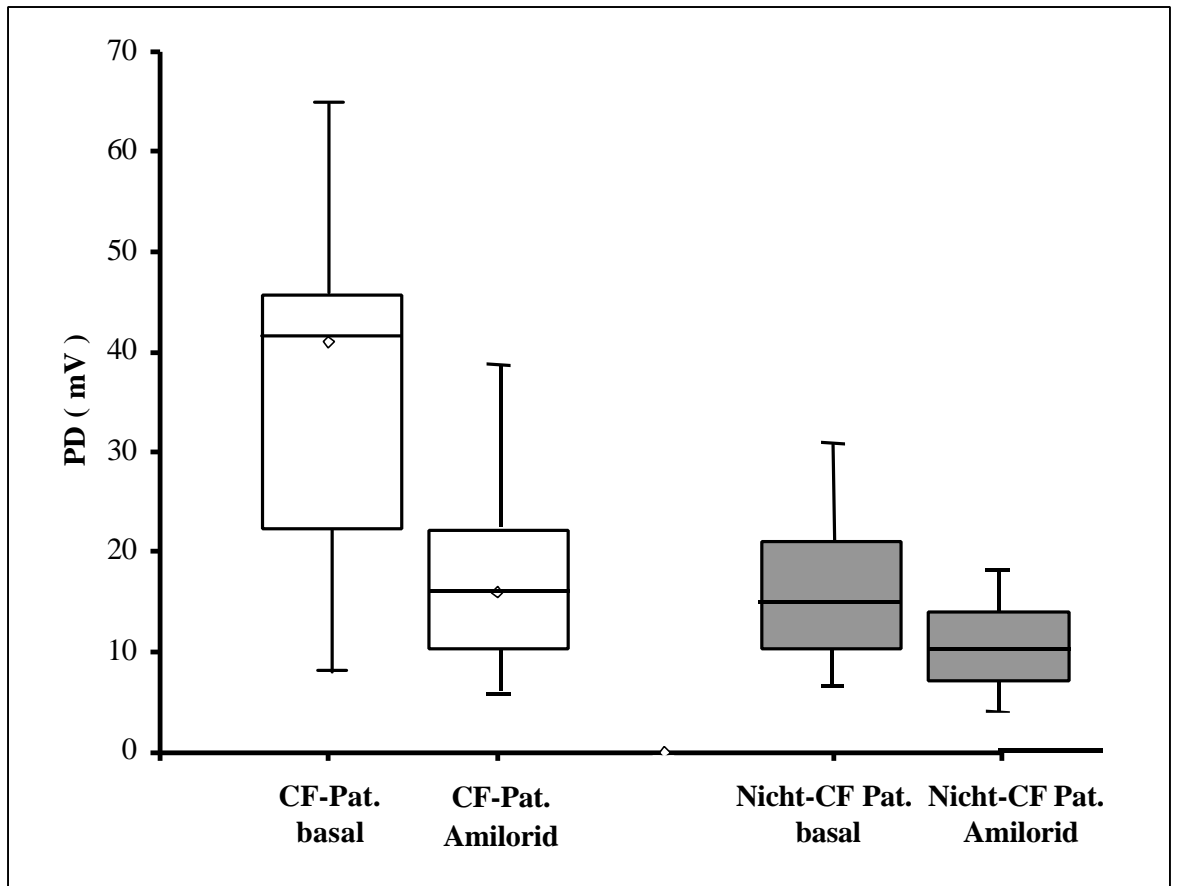


Abb. 16: Senkung der PD-Werte nach Applikation von Amilorid, für CF-Patienten und Nicht-CF-Probanden. Darstellung mittels *Box und Whisker* Diagrammen.

Erläuterung der Markierungen:

Äußere Markierung: 95 % Vertrauensbereich

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

Markierung innerhalb der Kästen: Median

3.2.2.2 Ergebnisse nach der Fenoterolinhalation

Im Anschluß an die Amilorid-Applikation, mit der der Natriumionentransport blockiert wurde, erfolgte die Applikation von Fenoterol. Dieses Medikament induziert normalerweise eine Chloridsekretion durch die Öffnung von c-AMP gesteuerten Chlorid-Kanälen (vgl. Abb. 1). Bei den Mukoviszidose-Patienten fand sich nach Fenoterol keine Reaktion, da infolge des Gendefektes der Wirkstoff diese Kanäle nicht oder nur partiell aktivieren kann.

Bei der Gruppe der Gesunden kam es durch die vermehrte Ansammlung von negativen Valenzen zu einem Wiederanstieg der zuvor abgefallenen PD-Werte. Die Tabelle 8 zeigt die zusammengefaßten Ergebnisse nach der Fenoterolinhalation.

Tab.8: Ergebnisse nach der Applikation von 0,25 mg / ml Fenoterol bei den zwei untersuchten Gruppen.

	CF-Patienten	Nicht-CF-Patienten
n	33	38
\bar{x}	-16,8 mV	-14,8 mV
Med.	-14 mV	-13 mV
s	8,1 mV	4,5 mV
Min.	-7 mV	-7 mV
Max.	-41 mV	-27 mV

Prozentual stiegen die PD-Werte des Vergleichskollektivs im Mittel um 41,0 % an, die der Mukoviszidose-Patienten fielen sogar um weitere 2,3 % ab. Der Unterschied zur PD-Antwort von Nicht-CF-Probanden nach der inhalativen Applikation von Fenoterol gegenüber den Mukoviszidose-Patienten ist statistisch signifikant ($p < 0.01$). In Abbildung 17 wird dies graphisch verdeutlicht.

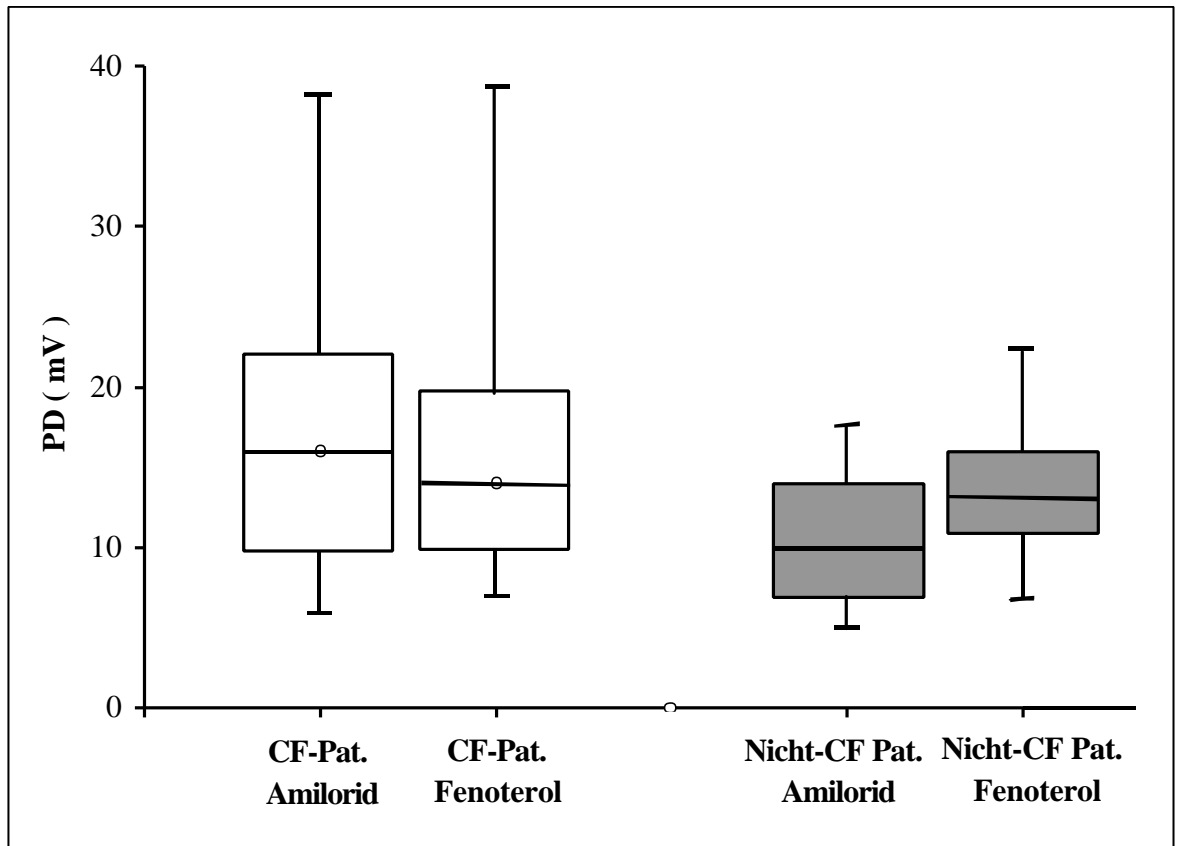


Abb. 17: Darstellung der Ergebnisse der transepithelialen Potentialdifferenzmessung (PD) anhand von Box und Whisker-Diagrammen. Nach vorausgegangener Natriumkanalblockade mit Amilorid bzw. nach Stimulation der c-AMP-gesteuerten Chloridsekretion bei CF-Patienten und bei Nicht-CF-Probanden.

Erläuterung der Markierungen:

Äußere Markierung: 95 % Vertrauensbereich

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

Markierung innerhalb der Kästen: Median

3.3 Ergebnisse der Pilotstudie zur Wirksamkeit und Wirkdauer von Amilorid und Benzamil

Benzamil gilt *in vitro* als hochwirksamer Natrium-Kanal-Blocker, der Amilorid überlegen ist. Um die Wirksamkeit der beiden Substanzen Amilorid und Benzamil am Patienten objektivieren zu können, bedienten wir uns der Bestimmung der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz.

An der Studie nahmen 41 CF-Patienten im Alter von 5-35 Jahren teil (s. Tab. 9). Der erhebliche Altersunterschied zwischen den Amilorid- und Benzamil-Gruppen ist auf die Auflage der Ethikkommission der JLU-Gießen zurückzuführen, daß alle Patienten, denen die Benzamillösung appliziert werden sollte, 18 Jahre oder älter sein mußten.

Trotz des Altersunterschiedes gab es jedoch bezüglich der Ausgangswerte der Potentialdifferenz keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Amilorid-Gruppe und der Benzamil-Gruppe (s. Tab. 9).

Ziel war es, mittels PD-Verlaufsbeobachtung *in vivo* an CF-Patienten eventuelle Wirkungsunterschiede zu objektivieren. In diese Studie wurden 41 CF-Patienten einbezogen, wobei sich 6 Patienten für mehrere Messungen zur Verfügung stellten. Daraus resultiert der Unterschied zwischen der Anzahl der Probanden und der Anzahl der PD-Messungen.

Tab. 9: Tabellarische Darstellung der beiden Patientenkollektive und die Ergebnisse der Ausgangsmessungen.

	Amiloridkollektiv	Benzamilkollektiv
n	35	12
Alter (Jahre)	5-35 J.	18-35 J.
Ausgangs-PD (mV)	-49,3 ± 2,1 mV	-47,9 ± 2,5 mV

Die erste Gruppe wurde unterteilt in 4 Kollektive, die Amilorid-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen inhalierte, die zweite Gruppe in 2 Kollektive, die Benzamil-Lösung in unterschiedlicher Konzentration inhalierten (s. Tab. 10). Wegen der zum Teil sehr langen Wirkdauer und der damit verbundenen Belastung der Patienten wurden die Messungen der nasalen PD-Werte bei der höchsten Konzentration des Benzamils nicht bis zum Wiedererreichen der Ausgangswerte weiterverfolgt.

Aus diesem Grund wurde das Maß für die Wirkdauer mit der WZ50 neu definiert. WZ50 bezeichnet den Zeitpunkt, zu dem die PD-Werte 50 % der Ausgangswerte wieder erreicht haben(vgl. Abb. 18 und Kap. 2.9.3 B).

Die Bezeichnung Δ PD% gibt die initialen PD-Senkung nach der nasalen Applikation des jeweiligen Medikamentes an.

Die Ergebnisse dieser Studie sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt (s. Tab. 10).

Tab. 10: Die pharmakologischen Einflüsse der Natrium-Kanal-Blocker Amilorid und Benzamil auf die nasale transepitheliale Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel der Nase bei Mukoviszidose-Patienten:
Ergebnisse von 47 CF-Patienten nach der Applikation von 4 verschiedenen Konzentrationen einer Amiloridlösung und 2 verschiedenen Konzentrationen einer Benzamillösung. Dargestellt sind die initiale prozentuale PD-Senkung (Δ PD%), der Wiederanstieg der Werte bis zur halbmaximalen PD-Senkung (WZ50) und die Zeit für das Erreichen der Ausgangswerte.

