

**Sicherheit und Effizienz von
hochdosiertem Stickstoffmonoxid (NO)
zur Behandlung von Lungeninfektionen
bei Patienten mit Cystischer Fibrose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Deppisch, Caroline Laura

2015

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. J. Riethmüller
2. Berichterstatter:	Professor Dr. E. Tacconelli

FÜR MEINE LIEBEN

für dich, Papa

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 6

1.	EINLEITUNG	8
1.1	CYSTISCHE FIBROSE (CF)	8
1.1.1	PATHOGENESE	9
1.1.2	DIE CF-LUNGENERKRANKUNG	10
1.1.3	DIAGNOSTIK	12
1.1.4	THERAPIE	13
1.1.5	DIE CHRONISCHE KEIMBESIEDLUNG DER LUNGE BEI CF	14
1.1.5.1	BEDEUTUNG VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA	15
1.1.6	DIE PROBLEMATIK DER MULTIRESISTENTEN KEIME	16
1.2	STICKSTOFFMONOXID	17
1.2.1	ANTIBAKTERIELLE WIRKMECHANISMEN VON STICKSTOFFMONOXID	19
1.2.2	BISHERIGE ANWENDUNGSGEBIETE DER STICKSTOFFMONOXIDTHERAPIE	20
1.2.3	STICKSTOFFMONOXID ZUR THERAPIE BEI CF	21
1.3	ZIELE UND FRAGESTELLUNG	22
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	MATERIAL	23
2.2	METHODEN	24
2.2.1	STUDIENAUFBAU UND STUDIENDESIGN	24
2.2.2	PROBANDEN	26
2.2.2.1	EINSCHLUSSKRITERIEN	26
2.2.2.2	AUSSCHLUSSKRITERIEN	26
2.2.2.3	ABBRUCHKRITERIEN	27
2.2.3	STUDIENBEDINGTE UNTERSUCHUNGEN	28
2.2.3.1	BLUT	28
2.2.3.2	SPUTUM	28
2.2.3.3	LUNGENFUNKTION	29

2.2.4	MIKROBIOLOGIE	29
2.2.4.1	PROBENAUFBEREITUNG	29
2.2.4.2	MIKROBIOLOGISCHE KEIMIDENTIFIZIERUNG	30
2.2.5	LEUKOZYTENMESSUNG	32
2.3.	DATENAUSWERTUNG UND STATISTISCHE ANALYSE	33
3.	ERGEBNISSE	34
3.1	PATIENTEN	34
3.2	SICHERHEIT DER THERAPIE MIT NO	35
3.3	BAKTERIELLE UND MYKOTISCHE BESIEDLUNG	37
3.4	FORCIERTE EINSEKUNDEN VITALKAPAZITÄT (FEV ₁)	39
4.	DISKUSSION	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG	48
6.	LITERATURVERZEICHNIS	49
7.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	56
8.	DANKSAGUNG	57

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferase (GOT)
AST	Aspartataminotransferase (GPT)
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CNA-Agar	Columbia-Blutagar mit Colistin und Nalidixinsäure
CRP	C-reaktives Protein
DTT	Dithiothreitol
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESBL	Extended-Spectrum-Betalaktamasen
FEV ₁	Forcierte Einsekunden Vitalkapazität
FVC	Forcierte Vitalkapazität
h	Stunden
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRT	Immunreaktives Trypsin
ITT	Intention-to-treat-Analyse
KBE	Kolonie bildende Einheiten
MethHb	Methämoglobin
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
min	Minuten
ml	Milliliter
MMEF	(Mittlerer) Maximaler expiratorischer Fluss
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mmol/l	Millimol pro Liter
MRSA	Methicillin-resistenter- <i>Staphylococcus aureus</i>
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
ONOO ⁻	Peroxinitrit
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
post	nachher
PP	Per-Protocol-Analyse
ppm	parts per million
pre	vorher
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
µl	Mikroliter

1. EINLEITUNG

1.1 CYSTISCHE FIBROSE (CF)

Die CF, auch als Mukoviszidose bekannt, ist mit 1 von 2500 betroffenen Neugeborenen in Deutschland die häufigste autosomal-rezessive Erkrankung (Nahrlich and Zimmer, 2013).