Wirkstoff und Konzentration	n	DPD%	WZ50 (h)	Wiedererreichen der Basis-PD-Werte
Amilorid 10^{-3} M	16	$64,2 \pm 3,3$	$0,7 \pm 0,02$	≈ 55 min
Amilorid $3 \cdot 10^{-3}$ M	9	$74,4 \pm 2,4$	$1,1 \pm 0,04$	≈ 80 min
Amilorid $6 \cdot 10^{-3}$ M	7	$75,6 \pm 3,5$	$1,6 \pm 0,06$	≈ 130 min
Amilorid 10^{-2} M	3	$81,3 \pm 2,5$	$2,2 \pm 0,12$	≈ 185 min
Benzamil $1,7 \cdot 10^{-3}$ M	7	$74,9 \pm 3,0$	$1,7 \pm 0,3$	≈ 180 min
Benzamil $7 \cdot 10^{-3}$ M	5	$76,2 \pm 4,2$	$4,5 \pm 0,6$	> 300 min

Exemplarisch ist der Verlauf der PD / Zeit-Kurve für die höchste Benzamil-Konzentration in der Abbildung 18 dargestellt.

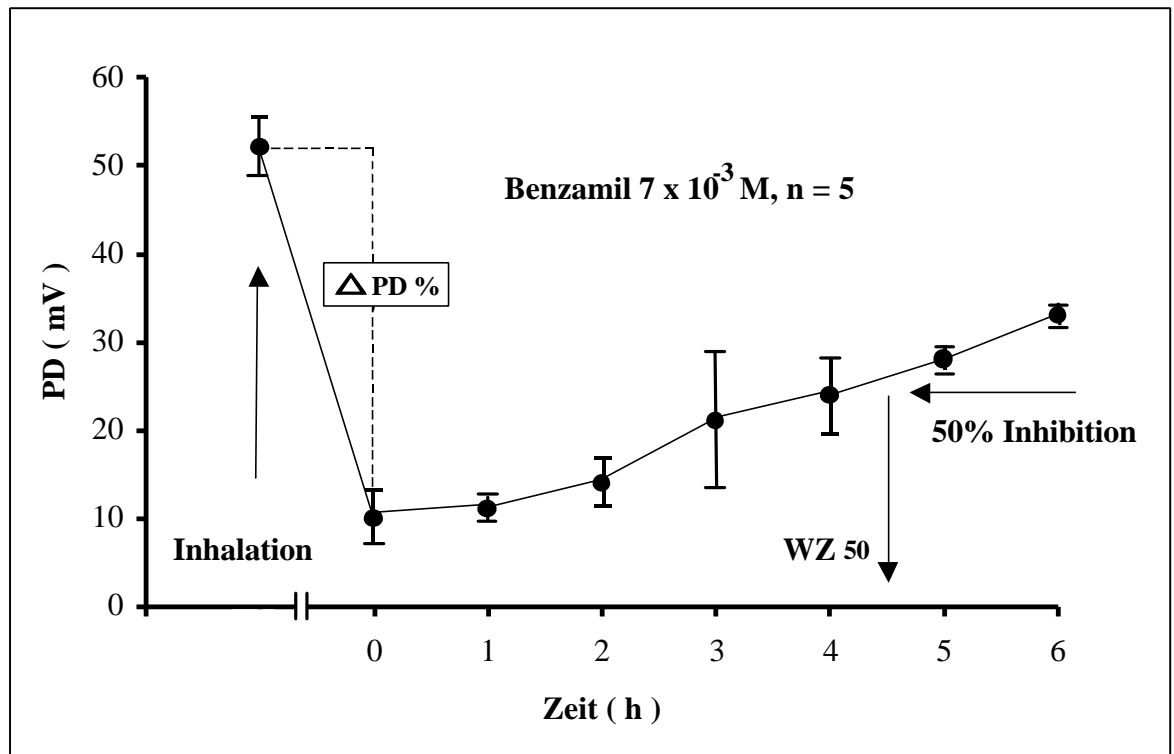


Abb. 18: Die Wirkung von $7 \cdot 10^{-3}$ M Benzamillösung auf die nasale PD nach inhalativer Applikation bei 5 CF-Patienten:
Die initiale PD-Senkung betrug $76,2 \pm 4,2$ % ($\Delta PD\%$), die Zeit des Wiederanstiegs der Werte auf das Ausgangsniveau lag über 6 Stunden. Die WZ50 betrug bei dieser Benzamil-Konzentration $4,5 \pm 0,6$ Stunden.

$\Delta PD\%$: Maximale PD-Senkung nach nasaler Amiloridinhalation

WZ50: Der Zeitpunkt, zu dem die PD-Werte 50 % der Ausgangswerte wieder erreicht hatten

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die initiale PD-Senkung sind für alle Inhalationslösungen in der Abbildung 19 aufgezeigt. Amilorid bewirkt mit steigender Konzentration einen tendenziell deutlicheren Abfall der nasalen PD-Werte ($\Delta PD = 64,2 \% - 81,3 \%$), während Benzamil in beiden verabreichten Konzentrationen zu annähernd gleichem maximalem PD-Abfall führt ($\Delta PD = 74,9 \%$ und $76,2 \%$).

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen der $\Delta PD\%$ zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Dies weist darauf hin, daß beide Medikamente in der verwendeten Konzentration zu einer maximalen Blockade der Natrium-Kanäle führen.

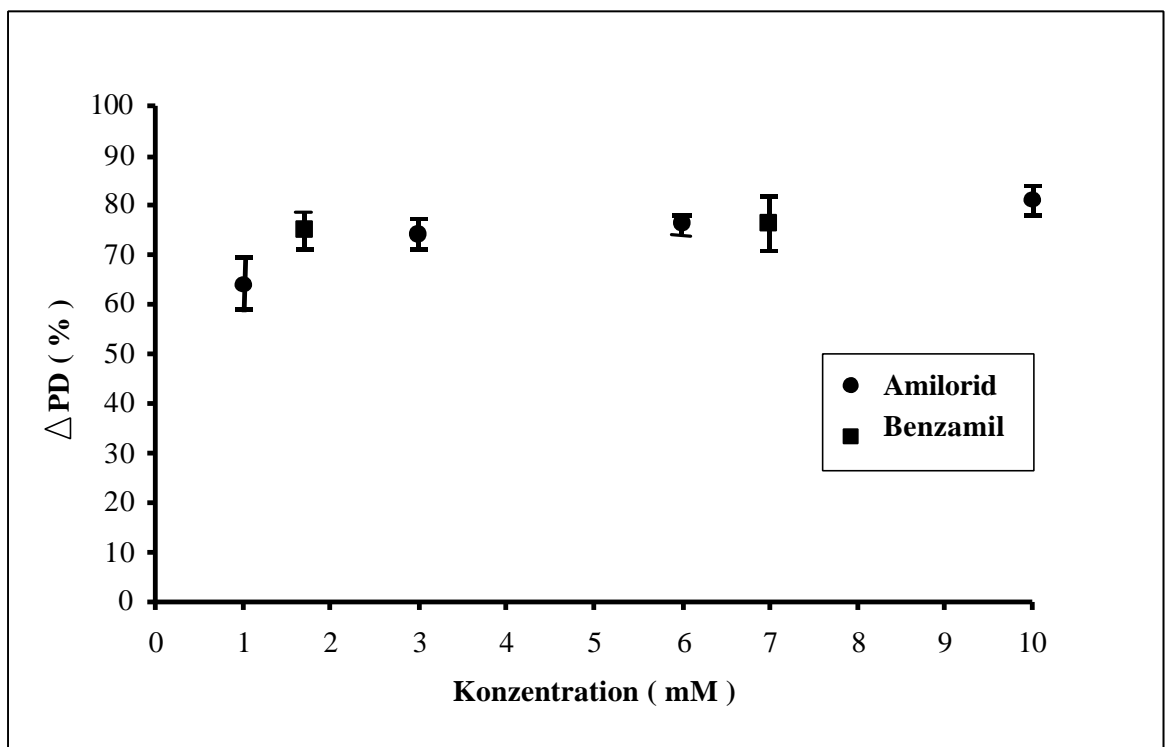


Abb. 19: Senkung der nasalen Potentialdifferenz nach der inhalativen Applikation von Amilorid- und Benzamil-Lösung in verschiedenen Konzentrationen, dargestellt als prozentualer Abfall der Ausgangs-PD-Werte.

$\Delta PD\%$: Maximale PD-Senkung nach nasaler Amiloridinhalation

Analog wurde die WZ50-Zeit für alle Inhalationslösungen in der Abbildung 20 graphisch dargestellt.

Die WZ50-Werte der verschiedenen Konzentrationen der Amiloridlösungen korrelieren eng miteinander ($r = 0.99$, $p < 0,001$).

Obwohl nur zwei verschiedene Konzentrationen von Benzamil getestet wurden, ist zu erkennen, daß die WZ50 von Benzamil etwa doppelt so groß ist wie die der äquivalenten Konzentration von Amilorid. Im einzelnen zeigt sich, daß die WZ50-Werte der höher dosierten Benzamilgruppe ($7 \cdot 10^{-3}$ M) größer sind als die der beiden äquivalenten Amiloridgruppen ($6 \cdot 10^{-3}$ M und 10^{-2} M). Das gleiche gilt für die niedriger dosierte Benzamilgruppe ($1,7 \cdot 10^{-3}$ M) im Vergleich mit den beiden äquivalenten Amiloridgruppen (10^{-3} M und $3 \cdot 10^{-3}$ M).

Aufgrund der linearen Regression ist die Nullhypothese abzulehnen ($p < 0,01$), d.h. der Wirkungsunterschied der beiden Medikamente im Hinblick auf die Potentialdifferenz ist signifikant.

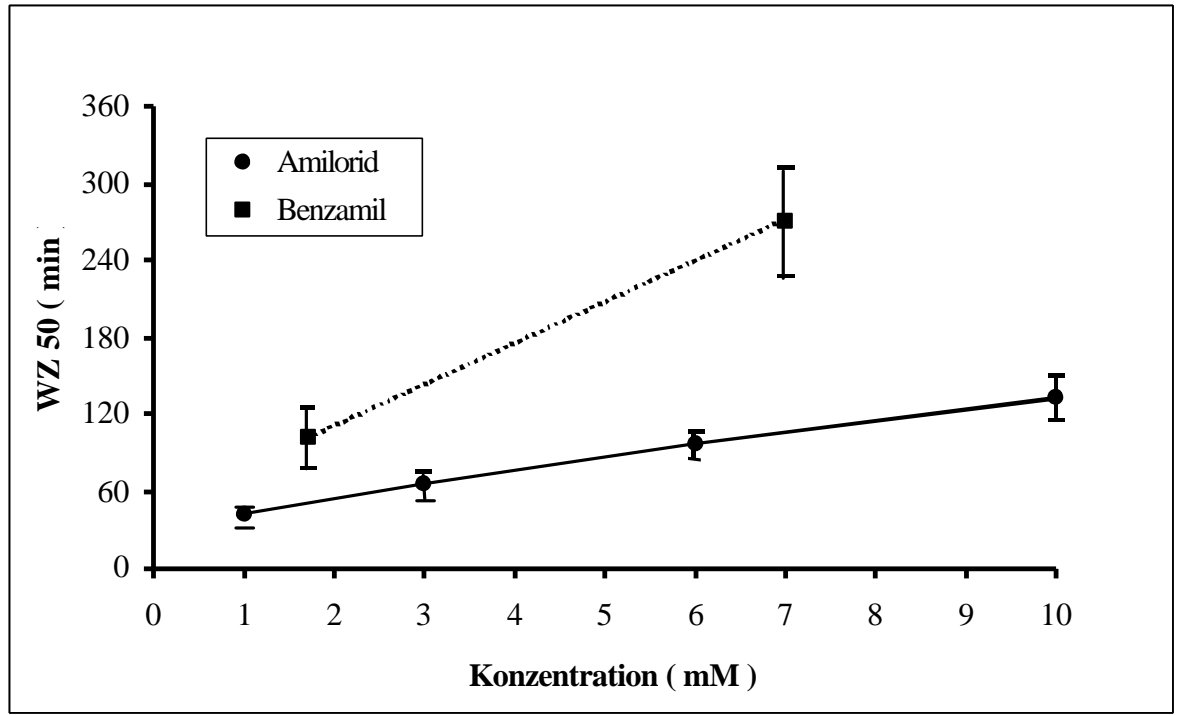


Abb. 20: Die Dauer der PD-Senkung nach inhalativer Applikation von Amilorid und Benzamil in verschiedenen Konzentrationen, dargestellt als die Zeit bis zum Wiedererreichen der halbmaximalen PD-Senkung (WZ50). Die zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Regressionsgleichung für Amilorid (WZ50) $y = 0,51 + 0,17 x$

Regressionsgleichung für Benzamil (WZ50) $y = 0,80 + 0,53 x$

4 Diskussion

4.1. Allgemeines zur PD-Messung

Bis vor einigen Jahren fand die Bestimmung der Potentialdifferenz vorzugsweise in der Biologie und Physiologie bei Messungen an Tieren und menschlichen Zellen bzw. Zellverbänden Anwendung. Seit 1981 wird von verschiedenen Arbeitsgruppen über Messungen am Menschen und ihren diagnostischen Werten berichtet [19, 75]. Wegen methodischer Probleme hat sich das Verfahren bisher jedoch noch nicht durchsetzen können. Die von *Knowles et al.* eingeführte Methode der transepithelialen Potentialdifferenzmessung am respiratorischen Epithel (PD) dient der Beurteilung der Funktion des respiratorischen Flimmerepithels und der Membranfunktion *in vivo* [75]. Dabei werden elektrische Spannungen gemessen, die durch die Summe der verschiedenen Ionenströme entstehen. Wie eingangs beschrieben entsteht beim Mukoviszidose-Patienten sehr wahrscheinlich als Folge einer defekten Chlorid-Ionen-Sekretion und der daraus resultierenden gesteigerten Natrium-Ionen-Absorption eine deutlich erhöhte Spannung im Vergleich zu Nicht-CF-Patienten. Üblicherweise wird die PD am respiratorischen Flimmerepithel unterhalb der Concha inferior der Nase gemessen. Von einer dänischen Arbeitsgruppe wurde kürzlich der posteriore Bereich der medialen Nasenmuschel für die Bestimmung der PD als Alternative beschrieben [43]. Der Vorteil dieses Meßortes ist nach Ansicht der Autoren die bessere Einsehbarkeit des zu untersuchenden Gebietes. Diese positive Einschätzung war nach eigener Beobachtung allerdings nicht nachzuvollziehen.