In der klinischen Ausprägung der Erkrankung besteht eine große Heterogenität, so dass regionale Unterschiede bezüglich der Inzidenz und der auftretenden Genmutationen zu beobachten sind (De Boeck et al., 2006). In europäischen Populationen liegt die Heterozygotenfrequenz an klinisch nicht symptomatischen Trägern bei 1:20 bis 1:30 (Tummler and Stuhmann, 2003). Inzwischen sind über 1900 Mutationen im CFTR-Gen bekannt (Sosnay et al., 2011). Infolge des Gendefektes im „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)“ wird ein Protein, welches in der Zellmembran als cAMP abhängiger Chloridionenkanal vorhanden ist, unvollständig oder überhaupt nicht exprimiert. Daraus resultiert eine Störung an den exokrinen Drüsen des Körpers, die folglich ein hochvisköses Sekret produzieren (Reinhardt, 2001). Die Betroffenen sind an verschiedenen Organsystemen wie Lunge, Pankreas, Leber, Darm und den männlichen Geschlechtsorganen beeinträchtigt (Staab, 2004). Ein breit gefächertes Behandlungskonzept, welches auf den Erfahrungen und Weiterentwicklungen in Diagnostik und Therapie beruht, ermöglicht eine Lebenserwartung der an CF erkrankten Patienten, die im Mittel bei 42 Jahren liegt (Anon, 2007, Foundation, 2011). Mit Hilfe spezialisierter klinischer Betreuung, einer sekretolytischen Inhalation, von Physiotherapie, einhergehender hyperkalorischer Ernährung und Pankreasenzymsubstitution, mittels antimikrobieller Medikamente und in bestimmten Fällen einer Lungentransplantation, konnte die Lebensqualität der CF-Patienten in den letzten Jahren zunehmend verbessert werden, auch wenn eine erfolgreiche kausale Therapie der CF bisher nicht etabliert werden konnte (Gortner et al., 2012).

1.1.1 PATHOGENESE

Die Systemerkrankung CF wird auf genetischer Ebene durch Mutationen im CFTR-Gen ausgelöst, welches die Regulation des transmembranösen Fluss von Chlorid steuert. Der Erkrankung zugrunde liegend ist eine verminderte Chloridsekretion und vermehrte Natriumabsorption, die eine Funktionsstörung der exokrinen Zellen des gesamten Organismus zur Folge haben (Reinhardt, 2001). Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 7 lokalisiert (7q31.2) und besteht aus insgesamt 1480 Aminosäuren. Aufgrund der enormen Größe des CFTR-Proteins bestehen zahlreiche Möglichkeiten für das Auftreten von unterschiedlichen Mutationen, aktuell sind 1950 bekannt (Gortner et al., 2012). Unter den zahlreichen bekannten Mutationen ist die Phe508del, eine Deletion von 3 Basenpaaren, die den Verlust der Aminosäure Phenylalanin zur Folge hat, der weltweit häufigste Defekt und kommt in Nord- und Mitteleuropa im Mittel bei 70 % der CF-Erkrankten vor. In wiederum 50 % der Fälle liegt diese Mutation homozygot vor (Tummler and Stuhmann, 2003).

Das klinische Bild der Multiorganerkrankung CF ist geprägt von einer chronifizierenden Lungenerkrankung. Hinzu kommen Funktionsstörungen im Gastrointestinaltrakt und Fertilitätsstörungen sowie mögliche Manifestationen am Bewegungsapparat (Reinhardt, 2001). Charakteristika sind vermehrte Retention von stark viskösen Sekreten, die wasserarm sind und Funktionsstörungen aufweisen (Boucher, 2004).

Da das Krankheitsbild eine variable Expressivität aufweist, können trotz identischer genetischer Veränderungen unterschiedliche klinische Verläufe beobachtet werden (Moskowitz et al., 2008). Somit ist es auch bei bekannter Mutationsanalyse nicht möglich, eine eindeutige Aussage über den Schweregrad und den Verlauf der Erkrankung für den einzelnen Patienten zu treffen. Besonders die Lungenbeteiligung betreffend sind die Verläufe sehr variabel. Bezüglich der im Rahmen der Erkrankung auftretenden gastrointestinalen Beteiligung und der Dysfunktion oder Agenesie der männlichen Geschlechtsorgane sind inzwischen einige Zusammenhänge zwischen Genotyp und Manifestationsform bekannt (Mickle et al., 2000). Es ist

bisher nicht hinreichend erklärt, welchen Einfluss Umweltfaktoren und die Wechselwirkungen mit anderen Genen auf den Krankheitsverlauf haben könnten (Mickle and Cutting, 2000).

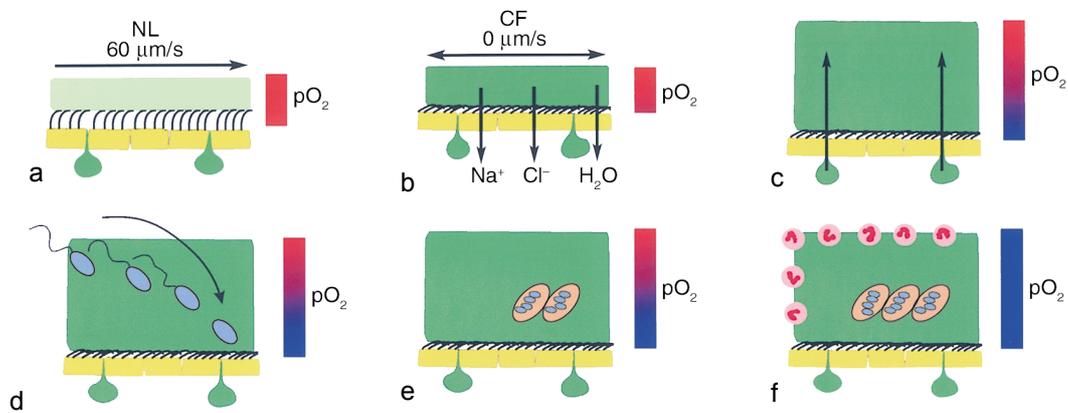
1.1.2 DIE CF-LUNGENERKRANKUNG

Obwohl die CF eine Multiorganerkrankung ist, stellt die Lungenerkrankung mit 85 % der Mortalität die Haupttodesursache der Patienten dar (Foundation, 2009). Bereits in der Fetalperiode kann eine Anreicherung von Makrophagen und Mastzellen in der Trachea und im Lungengewebe des noch ungeborenen Kindes festgestellt werden. Diese inflammatorischen Prozesse können Schleimhautveränderungen bedingen, die zu einer Prädisposition für Infektionen mit Mikroorganismen führen können. Morphologische Veränderungen der Atemwege sind zum Zeitpunkt der Geburt jedoch nicht nachzuweisen (Docker G, 1997). In der Lunge ist CFTR an der apikalen Seite der Epithelzellen lokalisiert, so dass bedingt durch eine CFTR-Mutation die Chloridsekretion in das Bronchiallumen erniedrigt ist. Folglich ist die Aufnahme von Natrium-Ionen in die Epithelzelle erhöht. Da mit den Natrium-Ionen physiologisch Wasser in die Epithelzelle aufgenommen wird, entsteht ein Wassermangel apikal der Epithelzelle, der zu einer erhöhten Viskosität des Mukus führt (Davis PB, 1996). In der gesunden Lunge kann der Mukus durch die mukoziliäre Clearance der Lunge mittels Zilien an der Oberfläche der respiratorischen Epithelzellen abtransportiert werden. Die hohe Viskosität des pathologisch veränderten Mukus führt jedoch dazu, dass die Funktion der Zilien uneffektiv wird und der Mukus sich an den Epithelzellen festsetzt. Eine kompensatorische Hypersekretion der submukösen Drüsen führt zusätzlich zu einer weiteren Zunahme der Schleimschicht, die folglich durch den entstehenden relativen Sauerstoffmangel einen idealen Nährboden für Bakterien darstellt, die im Rahmen früher Infektionen in die Lunge eindringen und für eine chronische pulmonale Keimbesiedlung prädisponieren (Kilian and Kisiel, 2006). Niedrige Sauerstoffkonzentrationen und die zunehmende

Entstehung von bakteriellen Mikrokolonien bahnen den Weg einer chronischen Lungeninfektion (Worlitzsch et al., 2002).

Die daraus resultierende dauerhafte Entzündungsreaktion führt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, zur zunehmenden Zerstörung des Lungengewebes und schließlich zur respiratorischen Insuffizienz (Collins, 1992).

Abb. 1: Pathomechanismus der Atemwegsinfektion von CF-Patienten mit *P. aeruginosa*



Physiologisch wird die dünne Mukusschicht von Zilien an der respiratorischen Zelle transportiert (mukoziliäre Clearance), innerhalb dieser Schicht besteht eine ausgeglichene Sauerstoff-Bilanz (a). Atemwegsepithel von CF-Patienten (b-f). Ein ausgeprägter Flüssigkeitsstrom nach intrazellulär irritiert die periziliäre Flüssigkeitsschicht, so dass der Mucus nicht mehr abtransportiert wird und die Zilien von einer Flimmerbewegung abhält (b). Eine kompensatorische Hypersekretion steigert das Volumen der luminalen Mukusmasse auf ein Vielfaches. Innerhalb des Mucus entsteht ein hypoxischer Gradient. (c) *P. aeruginosa* siedeln sich bevorzugt innerhalb der Bereiche mit geringen Sauerstoffkonzentrationen an (d) und bilden Mikrokolonien (e). Diese besitzen eine hohe Resistenz gegenüber den körpereigenen Abwehrmechanismen. Neutrophile Granulozyten wandern ein und ebnen einer chronischen Inflammation den Weg (f).

Adaptiert aus (Worlitzsch et al., 2002)