Die verwendete konventionelle Meßvorrichtung ist in der Zusammensetzung und Wartung der einzelnen Elemente aufwendig (s. Abb. 2). Durch verschiedene Schlauchsysteme und kompliziert herzustellende Agargelverbindungen ist die Meßanordnung sehr störanfällig. Es bedarf einiger Erfahrung und manueller Geschicklichkeit, um das System zu warten und zu

bedienen. Dennoch gilt die von *Boucher* entwickelte Methode bis heute als „golden standard“, wenn es um die Bestimmung der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz geht [19].

Mehrere Arbeitsgruppen bemühten sich um die Entwicklung eines vereinfachten PD-Meßgerätes, das für den Einsatz in der Praxis und eine breite klinische Anwendung geeignet ist. Die größten Fortschritte auf diesem Gebiet erzielten *Hofmann et al.*, die ein handliches, gut transportierbares Meßgerät entwickelten, das in Größe und Form einem Telefon vergleichbar ist. Im Gegensatz zu den Fließelektroden besitzt dieses Gerät einen chlorierten Silberdraht als Meßelektrode und eine handelsübliche EKG-Klebelektrode als Referenzelektrode. *Hofmann* beschrieb bereits damals das Auftreten von Störspannungen, die per Abgleich an der Referenzelektrode quantifiziert und anschließend subtrahiert wurden [59, 62].

Nach einer längeren Anwendungszeit stellte sich jedoch heraus, daß die auftretenden Offset-Potentiale keine Konstanz aufwiesen. Bei Vergleichen der Störpotentiale vor und nach einer Patientenmessung waren erhebliche Unterschiede in der Größenordnung von ± 10 mV nachzuweisen. Eine verlässliche Interpretation der Meßergebnisse war dadurch erschwert. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, für das von *Hofmann et al.* entwickelte PD-Meßgerät „Tholy“ besser geeignete Meß- und Referenzelektroden zu entwickeln.

4.2. Entwicklung von neuen Elektroden für das PD-Meßgerät „Tholy“

4.2.1 Probleme mit den alten Elektroden

Zu Beginn war es nötig, Probleme, die beim Meßvorgang auftraten, zu erfassen und die Fehlerquellen bei der Herstellung der bis dahin verwendeten Elektroden herauszufinden. Zu diesem Zweck wurden mehrere Vergleiche in Form von Nullabgleichsmessungen zwischen dem vereinfachten PD-Meßgerät „Tholy“ mit epikutaner Referenzelektrode und der konventionellen Meßmethode mit subkutaner Referenzelektrode durchgeführt. Die Elektroden des „Tholy“-Gerätes bildeten nach kurzer Meßdauer Potentiale unterschiedlicher Größe und Vorzeichen aus. Vermutlich handelte es sich dabei um Halbzellen-Potentiale, die am Metall-Elektrolyt-Übergang entstanden (s. Kap. 2.4.3).

Einige Ergebnisse der Voruntersuchungen deuteten darauf hin, daß die unterschiedliche Zusammensetzung der epikutanen Referenzelektrode und der Meßelektrode Ursache für einen Teil der Halbzellenpotentiale sein könnten. Versuche mit identischen Elektroden für den Meß- und Referenzbereich bestätigten die Vermutungen. Dennoch zeigten auch diese Elektroden die Tendenz, Potentiale auszubilden. Eine eindeutige Ursache für diese Potentiale konnte nicht gefunden werden.

4.2.2 Vorteile subkutaner Elektroden sowie notwendige Modifikationen

Aus den Erkenntnissen der ersten Vergleichsmessungen entstand die Überlegung, von der EKG-Klebelektrode als Referenz Abstand zu nehmen und eine neue Referenzelektrode zu entwickeln.

Da es nur wenige Studien mit einer epikutanen Referenzelektrode gibt und verschiedene Arbeitsgruppen auch zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen mit dieser Form der transepithelialen Potentialdifferenzmessung kommen, fiel die Entscheidung zugunsten der Fertigung einer subkutanen Elektrode [3, 59, 71].

Die subkutane Elektrode, wie sie auch bei der konventionellen Meßmethode eingesetzt wird, hat den Vorteil, daß sie ständig in direktem Kontakt mit dem jeweiligen Meßort steht. Der bei den Meßergebnissen der epikutanen Elektrode trotz sorgfältiger Hautpräparation verbleibende Hautwiderstand entfällt bei der subkutanen Form der Messung. Weiterhin können Störpotentiale, die durch das Einschleusen von „Fremdionen“ mit dem Schweiß entstehen oder andere mögliche Einflüsse von außen durch die subkutane Platzierung reduziert werden [118].

Nachteile, wie sie auch von anderen Autoren beschrieben werden, sind die mit dem subkutanen Einstich verbundenen Schmerzen und das Risiko einer Irritation oder Infektion trotz vorausgegangener Hautdesinfektion. Die daraus entstehenden, meist harmlosen Komplikationen bedürfen in der Regel nur einer lokalen antiphlogistischen Maßnahme und in Ausnahmefällen einer antibiotischen Therapie [3, 59].

Ein Problem, das sich aus der Entscheidung für eine subkutane Referenzelektrode ergab, war die Tatsache, daß es keine genaue Bauanleitung für eine aus Silber / Silberchlorid bestehende subkutane Elektrode gab. Die in der Literatur beschriebenen Elektroden waren zumeist für den epikutanen Einsatz bestimmt [108, 29, 89].

Bei der Entwicklung einer eigenen Elektrode richtete sich die Aufmerksamkeit zunächst auf die Stabilität der Meßwerte bei den Nullabgleichsmessungen, die Schwierigkeiten bereitete. Verschiedene Veränderungen der ursprünglichen Herstellungsmethode bei der Chlorierung der Silberdrähte brachten keine Verbesserungen.

Ursache dafür war vermutlich die Nichtbegrenzung der Stromdichte bei der Produktion [47]. Mit dem Einsatz einer Konstantstromquelle und der Begrenzung der Stromdichte auf 2 mA/cm² konnte eine stabilere Chloridschicht auf den Silberdraht aufgebracht werden.

Durch Sättigung der isotonischen Kochsalzlösung mit Silberchlorid ließ sich die Stabilität der Chloridschicht letztlich so weit verbessern, daß die Elektroden über mehrere Monate fertig zusammengebaut gelagert werden konnten, ohne daß Veränderungen der Chloridschicht und damit der Meßgenauigkeit nachzuweisen waren.

Der entscheidende Fortschritt gelang erst mit der Isolierung der Elektroden. In Anlehnung an den Aufbau von pH-Elektroden entstand die Idee, die Elektroden zum Schutz vor äußeren Einflüssen zu ummanteln.

Nach Isolierung beider Elektroden waren bei den Nullabgleichsmessungen konstante Werte zu erzielen. Dies spricht dafür, daß tatsächlich äußere Einflüsse für die Ausbildung der gemessenen Offset-Potentiale verantwortlich waren. Vergleichsmessungen an Patienten mit dem konventionellen Meßgerät und dem „Tholy“-Gerät mit den neuen Elektroden erbrachten eine hohe Übereinstimmung der mit den beiden PD-Meßgeräten ermittelten einzelnen Meßwerte ($r = 0,93$).

Allerdings mußte für den Kontakt der Referenzelektrode mit dem subkutanen Bindegewebe eine eigene Lösung erarbeitet werden. Nach dem Einstechen des i.v.-Katheters wurde ein Bolus von ca. 2 ml isotoner Kochsalzlösung in das Gewebe injiziert und der gesamte Katheter beim Entfernen der Nadel luftfrei mit Kochsalzlösung befüllt. Aufgrund dieser speziellen Technik, war es möglich, nach dem Zusammenstecken von Referenzelektrode und i.v.-Katheter, PD-Messungen bis zu 30 Minuten durchzuführen. Die injizierte Flüssigkeitsmenge verteilte sich in dieser Zeit im Gewebe, so daß bei länger andauernden Untersuchungen wiederholt isotonische Kochsalzlösung nachgespritzt werden mußte.

Für zeitlich aufwendige Verlaufsbeobachtungen stellt dieses Vorgehen einen Nachteil gegenüber der konventionellen Meßmethode dar. Wird das „Tholy“-Gerät jedoch in der normalen Ausschlußdiagnostik eingesetzt, so wirkt sich die zeitliche Begrenzung nicht nachteilig aus, da eine einfache PD-Ausschlußmessung maximal 15 Minuten beansprucht.

Um die Elektroden zukünftig auch in der Routinediagnostik und in der Verlaufsbeobachtung der Mukoviszidose einsetzen zu können, ist es notwendig, Einflüsse und Wechselwirkungen zwischen Elektroden und Medikamenten auszuschließen.

4.2.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Nutzung der neu entwickelten Elektroden

Es ließ sich nachweisen, daß die mit der herkömmlichen und der neuen Meßvorrichtung erzielten Ergebnisse gute Übereinstimmungen aufweisen (s. Tab. 5). Mit den neu entwickelten Elektroden für das vereinfachte Potentialdifferenz-Meßgerät „Tholy“ können stabile und gut reproduzierbare PD-Werte gemessen werden. Die neuen Elektroden zeigen gegenüber den ursprünglich verwendeten Elektroden nicht mehr die Tendenz, eigenständige Potentiale aufzubauen. Dementsprechend ließen sich in einer Vergleichsmessung bessere Ergebnisse erzielen, als dies mit den alten Elektroden möglich war [vgl. 59]. Der Korrelationskoeffizient der damaligen Messung lag bei $r = 0,83$ ($n = 58$) im Vergleich der beiden Meßmethoden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,92$ ($n = 60$) zwischen den beiden Meßmethoden erzielt.

Im Gegensatz zu dem konventionellen PD-Meßgerät bietet das vereinfachte Meßgerät noch weitere Vorteile. Die mobile Einsetzbarkeit und die unkomplizierte Bedienung des Gerätes ermöglichen eine breite klinische Anwendung, so daß in Forschung und Diagnostik die PD-Bestimmung weiter vorangetrieben werden kann. Durch die Möglichkeit, die zugehörigen Elektroden schnell austauschen zu können, ist das Gerät zu jeder Zeit einsatzfähig. Eine bakterielle Kontamination anderer Patienten kann auf diese Weise minimiert werden. Gravierende Störungen und eine aufwendige Wartung des Gerätes wurden in den zwei Jahren, in denen es für diese Untersuchungen im Einsatz war, nicht festgestellt. Eine kostengünstigere und zeitsparendere Herstellungsweise für die neuen Elektroden, wie sie zur Zeit angestrebt wird, stellt die letzte große Barriere für die Einführung des vereinfachten PD-Meßgerätes in die Praxis dar.