1.1.3 DIAGNOSTIK

Klinische Symptome oder bestimmte anamnestische Risikofaktoren können ein Hinweis auf das Vorliegen einer CF sein. Die wichtigsten Symptome sind ein Mekoniumileus, rezidivierende Bronchitiden, unklare Gedeihstörungen, Diarrhoen, rezidivierende Nasenpolypen, eine unklare Hepatopathie und die männliche Infertilität (Rosenstein and Cutting, 1998). Diese sollten eine entsprechende Diagnostik zur Folge haben. Zunächst erfolgt die Durchführung eines Schweißtests, der Pilocarpin-Iontophorese. Dieser beinhaltet die Bestimmung von Natrium und Chlorid bei einer durch Anregung der Schweißdrüsen gesammelten Mindestschweißmenge von 40 µl. Pathologische Werte liegen ab 60 mmol/l (ab 70 mmol/l bei älteren Erwachsenen) vor, ein Wert > 30 mmol/l gilt als kontrollbedürftig. Zu beachten ist, dass es zahlreiche Ursachen für einen falsch positiven Schweißtest gibt und es sich empfiehlt, bei unklaren Werten diesen ein zweites Mal durchzuführen. Bei einem auffälligen Ergebnis im Schweißtest sollte die Vorstellung des Betroffenen in einer spezialisierten CF-Ambulanz erfolgen und ein genetisches Screening auf die häufigsten Mutationen der CF durchgeführt werden. Meist gefolgt von einer Vollsequenzierung des CFTR-Gens. Aufgrund des teilweise unspezifischen Beschwerdebildes wird die Diagnose einer CF erst zu einem Zeitpunkt gestellt, wenn schon chronische Veränderungen im Organismus stattgefunden haben. Es besteht die Möglichkeit, bereits nach der Geburt im Rahmen des Stoffwechsel-Screenings ein Screening auf CF mittels laborchemischer Untersuchung von Trockenblut durchzuführen. Hierbei wird zunächst das *Immunreaktive Trypsin* (IRT) und als zweite Stufe - falls dieser Wert erhöht ist - das *Pankreatitis-assoziierte Protein* (PAP) bestimmt. Sind beide Proteine erhöht, gilt das Screening als auffällig und eine Vorstellung in einer spezialisierten Ambulanz wird empfohlen (Bundesverband, 2014). In zahlreichen Ländern wird bereits ein einheitliches Neugeborenen-Screening auf CF erfolgreich durchgeführt. In Deutschland hat bisher keine Vereinheitlichung der Handlungsweise stattgefunden, und das Neugeborenen-Screening wird im

Rahmen wissenschaftlicher Studien nur an einigen lokalen Standorten angeboten (Nahrlich and Zimmer, 2013).

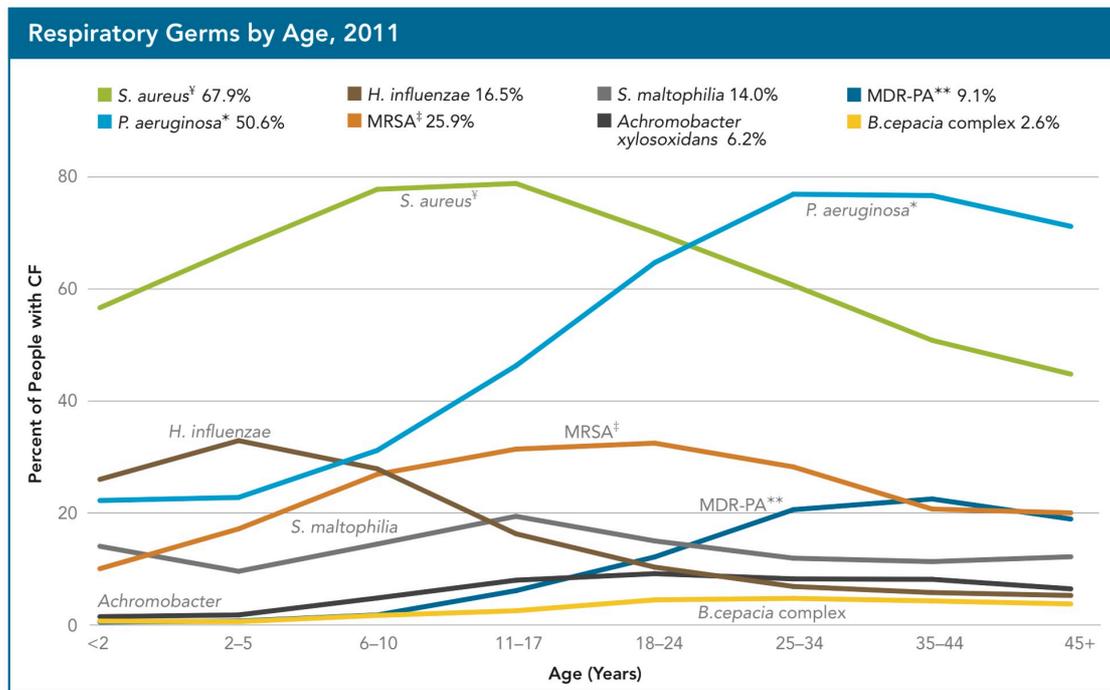
1.1.4 THERAPIE

Zum aktuellen Zeitpunkt wird die Therapie der CF ausschließlich symptomatisch durchgeführt. Eine kausale Therapie der Erkrankung, wie beispielsweise eine Gen-Therapie, konnte bisher nicht erfolgreich etabliert werden. Somit setzt sich die „multipragmatische“ Therapie aus der Behandlung der chronischen Lungeninfektion, einer Optimierung der Ernährungssituation, der Pankreasenzymsubstitution und der Vorbeugung von Komplikationen zusammen, um die unterschiedlichen Manifestationen der Erkrankung zu behandeln. Vor allem Antibiotika (inhalativ, oral und intravenös), Pankreasenzyme und Nahrungsergänzungsmittel sowie verschiedene Medikamente mit antiobstruktiver, sekretolytischer und antiinflammatorischer Wirkung kommen hierbei zum Einsatz. Auch die langfristige Anbindung an spezialisierte CF-Zentren und die Zusammenarbeit mit erfahrenen Therapeuten hat sich als wichtige Säule in der erfolgreichen CF-Therapie erwiesen (O'Sullivan and Flume, 2009).

Weiterhin bestehen große Bemühungen, die Therapie der CF zu optimieren und Ansätze auf molekularer Ebene, z.B. mutationsspezifische Therapien, zu erproben oder effektivere Strategien in der Behandlung der chronischen Lungeninfektionen zu etablieren (Prickett and Jain, 2013, Dinwiddie, 2005, Fajac and Sermet-Gaudelus, 2013).

1.1.5 DIE CHRONISCHE KEIMBESIEDLUNG DER LUNGE

Abb. 2: Prävalenz der Keimbeseidlung nach Alter



**P. aeruginosa* includes people with MDR-PA.

**MDR-PA is multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

[‡]*S. aureus* includes people with MRSA.

[‡]MRSA is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Übernommen aus (Foundation, 2011)

Mehr als 150 verschiedene Stämme von Bakterien sind vermutlich an der komplexen Pathophysiologie der Lungenerkrankung bei CF-Patienten beteiligt. Die häufigsten bakteriellen Erreger, die bei der Lungeninfektion von CF-Patienten eine besondere Rolle spielen, sind opportunistische Erreger wie *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *P. aeruginosa*. Die Prävalenz der unterschiedlichen Keime, welche die Lunge besiedeln, ist vom Alter der Patienten abhängig (vergleiche Abbildung 2).

Staphylococcus aureus und *Haemophilus influenzae* werden vor allem bei Kindern und Jugendlichen nachgewiesen. Im Erwachsenenalter treten hingegen vor allem die Infektionen mit *P. aeruginosa* in den Vordergrund. *P. aeruginosa* ist einer der Hauptverursacher der Verschlechterung der Lungenfunktion, des Allgemeinzustandes und auch des vorzeitigen Todes der CF-Patienten. Bereits im Alter von weniger als 2 Jahren haben bis zu 30 % der Erkrankten einen positiven Nachweis von *P. aeruginosa* im Sputum/ Rachenabstrich. Bei den über 18-jährigen Patienten steigen die Zahlen bis zu 80 % (Foundation, 2011). Die chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* führt zu einer Organisation der Bakterien in Biofilmen, die die Wirkung und Effektivität von Antibiotika selbst in hohen Dosen deutlich erschweren (Hoiby et al., 2010). Außerdem wird die Wirkung von Antibiotika durch die hohe Mutationsrate der Bakterien im Laufe der Jahre und die erschwerte Aufnahme der Antibiotika in das hochvisköse Sputum zusätzlich verringert (Levy, 1986, Oliver et al., 2000). *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter denitrificans* und *Stenotrophomonas maltophilia* sind weniger häufig. Multi-resistente Erreger wie beispielsweise MRSA nehmen in der Häufigkeit im Laufe der letzten Jahre zu (Foundation, 2011).

1.1.5.1 BEDEUTUNG VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) ist ein gram-negatives Bakterium, welches in feuchtem Milieu und Wasser optimale Wachstumsbedingungen findet und ubiquitär vorhanden ist (Kerr and Snelling, 2009). Es ist der am häufigsten die Lunge besiedelnde Keim bei CF-Patienten (Anon, 2007), so dass der konsequenten, antibakteriellen Therapie eine Schlüsselrolle in der erfolgreichen Therapie der CF zukommt. Die durch das Bakterium bedingten Infektionen des Respirationstraktes sind hauptverantwortlich für die Verschlechterung der Lungenfunktion, eingeschränkte Lebensqualität und schließlich die Lebensdauer der betroffenen Patienten verantwortlich (Doring and Worlitzsch, 2000). Der Zeitpunkt der ersten Besiedelung der Lunge mit *P. aeruginosa* hat Studien zufolge einen negativen Effekt auf die

Lungenfunktion im Gesamtverlauf der Erkrankung (Emerson et al., 2002). Bereits im Alter von weniger als 2 Jahren zeigen über 20 % der Kinder mit CF einen positiven Keimnachweis mit *P. aeruginosa*. Im Gesamten sind 50 % der CF-Patienten pulmonal mit *P. aeruginosa* besiedelt. (Foundation, 2011). Die frühe Kolonisation zeigt meist einen antibiotikasensiblen, nicht-mukoiden Phänotyp. Im Laufe der Jahre verändert sich der Phänotyp in einen mukoiden, alginat-bildenden Phänotyp und erweist sich zunehmend therapieresistent. Patienten, die mit nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Stämmen besiedelt sind oder bei denen keine Veränderung zum mukoiden Phänotyp stattgefunden hat, besitzen über die Jahre hinweg eine bessere Lungenfunktion als Patienten, die mit mukoiden Erregerstämmen behaftet sind (Parad et al., 1999). *P. aeruginosa* können entweder ohne Zellverband im Lungengewebe von den Patienten existieren oder in komplex organisierten dichten Biofilmen. Diese Biofilme können für die Eradikation der Bakterien mit Antibiotika oder die körpereigene Immunabwehr eine besondere Barriere darstellen (Hoiby et al., 2001). Die Formation von Biofilmen wird als eine der Schlüsselmechanismen für die Persistenz der Bakterien in der Lunge von CF-Patienten gesehen (Costerton et al., 1999).