4.3 Pharmakologische Untersuchungen

4.3.1 Allgemeines

Ziel dieses Teils der Untersuchung war die Verbesserung der Diagnostik und Therapie bei Mukoviszidose. Bedingt durch den genetischen Defekt des CFTR-Membranproteins kommt es bei der Mukoviszidose zu einer Ionentransportstörung. Die Auswirkungen des fehlerhaft ausgebildeten c-AMP-abhängigen Chloridionen-Kanals sind nach vorherrschender Auffassung eine verminderte Chloridsekretion bei gesteigerter Natriumabsorption [19, 74, 80, 33, 46]. Dies wiederum ist die Grundlage für die klinische Symptomatik der CF-Erkrankung und für die Erhöhung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD) bei Mukoviszidose-Patienten [77, 78]. Zur Objektivierung der Effekte und der Bestimmung der Wirkungsdauer von inhalativ verabreichten Medikamenten ist die Messung der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz daher besonders geeignet.

Die Zellen der Ausführungsgänge von Schweißdrüsen absorbieren normalerweise nur Ionen, aber kein Wasser, was ein hypotones Sekret auf der Körperoberfläche zur Folge hat [124, 107]. Auf dieser Erkenntnis basiert eine andere Hypothese, die die Störungen und die Zusammensetzung der Ionenströme am respiratorischen Epithel von CF-Patienten zu erklären versucht:

Die Arbeitsgruppe um *Welsh* geht davon aus, daß normales Atemwegsepithel ebenfalls Ionen, aber kein Wasser absorbiert. Übertragen auf die CF-Patienten bedeutet es, daß das Atemwegsepithel dieser Erkrankten analog zu den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen nicht in der Lage ist, Chlorid-Ionen zu absorbieren, wodurch eine erhöhte extrazelluläre Chlorid-Konzentration bedingt ist. Durch das erhöhte Vorkommen von Chlorid im Extrazellulärraum befinden sich ebenfalls vermehrt Natrium-Ionen extrazellulär [107, 124].

Gegen diese Hypothese sprechen jedoch mehrere von verschiedenen Forschungsgruppen gewonnenen Erkenntnisse. So läßt sich zum Beispiel der diagnostisch und therapeutisch genutzte Natriumkanal-blockierende-Effekt von Amilorid an diesem Modell nicht erklären. Weiterhin ist die Aktivierung des Chlortransportes durch Beta-Mimetika oder durch

chloridfreie Lösung, welche mittels PD-Messung dargestellt werden konnte, nicht mit dieser Hypothese in Einklang zu bringen [75, 76, 63].

4.3.2 Pharmakologische und diagnostische Ansätze

Amilorid ist ein für die klinische Anwendung beim Menschen zugelassener Natrium-Kanal-Blocker. In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen die klinische Wirksamkeit und den diagnostischen Wert von Amilorid nachweisen [76, 87, 121, 3, 114, 11]. Andere Diuretika wie Bumetanid und Furosemid zeigten keinen meßbaren Effekt [125].

Das grundsätzliche Ziel bei der inhalativen Anwendung von Amilorid in der Therapie der Mukoviszidose ist die Reduzierung der gesteigerten Natriumabsorption des respiratorischen Epithels. Durch eine Natrium-Kanal-Blockade mit Amilorid kommt es passager zu einer Vermehrung von Ionen und damit auch von Flüssigkeit auf der luminalen Seite [35, 154, 102, 24, 25]. Die Expektoratation von pulmonalem Sekret wird verbessert, dadurch wird einer Kolonisation von Keimen vorgebeugt [8, 134, 84]. In der Inhalationstherapie wird Amilorid zur Sekretolyse zumeist in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ M eingesetzt. Die klinische Wirksamkeit einer langfristigen Anwendung ist umstritten und möglicherweise von der Wirkdauer abhängig [81, 112, 52, 104, 93, 63].

Fenoterol ist ebenfalls in der Inhalationstherapie seit längerem bekannt und wird in der antiobstruktiven Therapie eingesetzt. Das Medikament gehört zur Gruppe der β_2 -Adrenozeptor-Agonisten und gilt neben Glukokortikoiden als Mittel der 1. Wahl bei allen Formen der obstruktiven Atemwegserkrankungen, die mit Bronchospasmen einhergehen. Die Hauptwirkung besteht in der Senkung des Atemwegswiderstandes durch die Erschlaffung der glatten Bronchialmuskulatur. Ursache ist die Erhöhung der intrazellulären c-AMP-Konzentration, die eine Öffnung von unterschiedlichen Ionenkanälen und die Verschiebung von Ionen bewirkt.

Neben diversen anderen Ionenverschiebungen wurde bei Nicht-CF-Probanden über die Aktivierung der Adenylatzyklase durch das c-AMP eine verstärkte Chlorid-Sekretion beobachtet. Im Unterschied dazu konnte eine Öffnung der CFTR-abhängigen Chlorid-Kanäle mit dieser Medikamentengruppe bei Mukoviszidose-Patienten nicht nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Tatsache kann man bei dem größten Teil der CF-Patienten keine Veränderung der PD-Werte nach Applikation von β -Sympathomimetika erwarten. Bei bekannter CF läßt sich somit lediglich der Anteil funktionierender Chlorid-Kanäle abschätzen, der je nach CFTR-Mutation sehr unterschiedlich sein kann [147].

Klassische Substanz zur Testung der c-AMP gesteuerten Chloridkanäle ist das *Isoproterenol* [80], das in Deutschland nicht mehr für die Anwendung am Menschen zugelassen ist. Die Wirkung verschiedener anderer Betaadrenergika (z.B. Terbutalin und Salmeterol) auf die Epithelzellen von CF-Patienten wurde von unterschiedlichen Autoren beschrieben [97, 65].

Salmeterol ein neuer inhalativer, langwirksamer β_2 -Agonist besitzt eine Struktur, die derjenigen von Fenoterol ähnlich ist. Vermutlich durch die chemische Anlagerung eines Formamid-Anteils besitzt Salmeterol eine deutlich höhere Affinität gegenüber den β_2 -Adrenozeptoren im Vergleich zu Fenoterol oder auch anderen β_2 -Sympathomimetika [7, 99]. Die Wirkungsdauer von inhalativ verabreichtem Salmeterol liegt bei über 12 Stunden [26]. Salmeterol ist somit künftig sowohl für die Therapie, als auch für die Diagnostik der Mukoviszidose von großem Interesse [65]. Für die i.v.-Therapie (und gegebenenfalls Superfusion) ist es in Deutschland allerdings noch nicht zugelassen.

Die vorausgehenden Überlegungen führten zur Schlußfolgerung, daß sich aufgrund der guten Verfügbarkeit Fenoterol für die Abgrenzung von Gesunden gegenüber CF-Patienten eignen würde. Auch die systemische Anwendung dieses Medikamentes ist zulässig, so daß es ebenfalls für die Superfusion einsetzbar wäre.

4.3.3 Ausgangspunkt: Eigene Sollwert- und Grenzwertbereiche; Erklärung und Ursachen für Grenzbefunde

Im Rahmen der CF-Diagnostik werden häufig PD-Werte zwischen -30 mV und -45 mV gemessen. Der in Abschnitt 3.2.1. aufgezeigte Überlappungsbereich zwischen den initial bestimmten PD-Werten von Mukoviszidose-Patienten und Gesunden war bei allen bisherigen Untersuchungen ein großer Unsicherheitsfaktor. Die Überschneidung resultiert daraus, daß CF-Patienten relativ niedrige PD-Werte bzw. ein Gesunder relativ hohe PD-Werte aufweisen kann.

Die verschiedenen Ursachen für die niedrige Werte bei CF-Patienten wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben:

Sowohl chronische Epithelläsionen, bei Polyposis nasi und anderen Epithelmetaplasien, nach Abrasio des Nasenepithels, als auch akute Infektionen der oberen Atemwege oder einer allergischen Rhinitis mit verstärkter seröser Schleimsekretion können zu niedrigen PD-Werten der Mukoviszidose-Patienten führen [121, 135, 3]. Eine vermehrte Durchlässigkeit der Zellverbindungen, die zu einer Permeabilitätsänderungen bei Entzündungen führt, und bestimmte Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine werden für diese Phänomene verantwortlich gemacht [144, 9].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, die Auswirkungen der Kombination von inhalativ appliziertem Amilorid und Fenoterol auf die PD zu untersuchen mit der Vorstellung, durch diese medikamentös induzierte Ionenverschiebung, Patienten, deren PD-Werte sich in einem Überlappungsbereich zwischen „gesund“ und „pathologisch“ befinden, besser zuordnen zu können. Die Wirkung der beiden einzelnen Substanzen Amilorid und Fenoterol auf die nasale transepitheliale Potentialdifferenz war von mehreren Arbeitsgruppen mit der aufwendigen „Superfusionsmethode“ bereits untersucht worden [51, 81, 126, 123, 84]

Die inhalative Applikation erschien als vielversprechende Vereinfachung der bisherigen Methodik [38]. Mit der Applikation der Medikamente durch Aerosolinhalation und der periodischen Messung der PD-Werte ergab sich eine einfache Alternative für die Bestimmung der medikamentösen Einflüsse auf die PD. Die Belastung der Probanden,

auch im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen, konnte dadurch auf ein Minimum reduziert werden.

An den Untersuchungen der Wirkung von Amilorid und Fenoterol nahmen 33 Mukoviszidose-Patienten und 38 gesunde Probanden im Alter von 9-34 Jahren teil. Der relativ hohe Altersdurchschnitt der Gruppen erklärt sich daraus, daß wegen der Verwendung der subkutanen Referenzelektrode auf die Einbeziehung von jüngeren Kindern verzichtet wurde. Auch die nasale inhalative Medikamentenapplikation setzt eine gewisse Reife der Probanden voraus. Daher wurde als Ausschlußkriterium für diese Studie ein Mindestalter von 6 Jahren festgelegt. Daß die Potentialdifferenz vom Patientenalter weitgehend unabhängig ist, wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben [51, 55, 122].

4.3.4 Einfluß von Amilorid und Fenoterol auf die PD-Ausgangswerte

Am Anfang der Untersuchung stand die Bestimmung der PD-Ausgangswerte jedes Patienten. Im Vergleich zu anderen und auch zu eigenen Untersuchungsergebnissen fielen die Basiswerte der für diese Studie rekrutierten CF-Patienten relativ niedrig aus [75, 2, 59, 155]. Zu erwarten waren durchschnittliche PD-Werte von -45 mV bis -60 mV [75, 135, 3, 59]. Aber auch andere Forschungsgruppen haben schon über niedrigere Basiswerte für CF-Patienten bei der Potentialdifferenzbestimmung berichtet [55, 37]. Eine Ursache für die in dieser Studie relativ niedrigen Werte ließ sich nicht finden.

Die nasale Applikation der Inhalationslösungen wurde von allen Probanden gut akzeptiert und führte in der vorliegenden Studie zu keinerlei klinisch feststellbaren unerwünschten Nebenwirkungen.

Die ermittelten Ergebnisse nach der *Amiloridinhalation* lagen sowohl für die CF-Gruppe als auch für die Gesunden in dem zu erwartenden Bereich.

Die pathologischen PD-Werte der Mukoviszidose-Patienten sanken nach Amiloridinhalation auf die Werte von Gesunden (vgl. Kap.3.2.1).

Nach Inhalation der *Fenoterollösung* kam es bei den gesunden Teilnehmern zu einem Wiederanstieg der zuvor abgefallenen PD-Werte. Es zeigten sich individuelle Schwankungen in der PD-Antwort der Gesunden, dennoch war der Unterschied zu der Reaktion der Mukoviszidose-Patienten deutlich. Die PD-Werte der CF-Patienten fielen sogar im Durchschnitt um weitere 2,3 % ab. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ableiten, daß der PD-senkende Effekt durch Amilorid nicht bei allen Patienten beendet war. Ferner geht aus diesen Befunden hervor, daß Fenoterol erwartungsgemäß bei den meisten CF-Patienten *in vivo* keinen Einfluß auf die Potentialdifferenz hatte. Der Unterschied zur PD-Antwort Gesunder nach Fenoterol im Vergleich zu CF-Patienten ist statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Die fehlende Reaktion der Mukoviszidose-Patienten nach Applikation von Fenoterol läßt sich nach heutiger Auffassung auf eine Störung der Synthese, des Abbaus oder des Transports der CFTR-Proteine in der Epithelzelle bzw. des Einbaus in die Zellmembran zurückführen [147]. Der CFTR-abhängige Chloridkanal wird durch Fenoterol nicht oder nur sehr unzureichend geöffnet, was den Wiederanstieg der PD-Werte bei CF-Patienten verhindert. Im Gegensatz dazu steigert Fenoterol bei gesunden Probanden die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle eindrucksvoll (vgl. Abb. 1 und Kap. 1.2).