1.1.6 DIE PROBLEMATIK DER MULTIRESISTENTEN KEIME

Der Zeitpunkt der Besiedlung der Atemwege mit *P. aeruginosa* ist einer der Prädiktoren für den Verlauf der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit CF. Die Patienten erhalten im Rahmen der leitliniengerechten Therapieschemata, die sowohl inhalativ, oral und intravenös verabreichte Antibiotika verschiedener Klassen beinhalten, die höchste kumulative Dosis an antimikrobieller Therapie über die Dauer ihres Lebens überhaupt. Eine Folge dieses konsequenten Therapieregimes wird im weltweit ansteigenden Prozentsatz an antibiotikaresistenten Keimen gesehen (Doring et al., 2000, Falagas and Bliziotis, 2007). Der *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) wurde beispielsweise im Jahr 2001 bei nur 7 % der CF-Patienten

nachgewiesen. Im Jahr 2010 ist diese Zahl bereits auf 25,7 % der Patienten angestiegen (Stone and Saiman, 2007, Foundation, 2011). Darüber hinaus gibt es einen alarmierenden Nachweis von epidemisch auftretenden Stämmen dieser resistenten *Staphylococcus aureus species* in den großen europäischen CF-Zentren (McCallum et al., 2002, Jelsbak et al., 2007).

Von besonderer Bedeutung ist, dass einige dieser Erreger wie zum Beispiel *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia complex species*, nichttuberkulöse *Mykobakterien* und *Aspergillus species* eine intrinsische Resistenz gegenüber gängigen Antibiotika aufweisen. Diese Tatsache macht die Therapie der Lungenerkrankung bei CF-Patienten besonders anspruchsvoll. In Anbetracht dieser Tatsachen besteht der dringende Bedarf an neuen alternativen Therapiestrategien.

1.2. STICKSTOFFMONOXID

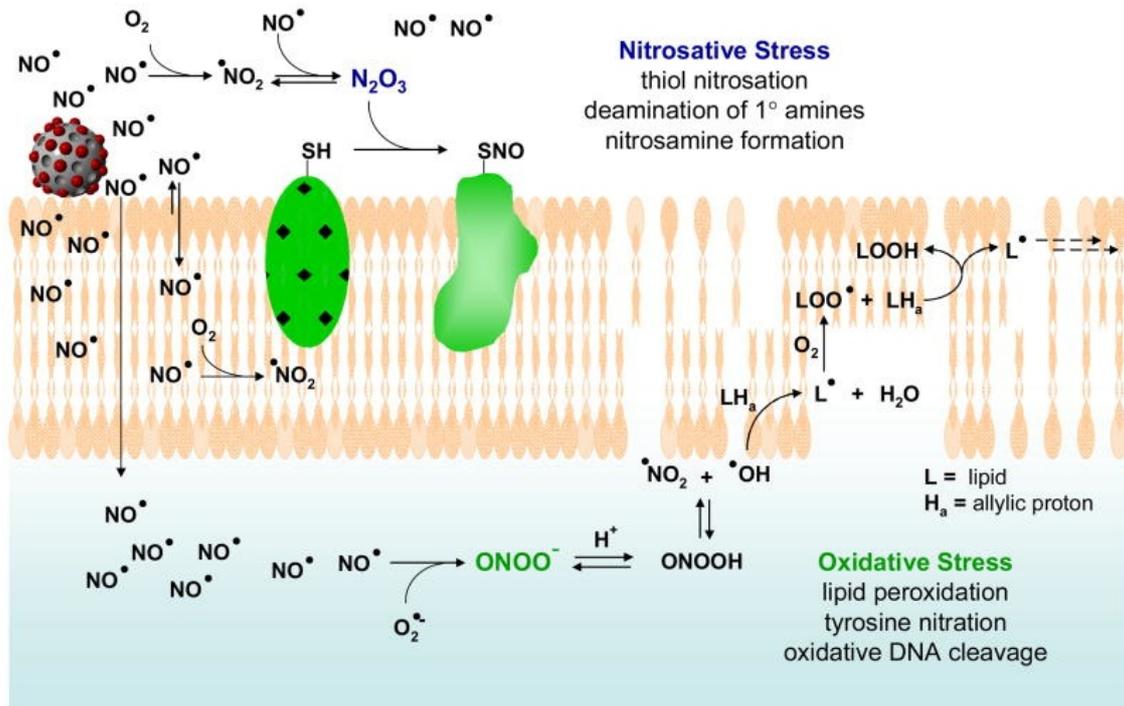
Stickstoffmonoxid ist ein bi-atomares, farbloses und geruchloses Gas mit der Summenformel NO. Die chemische Verbindung setzt sich aus den Elementen Stickstoff und Sauerstoff zusammen. Als Bestandteil der angeborenen Immunantwort des menschlichen Immunsystems wird die Produktion von NO in Makrophagen und Mikroglia mittels der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) bei zahlreichen Entzündungsreaktionen des Körpers und bei Infektionen mit Mikroorganismen induziert. Auch die Angiogeneseinduktion, Wundheilungsregulation, Neurotransmission und Vasodilatation sind endogen von NO beeinflusst. In der Lunge und auch im Rahmen einer Sepsis wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), welche auch zur Enzymfamilie der NO-Synthasen zählt, das Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Diese Reaktionskaskade führt zur Relaxation der glatten Muskulatur und folglich auch zur Vasodilatation.