Allerdings fällt der in der eigenen Untersuchung aufgezeigte Unterschied im Verhalten der PD zwischen Gesunden und CF-Patienten nach Fenoterol-Inhalation gering aus. Es ist daher zweifelhaft, ob diese Methode diagnostisch wirklich genutzt werden kann. Überzeugendere Ergebnisse liegen von Arbeitsgruppen vor, die sich der Superfusion bedient haben [75, 78, 51, 121]: Für die Untersuchungen von pharmakologischen Einflüssen auf die Nasenschleimhaut wird dieses Verfahren verwendet, bei dem doppelumige Katheter es ermöglichen, Medikamente in einer bestimmtem Konzentration lokal nasal zu applizieren und in gleicher Position die Potentialdifferenz zu bestimmen. Diese Methode eignet sich allerdings nur schlecht für lang andauernde Verlaufsbeobachtungen.

Eine zusätzliche Möglichkeit der Differenzierung zwischen „krank“ und „gesund“, bietet die Anwendung von Natriumglukonat, das auch die Ca^{2+} -abhängigen („alternativen“) Chlorid-Kanäle aktiviert (vgl. Abb. 1 und Kap. 1.2.). Erste Untersuchungen mittels Inhalationstechnik ergaben jedoch ebenfalls unbefriedigende Resultate, so daß auch hier die Superfusionstechnik die Methode der Wahl sein dürfte [24, 25].

4.4 Pilotstudie über die Wirksamkeit von Benzamil im Vergleich zu Amilorid

Klinische Untersuchungen mit inhalativ applizierter 10^{-3} und $5 \cdot 10^{-3}$ molarer Amilorid-Lösung bei CF-Patienten mit Lungensymptomatik haben eine kurzfristige Wirkdauer hinsichtlich des Anstiegs der PD, der Verflüssigung des Sputums und der mukziliärer Clearance aufzeigen können [87, 8, 102, 24, 25, 59, 88]. Langfristige positive Effekte und klinische Auswirkungen der Therapie sind bisher nur schwer nachweisbar [81, 52].

Ein Grund für die wenig überzeugenden Langzeiterfolge von Amilorid könnte vor allem die kurze Wirkdauer des Medikaments sein (vgl. Kap. 3.3). Die Halbwertszeit von inhaliertem C^{14} -Amilorid auf der Oberfläche von respiratorischem Epithel wurde untersucht und mit $t_{1/2} \approx 35-40$ Minuten angegeben [83]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Halbwertszeit von Amilorid zeigen Übereinstimmungen mit den Resultaten anderer Untersuchungsgruppen [51, 59].

Für die nachhaltige Blockade der Natrium-Kanäle und der damit verbundenen Verbesserung der klinischen Symptomatik gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen bieten sich häufigere Anwendungen einer Inhalationstherapie mit Amilorid an, zum anderen wäre die Anwendung von Substanzen mit höherer Affinität zu den epithelialen Natrium-Kanälen anzustreben. Für die erste Möglichkeit ist keine ausreichende Akzeptanz der Patienten zu erwarten.

Im Vergleich zu Amilorid gehört Benzamil zu den Substanzen mit einer vielfach höheren Affinität gegenüber den epithelialen Natrium-Kanälen [17].

Benzamil unterscheidet sich von Amilorid ausschließlich durch den Austausch einer Hydrogenruppe durch eine Benzylgruppe. Biochemisch reagiert das Medikament dadurch stärker lipophil als Amilorid, was eine Erklärung für die größere Affinität sein könnte [34].

Mittels der nasalen transepithelialen Potentialdifferenzmessung war es möglich, die Auswirkungen der verabreichten Medikamente auf die Ionenströme darzustellen und die Wirkungsdauer der beiden Substanzen miteinander zu vergleichen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse der *in vivo*-Vergleichsuntersuchung zwischen Amilorid und Benzamil werden durch die früheren *in vitro*-Studien untermauert.

So zeigt das Ausmaß der Natrium-Kanal-Blockade und die daraus resultierende PD-Absenkung *in vivo* deutliche Übereinstimmungen zwischen dem *in vitro* gemessenen Kurzschlußstrom (I_{sc}) und der Potentialdifferenz (PD) [142, 14, 64].

Die PD-Messung ist somit ein geeignetes Verfahren für die Bewertung der Modulation des Natriumionentransportes.

Untersuchungen im Tierphysiologischen Institut der Universität Giessen mit Amilorid und 3 Analoga (Benzamil, Phenamil und EIPA) zur Feststellung der Affinität zu den Natrium-Kanälen des respiratorischen Epithels von CF-Patienten erbrachten unter anderem folgende, für die vorliegende Arbeit wichtige Ergebnisse [17]. Benzamil besitzt mit Abstand die höchste Affinität gegenüber den andern Testsubstanzen. So konnte eine bis zu 1000-fach höhere Affinität von Benzamil gegenüber Amilorid am CF-Epithel nachgewiesen werden, und auch die anderen oben genannten Substanzen zeigten ein höheres Bestreben, an den Natrium-Kanal zu binden als Amilorid [127, 16].

Die *in vitro* festgestellte Reversibilität der beiden Medikamente konnte in der vorliegenden Arbeit *in vivo* ebenfalls nachgewiesen werden [64]. Die reversible Blockade des Natrium-Kanals *in vitro* wurde durch die Entfernung der Substanz aus dem jeweiligen Zellpräparat und der daraus resultierenden Normalisierung des Kurzschlußstromes belegt [127, 15]. Vergleichbar mit der *in vitro* festgestellten verlängerten Blockierung des Natrium-Kanals zeigt Benzamil auch *in vivo* eine längeren Wirkungsdauer [1].

Frühere Studien mit der Superfusionstechnik zeigten, daß nach Amiloridinhalation bei CF-Patienten *in vivo* die maximale Absenkung der Ausgangs-PD ($\Delta PD\%$) bei 70-80 % liegt [75]. Die drei in der vorliegenden Untersuchung verabreichten Amiloridlösungen bewirkten

ebenfalls eine PD-Absenkung in dieser Größenordnung (vgl. Abb. 17). Dies zeigt, daß durch die angewandte inhalative Medikamentenapplikation eine ausreichend große Wirkstoffkonzentration am respiratorischen Epithel erreicht werden kann.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß die Konzentrationen inhalierter Medikamente auf der Oberfläche des nasalen bzw. bronchialen Epithels einer 10 bis 100-fachen Verdünnung ausgesetzt sind. Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse, insbesondere im Vergleich mit derjenigen der Superfusionstechnik, ist dies zu berücksichtigen [83].

Unklar ist bisher noch, welche Ionenströme *in vivo* beim CF-Patienten für die bleibende Diskrepanz zu Null, d.h. für die restlichen 20-30 % der PD verantwortlich sind.

Zusammengefaßt läßt sich somit folgern, daß sowohl die verwendeten Amiloridlösungen, als auch die Benzamilösungen eine maximale initiale PD-Senkung der Basiswerte bis auf das Niveau von Gesunden hervorrufen können.

Wie auch bei dem Natrium-Kanal-Blocker Amilorid läßt die Wirkung von Benzamil nach einer gewissen Zeit nach. Jedoch ist die Dauer bis zum Wiedererreichen der Ausgangswerte weitaus länger als bei Amilorid (s. Tab. 10).

Die Reversibilität der Wirkung läßt darauf schließen, daß die Benzamilwirkung durch die Beeinflussung des Na^+ - K^+ -Kanals zustande kommt und nicht durch eine Schädigung des respiratorischen Epithels. Es ist anzunehmen, daß die höhere Affinität des Medikaments zu den apikalen Natrium-Kanälen für die längere Wirkdauer verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie über die Natrium-blockierende Wirkung von Benzamil auf das respiratorische Epithel von Mukoviszidose-Patienten *in vivo*. Die gezielte und spezifische Wirkung von Benzamil im Hinblick auf die Natrium-Kanal-Blockade könnten im Vergleich zu Amilorid zu einer Verbesserung der klinischen Symptome von Mukoviszidose-Patienten führen. Vor allem aber ließe sich die Inhalationsfrequenz des einzelnen CF-Patienten reduzieren und somit eine bessere Lebensqualität erreichen.

Es ist jedoch festzuhalten, daß noch nicht genügend Untersuchungen über die Wirkungsweise von Benzamil existieren. Insbesondere fehlen noch die erforderlichen Tierversuche zur toxikologischen Prüfung [50]. Systematische Untersuchungen über klinische Wirkungen und Nebenwirkungen müssen folgen, bevor eine Zulassung für den therapeutischen Einsatz am Menschen und eine endgültige Einschätzung des klinischen Nutzens in der Mukoviszidose-therapie möglich ist.

Angesichts dieser Ergebnisse und dem Bedarf an effektiveren Medikamenten für CF-Patienten sollten in jedem Fall weitere Studien mit Benzamil als Therapeutikum durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

1. Die Bestimmung der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz (PD) wird seit mehreren Jahren von einigen CF-Zentren zur Diagnosestellung der Mukoviszidose (CF) eingesetzt. Eine häufigere Nutzung der PD-Messung scheiterte bisher an den aufwendigen und wartungsintensiven Meßvorrichtungen. Mit der Entwicklung des vereinfachten PD-Meßgerätes „Tholy“ sollte der Weg in eine breite klinische Anwendung ermöglicht werden. Nach einiger Zeit zeigten sich jedoch bei dem nach *Hofmann* entwickelten Meßgerät unterschiedliche Störpotentiale, deren Ursprung vermutlich die bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Elektrodenpaare waren.

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, stabile Elektroden für das Meßgerät „Tholy“ zu entwickeln, deren Meßergebnisse reproduzierbar und mit denen der konventionellen Meßmethode vergleichbar waren. Zu diesem Zweck wurde das bisherige Herstellungsverfahren der Elektroden überprüft und modifiziert. Die Isolierung der Meßelektrode mit einem Silikonschlauch, inklusive Keramikdiaphragma, und die Unterbringung der Referenzelektrode in einem Kunststoffbehälter brachte hinsichtlich der Konstanz der Meßwerte die gewünschten Ergebnisse. Seither weisen die Elektroden vor und nach der jeweiligen PD-Messung einen Kurzschlußstrom von weniger als ± 1 mV auf. Zur Testung der neuen Elektroden im klinischen Alltag wurde eine Meßreihe mit 30 CF-Patienten durchgeführt. Die PD-Werte jedes einzelnen CF-Patienten wurden sowohl mit dem konventionellen PD-Meßgerät, als auch mit dem „Tholy“ Gerät bestimmt, wobei die Reihenfolge der Meßgeräte zuvor durch Randomisierung festgelegt worden war.

Die Untersuchungsergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Einsatz des „Tholy“-Gerätes mit den in dieser Arbeit vorgestellten Meß- und Referenzelektroden ebenso zuverlässige und konstante PD-Werte liefert wie das konventionelle Meßverfahren ($r = 0,92$; $p < 0,001$).

2. Die bei der nasalen transepithelialen PD-Messung gemessene Spannung ist die Summe vieler verschiedener Ionenströme. Bei der Mukoviszidose kommt es auf Grund des genetisch determinierten Defektes zur Störung der zum Lumen hin gerichteten Chloridsekretion des respiratorischen Epithels. Die sich daraus ergebende gesteigerte Natrium-Resorption in die Zelle führt zu einem Verlust an positiven Valenzen auf der Zelloberfläche, welcher die erhöhten PD-Werte von CF-Patienten erklärt. Verschiedene Substanzen, die größtenteils auch Bestandteil der medikamentösen Therapie der Erkrankung sind, beeinflussen direkt bzw. indirekt die verschiedenen Ionenströme und auf diesem Wege die Potentialdifferenz.

Daher beschäftigte sich ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit mit der Fragestellung der Wirksamkeit verschiedener Medikamente und Medikamentenkombinationen auf die nasale transepitheliale Potentialdifferenz bei Mukoviszidose-Patienten.

Insbesondere wurden die Auswirkungen der Kombination von 0,3 mg / ml Amilorid einem Natrium-Kanal-Blocker und 0,25 mg / ml Fenoterol einem β_2 -Mimetikum untersucht, um eine Differenzierung von Patienten, deren PD-Werte sich in einem Grenzbereich zwischen „gesund“ und „pathologisch“ befinden, zu erreichen.

An dieser Untersuchung, bei der die einzelnen Medikamente über ein Inhaliergerät appliziert wurden, nahmen 33 Mukoviszidose-Patienten und 38 gesunde Probanden teil. Jeder Teilnehmer inhalierte nach Bestimmung der Basiswerte zuerst 2 ml der Amiloridlösung. Nach erneuter PD-Messung schloß sich die Inhalation von 2 ml der Fenoterollösung und eine nochmalige Bestimmung der Potentialdifferenz an.

Beide Untersuchungskollektive zeigten nach Applikation von Amilorid einen starken Abfall der PD-Werte, wobei die durchschnittlichen PD-Werte der CF-Gruppe in den Bereich von gesunden Probanden abfielen. Nach Inhalation von Fenoterol kam es zu unterschiedlichen Reaktionen der beiden Gruppen. Während die PD-Werte der Mukoviszidose-Patienten als Folge der Blockade der dominierenden c-AMP (CFTR) abhängigen Chloridkanäle sich kaum veränderten ($\Delta PD = -2,3 \%$), kam es zu einem Wiederanstieg der Werte bei den Gesunden bis in den Bereich der Ausgangswerte ($\Delta PD = + 41,0 \%$).

Die Ergebnisse bestätigen die Erfahrung der Physiologen, daß es mit Hilfe pharmakologischer Tests im Rahmen der Messung der nasalen transepithelialen Potentialdifferenz möglich ist, die CF-Diagnostik zu optimieren.

3. Die letzte Fragestellung befaßte sich mit der Wirksamkeit und Wirkdauer zweier inhalativ verabreichter Natrium-Kanal-Blocker (Amilorid und Benzamil) bei Mukoviszidose-Patienten.

An dieser Pilotstudie nahmen 41 Mukoviszidose-Patienten teil, welche in 2 Gruppen unterteilt wurden. Die Patienten der ersten Gruppe, untergliedert in 4 Kollektive, inhalierten 4 verschiedene Konzentrationen einer Amiloridlösung; die Patienten der zweiten Gruppe, untergliedert in 2 Kollektive, inhalierten 2 unterschiedlich konzentrierte Benzamillösungen. Anhand der initialen PD-Senkung nach nasaler Applikation des jeweiligen Medikamentes ($\Delta PD\%$) und des Zeitpunktes, an dem die PD-Werte 50 % der Ausgangswerte wieder erreichten (WZ50), wurde die Wirksamkeit und die Wirkdauer der beiden Substanzen bestimmt.

Die Amiloridlösungen bewirkten einen durchschnittlichen Abfall der PD-Werte ($\Delta PD\%$) von 64,2 % bis 81,3 %, die Benzamillösungen ein Absinken von 74,9 % und 76,2 %. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der $\Delta PD\%$ der einzelnen Kollektive festgestellt werden. Dies läßt darauf schließen, daß die verwendeten Lösungen zu einer maximalen Blockade der Natrium-Kanäle führen.

Größere Unterschiede gab es bei der WZ50. So erreichten die PD-Werte der Gruppe mit der am höchsten konzentrierten Amiloridlösung den 50 %-Bereich der Basiswerte nach $2,2 \pm 0,12$ Stunden und die Gruppe mit der höher konzentrierten Benzamillösung nach $4,5 \pm 0,6$ Stunden. Dabei korrelierten die WZ50-Werte der 4 verschiedenen Amiloridlösungen eng miteinander ($r = 0,99$; $p < 0,001$). Nach Benzamilinhalation wurde eine etwa doppelt so große WZ50 wie nach Inhalation der äquivalenten Amiloridlösungen festgestellt.

Benzamil hat demnach eine durchschnittlich 2 mal längere Wirkdauer als Amilorid. Dies könnte die Inhalationsfrequenz des einzelnen CF-Patienten reduzieren und zu einer Verbesserung der klinischen Symptome führen, sofern Benzamil für die Anwendung am Menschen zugelassen wird.

Es läßt sich folgendes Fazit ziehen:

Die vorliegenden Ergebnisse sind ein Beitrag zur Optimierung der CF-Diagnostik und bahnen den Weg für einen neuen Therapieansatz mit Benzamil.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **ACEVEDO, M., OLVER, R.E., WARD, M.R.:**
Effect of Benzamil on sheep tracheal epithelium.
Experim. Physiol. 76: 935-941 (1991)
- [2] **ALTON, E.W.F.W., HAY, J.G., GEDDES, D.M.:**
Measurement of nasal potential difference in adult cystic fibrosis,
Young`s syndrome, and bronchiectasis.
Thorax 42: 815-817 (1987)
- [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., FREEMANN, M.:**
Sweat test results in normal persons of different ages compared with families
with fibrocystic disease of the pancreas.
Arch. Dis Child. 35: 581 (1960)
- [5] **ANDERSON, M.P., RICH, D.P., GREGORY, R.J., SMITH, A.E., WELSH, M.J.:**
Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR
Science 251: 679-682 (1991)
- [6] **ANDERSON, M.P., WELSH, M.J.:**
Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical
membrane of normal and cystic fibrosis epithelia.
Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 6003-6007 (1991)
- [7] **ANDERSON, W.H.:**
Pharmacokinetics of Amiloride by inhalation in adults, adolescents, and
children
19th Cystic Fibrosis Conference, Madrid, Spain, May 21-26th (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.
Dissertation der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (1990)
- [10] **BENEDETTO, G.D., LOPEZ-VIDRIERO, M.T., CARRATU, L., CLARKE, S.W.:**
Effect of Amiloride on human bronchial ciliary activity in vitro.
Respiration 57: 37-39 (1990)
- [11] **BENNETT, W.D., OLIVIER, K.N., ZEMAN, K.L., HOHNEKER, K.W., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:**
Effect of Uridine 5'-triphosphate plus Amiloride on mucociliary clearance in adult cystic fibrosis.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: 1796-1801 (1996)
- [12] **BIJAM, J., FRÖMTER, E.:**
Direct demonstration of high transepithelial chloride conductance in normal human sweat duct which is absent in cystic fibrosis.
Pflügers Arch. 407: 123-127 (1986)
- [13] **BIJMAN, J., QUINTON, P.:**
Permeability properties of cell membranes and tight junctions of normal and cystic fibrosis sweat ducts.
Pflügers Arch. 408: 505-510 (1987)
- [14] **BLANK, U., CLAUSS, W., WEBER, W.-M.:**
Effects of Benzamil in human cystic fibrosis airway epithelium.
Cell Physiol. Biochem. 5: 385-390 (1995)
- [15] **BLANK, U.:**
Regulation des Ionentransports im menschlichen respiratorischen Epithel.
Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen (1996)
- [16] **BLANK, U., GLANZ, H., EISTERT, B., FRYEN, A., LINDEMANN, H., HÜLS, G., CLAUSS, W., WEBER, W.-M.:**
Benzamil und Mukoviszidose.
HNO 44: 172-177 (1996)
- [17] **BLANK U., RÜCKES, C., CLAUSS, W., HOFMANN, T., LINDEMANN, H., MÜNKER, G., WEBER, W.M.:**
Cystic fibrosis and non-cystic-fibrosis human nasal epithelium show analogous Na⁺ absorption and reversible block by phenamil
Eur. J. Physiol. 434: 19-24 (1997)

- [18] **BOENNINGHAUS, H.G.:**
Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 9. Aufl.: S. 169 (1986)
- [19] **BOUCHER, R.C., BROMBERG, P.A., GATZY, J.T.:**
Airway transepithelial electric potential in vivo:
species and regional differences.
J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 48: 169-176 (1980)
- [20] **BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R., STUTTS, M.J., GATZY, J.T.:**
Epithelial dysfunktion in cystic fibrosis lung disease.
Lung 161: 1-17 (1983)
- [21] **BOUCHER, R.C., STUTTS, M.J., KNOWLES, M.R., CANTLEY, L., GATZY, J.T.:**
Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia.
J. Clin. Invest. 78: 1245-1252 (1986)
- [22] **BOUCHER, R.C., COTTON, C.U., GATZY, 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)
- [23] **BOUCHER, R.C., CHENG, E.H., PARADISO, A.M., STUTTS, M.J., KNOWLES, M.R., EARP, H.S.:**
Chloride secretory response of cystic fibrosis human airway epithelia; preservation of calcium but not protein kinase C- and A-dependent mechanisms.
J. Clin. Invest. 84: 1424-1431 (1989)
- [24] **BOUCHER, R.C.:**
Human airway ion transport. Part one.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150: 271-281 (1994)
- [25] **BOUCHER, R.C.:**
Human airway ion transport. Part two.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150: 581-593 (1994)
- [26] **BOULET, L.P.:**
Long- versus short-acting beta 2-agonists.
Drugs 47: 207-222 (1994)

- [27] **BOWLER, I.M., KELMAN, B., WORTHINGTON, D., LITTLEWOOD, J.M., WATSON, A., CONWAY, S.P., SMYE, S.W., JAMES, S.L., SHELDON, T.A.:**
Nebulized amiloride in respiratory exacerbations of cystic fibrosis: a randomised controlled trial.
Arch. Dis. Child. 73: 427-430 (1995)
- [28] **BÜHLER, H., BAUMANN, R.:**
pH-Messung: Grundlagen und Probleme.
Selbstverlag Ingold AG (1982)
- [29] **BÜHLER, H., BAUMANN, R.:**
Redoxmessung: Grundlagen und Probleme.
Selbstverlag Ingold AG (1982)
- [30] **CHERNICK, W.S., BARBERO, G.J.:**
Composition of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas and bronchiectasis.
Pediatrics 24: 739-745 (1959)
- [31] **COGSWELL, J.J., REIDON, R.A., TAYLOR, B.:**
Supportive lung disease in sisters mimicking cystic fibrosis.
Arch. Dis. Child. 49: 520 (1974)
- [32] **COHN, R.C., RUDZIENSKI, L., PUTNAM, R.W.:**
In vitro antimicrobial activity of Amiloride analogs against Pseudomonas.
Chemotherapy 38: 232-237 (1992)
- [33] **COTTON, C.U., STUTTS, M.J., KNOWLES, M. R.:**
Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis nasal epithelium.
Clin. Res. 33: 463 A (1985)
- [34] **CRAGOE, E.J. Jr., KLEYMAN, T.R., SIMCHOWITZ, L.:**
Amiloride and its analogs unique cation transport inhibitors.
VCV Publishers Inc. 4, New York (1992)
- [35] **CURTIS, L.N., MISCH, D.W.:**
Regulation of mucociliary transport.
Am. Rev. Respir. Dis. 129: 816-822 (1984)
- [36] **CUTTING, G.R.:**
CLC-2 channels and CF.
Pediatr. Pulmonology 17: 123-124 (1998)

- [37] **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)
- [38] **DIRNAGL, K.:**
Aerosole in der Medizin. Wirkungsweise und Methodik der Aerosoltherapie.
Prax. Pneumol. 36: 365-375 (1982)
- [39] **DI SANT` AGNESE, P.A., DARLING, R.C., PERERA, G.A., SHEA, E.:**
Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas.
Clinical significance and relationship to the disease.
Pediatrics 12: 549-563 (1953)
- [40] **DI SANT` AGNESE, P.:**
Cystic fibrosis (mukoviscidosis)
Am. Fam. Physician 7: 102-111 (1973)
- [41] **DOCKTER, G., LINDEMANN, H., TÜMMLER, B., WUNDERLICH, P., DITTRICH-WEBER, H.:**
Mukoviszidose
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart; 2.Aufl. (1997)
- [42] **DÖRFFEL, P.:**
Fibel zur ionenselektiven Meßtechnik.
Selbstverlag der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten (WTW) (1988)
- [43] **DUPERREX, O., BERCLAZ, P.Y., BERTRAND, D., LACROIX, J.S., POCHON, N., BELLI, D., ROCHAT, T.:**
A new device for in vivo measurement of nasal transepithelial potential difference in cystic fibrosis patients and normal subjects.
Eur. Respir. J. 10: 1631-1636 (1997)
- [44] **FABER, S.:**
Pancreatic function and disease in early life.
Arch. Path. 37: 238-250 (1944)
- [45] **FRIZZEL, R.A., RECHKEMMER, G., SHOEMAKER, R.I.:**
Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis.
Science 233: 558-560 (1986)

- [46] **FRÖMTER, E.:**
Die Ionentransportstörung bei der Mukoviszidose. Aktueller Wissensstand.
Pneumologie 44: 1144-1146 (1990)
- [47] **GALSTER, H.:**
pH-Messung: Grundlagen, Methoden, Anwendungen, Geräte.
VCH-Verlag, Weinheim (1990)
- [48] **GEDDES, L.A.:**
Electrodes and the measurement of bioelectric events.
Wiley Intersciences, New York, p. 10-32 (1972)
- [49] **GIBSON, L.E., COOKE, R.E.:**
A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the
pancreas utilizing pilocarpine by electrophoresis.
Pediatrics 23: 545-549 (1959)
- [50] **GOMEZ-SANCHEZ, E.P., GOMEZ-SANCHEZ, C.E.:**
Effect of central infusion of benzamil on Dahl S rat hypertension.
Am. J. Physiol. 269: H1044-H1047 (1995)
- [51] **GOWEN, C.W., LAWSON, E.E., GINGRAS-Leatherman, J., GATZY, J.T.,
BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:**
Increased nasal potential difference and Amiloride sensitivity in neonates with
cystic fibrosis.
J. Pediatr. 108: 517-521 (1986)
- [52] **GRAHAM, A., HASANI, A., ALTON, E.W.F.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)
- [53] **HAMANN, C.H., VIELSTICH, W.:**
Elektrochemie I; Elektrolytische Leitfähigkeit, Potentiale, Phasengrenzen.
VCH-Verlag, Weinheim (1985)
- [54] **HARRIS, A.:**
Cystic fibrosis gene.
Brit. Med. Bullet. 48: 738-753 (1992)
- [55] **HAY, J. G., GEDDES, D.M.:**
Transepithelial potential difference in cystic fibrosis.
Thorax 40: 493-496 (1985)