Stickstoffmonoxid besitzt *in vitro* eine antibakterielle Wirkung auf ein weites Spektrum von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Würmer und Parasiten,

was es für die Therapie von Infektionskrankheiten interessant macht (Agency, 2013, Ghaffari et al., 2006). In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Applikationsweisen erforscht und entwickelt, die das instabile und hochreaktive Radikal in gasförmigem Zustand auch im klinischen Alltag einsetzbar machen. Die Verbindung von NO mit organischen Molekülen, Metallen, Nanopartikeln und die Verbindung mit einem Luftgemisch (gaseous NO oder gNO) wurden experimentell bei Pneumonien, Wundheilungsstörungen und Hautdefekten erprobt (Ghaffari et al., 2006, Miller et al., 2013). Mögliche Nebenwirkungen einer NO-Therapie ergeben sich dadurch, dass NO dosisabhängig an Hämoglobin bindet und das dadurch entstehende Methämoglobin (MetHb) einen verminderten Transport von lebensnotwendigem Sauerstoff zu den Zellen zur Konsequenz haben kann (Young et al., 1994, Young et al., 1996). Die Funktion von NO als nitrosylierende Substanz zur körpereigenen Abwehr gegen Krankheitserreger kann in höheren Dosen auch Proteine und andere Zellkomponenten destruieren. Die kurze biologische Halbwertszeit und Instabilität von NO ergibt sich durch die Verbindung des Gases mit Sauerstoff, so dass es in biologisch aktivem Gewebe sehr schnell zu einem weniger reaktiven Produkt (NO_2^-) zerfällt (Ignarro et al., 1993).

1.2.1 ANTIBAKTERIELLE WIRKMECHANISMEN VON STICKSTOFFMONOXID

Abb. 3: Stickstoffmonoxid als antibakterieller Wirkstoff



Adaptiert aus (Hetrick et al., 2008)

Bei der Verbindung von Stickstoffmonoxid und Sauerstoff entstehen reaktive Nebenprodukte (N₂O₃ und ONOO⁻). Die antibakteriellen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid werden auf die Entstehung von sowohl nitrosativem als auch oxidativem Stress, der von den reaktiven Nebenprodukten ausgeht, zurückgeführt. Die Nitrosation von Thiolen an unterschiedlichen Proteinen und die Desaminierung der DNA fallen unter den Begriff „nitrosativer Stress“. Oxidativer Stress führt zur Peroxidation von Lipiden. Da Lipide essentielle Bestandteile der doppelwandigen Zellmembranen im Körper sind, führt die Schädigung der Lipide zur Instabilität der Zellmembran. Außerdem werden funktionelle Tyrosinanteile in der Zellmembran durch die Verbindung mit reaktiven Peroxynitriten geschädigt (Hetrick et al., 2008).

1.2.2 BISHERIGE ANWENDUNGSGEBIETE DER STICKSTOFFMONOXIDTHERAPIE

Stickstoffmonoxid ist in Konzentrationen von 10-80 ppm ein pulmonaler Vasodilatator. Das gasförmige Stickstoffmonoxid (INOmax hergestellt u.a. durch Linde Healthcare AB) ist als Arzneimittel seit dem Jahr 2001 für die Therapie der pulmonalen Hypertonie bei Neugeborenen zugelassen und findet Anwendung in der elektiven Herzchirurgie (Klappenerkrankungen, Herztransplantationen). Die Wirkung von NO als kurz wirksamer Vasodilatator wird sich hierbei zunutze gemacht (Bender et al., 1997). Die empfohlene Dosis beträgt 20 ppm und wird der Atemluft beigemischt (Agency, 2013, Therapeutics, 2013). Zu weiteren Erkrankungen, deren Therapie die gefäßerweiternde Wirkung von NO nutzt, zählen die Angina pectoris als Symptom der koronaren Herzerkrankung (pharmakologische Therapie mit Glyceroltrinitrat), pulmonal arterieller Hypertonus und auch die erektile Dysfunktion (pharmakologische Therapie mit Phosphodiesterasehemmern wie Sildenafil) (Lowenstein and Snyder, 1992).