- [56] **HEPPT, W., TASMAN, A.-J., GOERTTLER, K.:**
 Diagnostische Zytologie der Nasenschleimhaut.
 Allergologie 16: 2-7 (1993)
- [57] **HIGHSMITH, W.E., BURCH, L.H., ZHOU, Z., OLSEN, J.C., BOAT, T.E., SPOCK, A., GORVOY, J.D., QUITTELL, L., FRIEDMAN, K.J., SILVERMAN, L.M., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:**
 A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentration.
 N. Engl. J. Med. 331: 974-980 (1994)
- [58] **HOFMANN, T., BÖHMER, O.:**
 Meßgerät zur Diagnose der Mukoviszidose.
 Patentanmeldung beim Europäischen Patentamt München (1993)
- [59] **HOFMANN, T.:**
 Kindgerechte Bestimmung der transepithelialen Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel der Nase.
 Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen (1994)
- [60] **HOFMANN, T., ZIERSCH, A., SENIER, I., BLANK, U., WEBER, W.M., BITTNER-DERSCH, P., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:**
 Cystic fibrosis respiratory epithelium: effects of topically applied Benzamil and Amiloride on nasal PD and inhibition of sodium absorption
 Eur. Respir. J. 9: 175 (1996)
- [61] **HOFMANN, T., ZIERSCH, A., SENIER, I., BLANK, U., WEBER, W.M., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:**
 Benzamil and amiloride in CF nasal epithelium: Time course of the effect on nasal potential difference in vivo.
 Pediatr. Pulmonol. 13: 280 (1996) [Abstract]
- [62] **HOFMANN, T., BÖHMER, O., HÜLS, G., TERBRACK, H.G., BITTNER, P., KLINGMÜLLER, 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)
- [63] **HOFMANN, T., SENIER, I., BITTNER, P., HÜLS, G., SCHWANDT, H.-J., LINDEMANN, H.:**
 Aerosolized Amiloride: Dose effect on nasal bioelectric properties, pharmacokinetics, and effect on sputum expectoration in patients with cystic fibrosis
 J. Aerosol Medicine 10: 147-158 (1997)

- [64] **HOFMANN, T., STUTTS, M.J., ZIERSCH, A., RÜCKES, C., WEBER, M., KNOWLES, M.R., LINDEMANN, H., BOUCHER, R.C.:**
Effects of topically delivered Benzamil and Amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 1844-1849 (1998)
- [65] **HOFMANN, T., GIPSON, J., NOONE, P.G., FOY, C.E., GIPSON, C., ROBINSON, J.M., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:**
Nasal epithelial CFTR-mediated chloride conductance in patients with mild as compared with severe CFTR mutations.
Pediatr. Pulmonol. 17: 186 (1998) [Abstract]
- [66] **HÜLS, G., HOFMANN, T, SENIER, I., LINDEMANN, H.:**
Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel: Stellenwert in Diagnostik und klinischer Forschung bei Mukoviszidose.
Atemw.-Lungenkrkh. 18: 258-259 (1994)
- [67] **HYAMS, D.E.:**
Amiloride: a review.
Royal society of medicine, International congress and symposium series
44: 65-73 (1981)
- [68] **JIANG, C., FINKBEINER, W.E., WIDDICOMBE, J.H., McCRAY P.B. Jr., MILLER, S.S.:**
Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis.
Science 262: 424-427 (1993)
- [69] **KEREM, B.S., ROMMENS, J.M., BUCHANAN, J.A., MARKIEWICZ, D., COX, T.K., CHAKRAVARTI, A., BUCHWALD, M., TSUI, L.C.:**
Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.
Science 245: 1073-1080 (1989)
- [70] **KEREM, E., COREY, M., KEREM, B.-S., ROMMENS, J., MARKIEWICZ, D., LEVISON, H., TSUI, L.-C., DURIE, P.:**
The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis - analysis of the most common mutation (ΔF_{508})
New Engl. J. Med. 323: 1517-1522 (1990)
- [71] **KERSTING, U., SCHWAB, A., HEBESTREIT, A.:**
Measurement of human nasal potential difference to teach the theory of transepithelial fluid transport
Am. J. Physiol. 275: 72-77 (1998)

- [72] **KHANDPUR, R.S.:**
Handbook of biomedical instrumentation
Tata McGraw Hill, New Delhi, p. 3-30 (1987)
- [73] **KLEYMAN, T.R., CRAGOE, E.J.:**
Amiloride and its analogs as tools in the study of the ion transport
J. Membrane Biol. 105: 1-21 (1988)
- [74] **KNOWLES, M.R., MURRAY, G.F., SHALLAL, J.A., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Bioelectric properties and ion transport in excised human bronchi.
Physiologist 23: 100 (1980)
- [75] **KNOWLES, M., CARSON, J.L., COLLIER, A.M., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Measurement of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo.
Am. Rev. Respir. Dis. 124: 484-490 (1981)
- [76] **KNOWLES, M., GATZY, J., BOUCHER, R.:**
Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis.
N. Engl. J. Med. 305: 1489-1495 (1981)
- [77] **KNOWLES, M., BUNTIN, W.H., BROMBERG, P., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Measurement of transepithelial electric potential difference in the trachea and bronchi of human subjects in vivo.
Am. Rev. Respir. Dis. 126: 108-112 (1982)
- [78] **KNOWLES, M., GATZY, J., BOUCHER, R.:**
Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium.
J. Clin. Invest. 71: 1410-1417 (1983)
- [79] **KNOWLES, M., STUTTS, M.J., SPOCK, A., FISCHER, N., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium.
Science 221: 1067-1069 (1983)
- [80] **KNOWLES, M., STUTTS, M.J., YANKASKAS, J.R., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis.
Clin. Chest Med. 7: 285-297 (1986)

- [81] **KNOWLES, M., CHURCH, N.L., WALTNER, W.E., YANKASKAS, J.R., GILLIGAN, P., KING, M., EDWARDS, L., HELMS, R.W., BOUCHER, R.:**
A Pilot study of aerosolized Amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis.
N. Engl. J. Med. 322: 1189-1194 (1990)
- [82] **KNOWLES, M., CLARKE, L., D.V.M., BOUCHER, R.C.:**
Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis.
N. Engl. J. Med. 325: 533-538 (1991)
- [83] **KNOWLES, M.R., CHURCH, N.L., WALTNER, W.E., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Amiloride in cystic fibrosis: safety, pharmacokinetics, and efficacy in the treatment of pulmonary disease.
In: Cargoe, E.J. Jr., Kleyman, T.R., Simchowicz, L.: Amiloride and its analogs: unique cation transport inhibitors. VCV Publishers, New York, p. 301-316 (1992)
- [84] **KNOWLES, M.R., OLIVIER, K., NOONE, P., BOUCHER, C.:**
Pharmacologic modulation of salt and water in the airway epithelium in cystic fibrosis.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151: 65-69 (1995)
- [85] **KNOWLES, M.R., ROBINSON, J.M., WOOD R.E.:**
Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared to normal and disease-control subjects.
J. Clin. Invest. 100: 2588-2595 (1997)
- [86] **KNOWLTON, R.G., COHEN-HAGUENAUER, 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)
- [87] **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)

- [88] **KRAHL, A., GEIDEL, C., ALTER, H., HOFMANN, T., BITTNER-DERSCH, P., HÜLS, G., PABST, J., LINDEMANN, H.:**
Effective Amiloride administration to CF-patients by powder inhalation.
Pediat. Pulmonol.17: 280 (1998) [Abstract]
- [89] **LASSEN, U.V., RASMISSEN, B.E.:**
Use of microelectrodes for measurement of membrane potentials.
In: Giebisch, G.: Membrane transport in biology, Berlin, S. 169-203 (1978)
- [90] **LINDEMANN, H., BECKER, T., BITTNER, P., BOLDT, A., HOFMANN, T., SCHWANDT, H.J.:**
Sekretelimination bei CF-Patienten unter Amiloridinalation
Pneumologie 44: 1148-1150 (1990)
- [91] **LINDEMANN, H.:**
Pulmonaler Verlauf der Mukoviszidose beim Kind.
Atemw.- Lungenkrkh. 19: 503-509 (1993)
- [92] **LINDEMANN, H., WUNDERLICH, P.:**
Atemwege und Lunge.
In: Dockter G., Lindemann, H., Wunderlich P., Dittrich-Weber, H.:
Mukoviszidose
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 21-48 (1994)
- [93] **LINDEMANN, H.:**
Amiloridinalation.
Pneumologie 50: 841-844 (1996)
- [94] **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: G1274-G1281 (1998)
- [95] **MENTZ, W.M., BROWN, J.B., FRIEDMAN, M., STUTTS, M.J., GATZY, J.T., BOUCHER, R.C.:**
Deposition, clearance, and effects of aerolized Amiloride in sheep airways.
Am. Rev. Respir. Dis. 134: 938-943 (1986)
- [96] **MIDDLETON, P.G., GEDDES, D.M., ALTON, E.W.F.W.:**
Effect of Amiloride and saline on nasal mucociliary clearance and potential difference in cystic fibrosis and normal subjects.
Thorax 48: 812-816 (1993)

- [97] **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)
- [98] **MYLETT, J., JOHNSON, L., KONWLES, M.:**
 Alternate therapies for cystic fibrosis.
 Sem. Respir. Crit. Care. Med. 15: 426-433 (1994)
- [99] **NISHIKAWA, M., NAK, J.C., BARNES, P.J.:**
 Effect of short- and long-acting beta 2-adrenoceptor on pulmonary beta 2-adrenoceptor expression in human lung.
 Eur. J. Pharmacol. 318: 123-129 (1996)
- [100] **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)
- [101] **OEHME, F.:**
 Ionenselektive Elektroden.
 Dr. A. Hüthig Verlag, Heidelberg (1986)
- [102] **OH, Y. S., BENOS, D.J.:**
 Amiloride-sensitive sodium channels.
 In: Cragoe E.J. Jr., Kleyman T.R., Simchowit, L.: Amiloride and ist analogs: unique cation transport inhibitors. VCH Publishers, New York, p. 41-56 (1992)
- [103] **OLIVIER, K.N., BENNETT, W.D., HOHNEKER, K.W., ZEMAN, K.L., EDWARDS, L.J., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:**
 Acute safety and effects on mucociliary clearance of aerolized uridine 5'-triphosphate amiloride in normal human adults.
 Am. J. Crit. Care Med. 154: 217-223 (1996)
- [104] **PONS, G., MARCHAND, M.C., FOUCARD, C., CHAUMET-RIFFAUD, P., D'ATHIS, PH., LENOIR, G., NAVARRO, J., SAUTEJEAU, A. and the Amiloride-AFLM collaborative study group:**
 French multicentre randomized double-blind placebo-controlled trial on nebulized Amiloride in cystic fibrosis patients.
 Pediatr. Pulmonol. 12: 193 (1995)

- [105] **POTTER, J.L., MATTHEWS, L.W., SPECTOR, S., LEMM, J.:**
Studies on pulmonary secretions. II. Osmolality and ionic environment of pulmonary secretion from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and laryngectomy.
Am. Rev. Respir. Dis. 96: 83-87 (1967)
- [106] **QUINTON, P.M.:**
Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport.
FASEB J. 4: 2709-2717 (1990)
- [107] **QUINTON, P.M.:**
Viscosity versus composition in airway pathology.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149: 6-7 (1994)
- [108] **RAYNAULD, J.-P., LAVIOLETTE, J.R.:**
The silver-silver chloride electrode: a possible generator of offset voltages and current.
J. Neuroscience Meth. 19: 249-255 (1987)
- [109] **REDDY, M.M., QUINTON, P.M.:**
Localisation of Cl-conductance in normal and Cl-impermeability in cystic fibrosis sweat duct epithelium.
Am. J. Physiol. 257: C727-C735 (1989)
- [110] **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)
- [111] **REGNIS, J.A., LAZAROWSKI, E.R., FOY, C.E., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R.:**
Uridine 5'-triphosphate metabolism by human nasal epithelium cells, whole blood and plasma in vitro.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: A 779 (1996) [Abstract]
- [112] **RIEDLER, J., HUTTEGGER, I.:**
Pilotstudie zur Amiloridinhalation bei Kindern mit cystischer Fibrose.
Klin. Pädiatr. 204: 158-162 (1992)
- [113] **RIORDAN, J.R., ROMMENS, J.M., KEREM, B.S., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J.L., DRUMM, M.L., IANUZZI, M.C., COLLINS, F.S. TSUI, L.C.:**
Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.
Science 245: 1066-1073 (1989)

- [114] **ROBINSON, M., REGNIS, J.A., BAILEY, D.L., KING, M., BAUTOVICH, G.J., BYE, P.T.P.:**
Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153: 1503-1509 (1996)
- [115] **ROMMENS, J.M., IANUZZI, M.C., KEREM, B.S., DRUMM, M.L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J.L., KENNEDY, D., HIDAKA, N., ZSIGA, M., BUCHWALD, M., RIORDAN, J.R., TSUI, L.C., COLLINS, F.S.:**
Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.
Science 245: 1059-1065 (1989)
- [116] **ROSENSTEIN, B.J., LANGBAUM, M.:**
Diagnosis.
In: Taussig, L.M.: Cystic fibrosis.
Thieme-Stratton Inc., Stuttgart, New York, p. 85-114 (1984)
- [117] **ROSENSTEIN, B.J., ZEITLIN, P.L.:**
Recent advances in cystic fibrosis.
Cur. Op. Pediat. 3: 392-398 (1991)
- [118] **ROTHMAN, S.:**
Physiology and biochemistry of the skin.
Univ. of Chicago Press: 9-25 (1954)
- [119] **RYLEY, H.C., GOODCHILD, M.C., DODGE, J.A.:**
Screening for cystic fibrosis.
Brit. Med. Bulletin 48: 805-822 (1992)
- [120] **SACHS, L.:**
Angewandte Statistik.
Springer-Verlag, Berlin (1974)
- [121] **SAUDER, R.A., CHESROWN, S.E., LOUGHLIN, G.M.:**
Clinical application of transepithelial potential differences measurements in cystic fibrosis.
J. Pediatr. 111: 353-358 (1987)
- [122] **SENIER, I.:**
Einfluß nasal inhalierter Kochsalz- und Amiloridlösungen auf die transepitheliale Potentialdifferenz bei Mukoviszidose-Patienten.
Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen (1997)

- [123] **SMITH, J.J., KARP, P.H., WELSH, M.J.:**
Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia.
J. Clin. Inv. 93: 1307-1311 (1994)
- [124] **SMITH, J.J., TRAVIS, S.M., GREENBERG, E.P., WELSH, M.J.:**
Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid.
Cell 85: 229-236 (1996)
Erratum. Cell 87: 355 (1996)
- [125] **STEWART, E.J., CINNAMOND, M.J., NICHOLS, P., STANFORD, C.F.:**
The effects of diuretics on nasal transmucosal potential difference.
Clin. Otolaryngol. 17: 351-353 (1992)
- [126] **STRONG, T.V., SMIT, L.S., TURPIN, S.V., COLE, J.C., TOM HON, C., 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)
- [127] **STUTTS, M.J., CANESSA, C.M., OLSEN, J.C., HAMRICK, M., COHN, J.A., ROSSIER, B.C., BOUCHER, R.C.:**
CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels.
Science 269: 847-850 (1995)
- [128] **STUTTS, M.J., MILGRAM, S.L., KNOWLES, M.R., BOUCHER, R.C.:**
Molecular link of CFTR to other ion transport processes.
Pediat. Pulmonolog. 17: 121 (1998)
- [129] **SUPER, M.:**
Milestones in cystic fibrosis.
Brit. Med. Bulletin 48: 717-737 (1992)
- [130] **TABCHARANI, J.A., ROMMENS, J.M., HOU, Y.X., CHANG, X.B., TSUI, L.C., RIORDAN, J.R., HANDRAHAN, J.W.:**
Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel.
Nature 366: 79-82 (1993)
- [131] **TAUSSIG, L.M., LANDAU, L.I., MARKS, M.I.:**
Respiratory system.
In: Taussig, L.M.: Cystic fibrosis.
Thieme-Stratton Inc., Stuttgart, New York, p. 115-174 (1984)

- [132] **THOMAS, P.J., KO, Y.H., PEDERSEN, P.L.:**
Altered protein folding may be the molecular basis of most cases of cystic fibrosis.
Febs-Lett. 312: 7-9 (1992)
- [133] **TINNER, U.:**
Elektroden in der Potentiometrie.
Selbstverlag der Metrohm AG
- [134] **TOMKIEWICZ, R.P., APP, E.M., ZAYAS, J.G., RAMIREZ, O.,
CHURCH, N., BOUCHER, R.C., KNOWLES, M.R., KING, M.:**
Amiloride inhalation therapy in cystic fibrosis:
Influence on ion content, hydration und rheology of sputum
Am. Rev. Respir. Dis. 148: 1002-1007 (1993)
- [135] **ÜNAL-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)
- [136] **USSING H.H., ZERAHN, K.:**
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited
isolated frog skin.
Acta physiol. Scand. 23: 112-127 (1950)
- [137] **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)
- [138] **VEEZE,H.J., HALLEY, D.J.J., BIJMAN, J., DE JONGSTE, J.C., DE
JONGE, H.R., SINAASAPPEL, M.:**
Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients.
J. Clin. Invest. 93: 461-466 (1994)
- [139] **VENABLES, P.H., SAYER, E.:**
On the measurement of the level of skin potential.
Birt. J. Psychol. 54: 251-260 (1963)
- [140] **VISCA, A., BIGNAMINI, E.:**
Concentration of inhaled amiloride in cystic fibrosis.
Lancet 347: 1126 (1996)

- [141] **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)
- [142] **WEBER, W.-M., DANNENMAIER, B., CLAUSS, W.:**
Ion transport across leech integument.
J. Comp. Physiol. B 163: 153-159 (1993)
- [143] **WELSH, J.M., LIEDTKE, C.M.:**
Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia.
Nature 322: 467-470 (1986)
- [144] **WELSH, M.J.:**
Electrolyte transport by airway epithelia.
Am. Physiol. Soc. 67: 1143-1184 (1987)
- [145] **WELSH, M.J.:**
Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia.
FASEB J. 4: 2718-2725 (1990)
- [146] **WELSH, J.M.:**
Abnormal chloride and sodium channel function in cystic fibrosis airway epithelia.
The lung: Raven Press, Ltd., New York, p. 2073-2081 (1991)
- [147] **WELSH, M.J., SMITH, A.E.:**
Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis.
Cell 73: 1251-1254 (1993)
- [148] **WELSH, M.J., TSUI, L., BOAT, T.F., BEAUDET, A.L.:**
Cystic fibrosis.
In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Frederickson, D.S., editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease.
McGraw-Hill, New York, p. 3799-3876 (1995)
- [149] **WHEELER, W.B., COLTON, H.R.:**
Cystic fibrosis: current approach to diagnosis and management.
Pediatr. Rev. 9: 241-248 (1988)

- [150] **WILLUMSEN, N.J., DAVIS, C.W., BOUCHER, R.C.:**
Cellular Cl-transport in cultured cystic fibrosis airway epithelium.
Am. J. Physiol. 256: C1045-C1053 (1989)
- [151] **WILLUMSEN, N.J., BOUCHER, R.C.:**
Sodium transport and intracellular sodium activity in cultured human nasal epithelium.
Am. Physiol. Soc. C: 319-331 (1991)
- [152] **WOOD, R.E., BOAT, T.F., DOERSHUK, C.F.:**
Cystic fibrosis: State of the art.
Am. Rev. of Resir. Dis. 113: 833-878 (1976)
- [153] **YANKASKAS, J.R., COTTON, C.U., KNOWLES, M.R., GATZY, J.T.,
BOUCHER, R.C.:**
Culture of human nasal epithelial cells on collagen matrix supports.
Am. Rev. Respir. Dis. 132: 1281-1287 (1985)
- [154] **ZAHAYKEVICH, A.:**
Amiloride for lung disease in cystic fibrosis.
DICP 25: 1340-1341 (1991)
- [155] **ZIERSCH A., HOFMANN, T., GEIDEL, C., KRAHL, A., SENIER I,
BITTNER-DERSCH, P., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:**
Iontentransportstörungen bei CF: Additiver Effekt von Amilorid und hypertoner Kochsalzlösung.
Monatsschr. Kinderheilkd. 145: 314 (1997) [Abstract]

Teile aus der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht:

HOFMANN, T., ZIERSCH, A., KARL, J., BOCK, A., LINDEMANN, H.:

Nasale transepitheliale Potentialdifferenz: Inhalative Applikation von Amilorid und Fenoterol als Diagnostikum bei Mukoviszidose.
Monatsschr. Kinderheilkd. 143: 220 (1995) [Abstract]

HOFMANN, T., BÖHMER, O., ZIERSCH, A., HEERD, E., LINDEMANN, H.:

A complete kid for measuring nasal transepithelial potential difference („Tholy) as a diagnostic tool in CF.

Pediatr. Pulmonol. 12: 250 (1995) [Abstract]

BLANK, U., CLAUSS, W., HOFMANN, T., LINDEMANN, H., HÜLS, G., ZIERSCH, A.:

Sodium channel blockers in primary cultured cystic fibrosis nasal epithelium: Effects of Amiloride, Benzamil and Phenamil.

Eur. Respir. J. 9: 180-181 (1996) [Abstract]

ZIERSCH, A., HOFMANN, T., GEIDEL, C., SENIER, I., BITTNER-DERSCH, P., HÜLS, G., LINDEMANN, H.:

Ionen-transportstörung bei CF: Additiver Effekt von Amilorid und hypertoner Kochsalslösung

Monatsschr. Kinderheilkd. 145: 314 (1997) [Abstract]

HOFMANN, T., STUTTS, M.J., ZIERSCH, A., RÜCKES, C., WEBER, W.-M., KNOWLES, M.R., LINDEMANN, H., BOUCHER, R.C.:

Effects of topically delivered Benzamil and Amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis.

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 1844-1849 (1998)

Lebenslauf

Geburtsdatum	05.04.1969
Geburtsort	Nieder-Ohmen
Eltern	Uta Luise Ziersch, geb. Stein * 26.05.1950 Walter Gerald Ziersch * 06.01.1948
08 / 75 - 07 / 79	Grundschule Nieder-Ohmen
08 / 79 - 07 / 85	Gesamtschule Mücke
08 / 85 - 07 / 88	Gymnasiale Oberstufe Grünberg; Abitur
10 / 88 - 05 / 90	Zivildienstleistender im Rettungsdienst; Abschluß zum Rettungssanitäter
WS 90 / 91	Studium der Elektrotechnik an der Fach- hochschule Giessen
WS 91 / 92	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität in Giessen
09 / 93	Ärztliche Vorprüfung
03 / 95	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04 / 97	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 97 - 09 / 98	Absolvierung des Praktischen Jahres (PJ)
11 / 98	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 01.05.99	Arzt im Praktikum, Universitätsklinik Frankfurt, Fachbereich Orthopädie

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lindemann danke ich ganz herzlich für die Überlassung der interessanten Fragestellung, für seine einzigartige Betreuung und seine unermüdliche Hilfestellung und Motivation bei der Bearbeitung der Themen.

Hervorzuheben sind die vielen freiwilligen Versuchspersonen, Mukoviszidose-Patienten wie gesunde Probanden, ohne deren uneigennütziges Engagement diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Thomas Hofmann, für die hervorragende Zusammenarbeit in den letzten Jahren und für die Unterstützung bei den einzelnen Themen.

Für die vielen Anregungen im Rahmen der verschiedenen klinischen Fragestellungen, sowie für die persönlichen Gespräche danke ich Herrn Dr. Gerd Hüls.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Winfried Keipp und Herrn Oliver Böhmer für die produktive Zusammenarbeit bei der Entwicklung und Herstellung der neuen Elektroden, sowie für die fachliche Beratung bei allen technischen Problemen; bei Herrn Michael Schorr für die Hilfe bei der graphischen Aufarbeitung und Frau Yasemin Avci für die Korrekturlesung der Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Dr. W.-M. Weber und Frau Dr. U. Blank, den Mitarbeitern des Lungenfunktionslabors und den anderen Doktoranden des PD-Labors für die kooperative Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, für die Unterstützung die mir das Studium erst ermöglicht hat, sowie meiner Freundin Daniela für Ihre Geduld, Ihr Verständnis und Ihre wunderbare Art mich immer wieder zu motivieren.