1.2.3 STICKSTOFFMONOXID ZUR THERAPIE BEI CF

Bei CF-Patienten finden in der Lunge chronische Entzündungsprozesse und immer wieder neu auftretende Infektionen zugleich statt. Trotz dieser permanent ablaufenden Atemwegsinflammation und einer durch Phagozyten induzierten Produktion der Stickstoffmonoxid-Synthase, die nach oben reguliert wird, ist die Expression der *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) im respiratorischen Epithel der CF-Patienten relevant vermindert (Thomas et al., 2000). Die antimikrobielle Aktivität von NO betrachtend, könnte dieser Mangel an NO zur chronischen Lungenerkrankungen bei CF beitragen (Darling and Evans, 2003). Auch die konkrete Messung des expiratorischen NO zeigte vergleichsweise niedrige Werte bei CF-Patienten (Meng et al., 1998, Darling and Evans, 2003). Diese Tatsache inspirierte Grasemann et al. zum Therapieversuch mit inhalativem L-Arginin zur Bereitstellung eines physiologischen NO-Donators (Grasemann et al., 2006). Diese Therapie bewirkte kurzzeitige Verbesserungen der Lungenfunktion von CF-Patienten durch die durch L-Arginin ausgelöste Entstehung von NO in der Lunge (Grasemann et al., 2006). Die reine Inhalation von NO in Konzentrationen von 40-100 ppm jedoch brachte keinen sofortigen Effekt auf die Lungenfunktion der Patienten (Ratjen et al., 1999). Im Bereich von 160-200 ppm wiesen Studien eine potente antibakterielle Wirkung von NO in vitro und in Tiermodellen nach (Miller et al., 2009, Miller et al., 2004, MacMicking et al., 1997, Ghaffari et al., 2005, Kelley and Drumm, 1998). So stellt sich die Frage, ob eine vergleichbare Dosierung auch bei CF-Patienten eine entsprechende mikrobiozide Wirkung zeigen könnte.

1.3 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN

Stickstoffmonoxid hat *in vitro* bei einer Konzentration von 160 ppm eine mikrobiozide Wirkung auf Bakterien, Pilze und Parasiten. In einer Phase I Studie an gesunden Erwachsenen wurde gezeigt, dass gepulste Inhalationen von 160 ppm NO über 30 min mit je einer Erholungszeit (ohne Inhalation) von 3,5 Stunden sicher sind (Miller et al., 2012). Im Rahmen der nun durchgeführten Phase I-Studie sollte den Fragen nachgegangen werden, ob eine gepulste NO-Inhalationstherapie bei Patienten mit CF sicher ist, zu einer Reduktion der Keimbelastung der Lunge und in dieser Konsequenz zu einer Verbesserung der Lungenfunktion führen kann.

Primäres Ziel dieser Phase I-Studie war es, die Sicherheit einer gepulsten NO-Inhalation bei CF-Patienten in einem Therapieansatz von zweimal 5 Tagen zu überprüfen. Als sekundäre Zielparameter wurden einerseits nach zehn Tagen Therapie absolute und relative Veränderungen der Lungenfunktion mittels etablierter Funktionsparameter (FVC, FEV₁ und MEF₂₅₋₇₅) beurteilt und andererseits die Reduktion der bakteriellen Besiedelung von *P. aeruginosa* und anderer Keime in der Lunge und die mögliche Reduktion von Leukozyten im Sputum gemessen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

Tabelle 1: Reagenzien und Laborbedarf

Produkt	Hersteller
Ampuwa (steriles, pyrogenfreies Wasser)	Fresenius Kabi, Deutschland
CNA-Blutagar	Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg, Deutschland
Columbia-Blutagar (Blut-Platten)	Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endo Agar	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Tübingen, Deutschland
Eppendorf-Cups, 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Ethanol 70 %	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Tübingen, Deutschland
Oxidase-Teststreifen	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (phosphat buffered saline)	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Tübingen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Slidex Staph Plus (Agglutinations-Teststreifen zur Identifikation von <i>Staphylococcus aureus</i>)	BioMérieux, Nürtingen, Deutschland
Sputasol (Dithiothreitol 1,4 %)	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK

2.2 METHODEN

2.2.1 STUDIENAUFBAU UND STUDIENDESIGN

Abb. 4: Studienaufbau



Die Durchführung der Studie wurde als prospektive, offene, klinische Phase I Studie geplant. In den monozentrischen Aufbau wurden insgesamt 8 erwachsene CF-Patienten eingeschlossen, bei denen eine chronische Keimbesiedelung u.a. mit *P. aeruginosa* nachgewiesen werden konnte.

Die Studie dauerte pro Patient 4 Wochen, in denen jeder Studienteilnehmer das Stickstoffmonoxid (160 ppm) dreimal täglich an zweimal 5 Tagen mit einer 2-tägigen Pause über ein Wochenende unter stationären Bedingungen inhalierte.

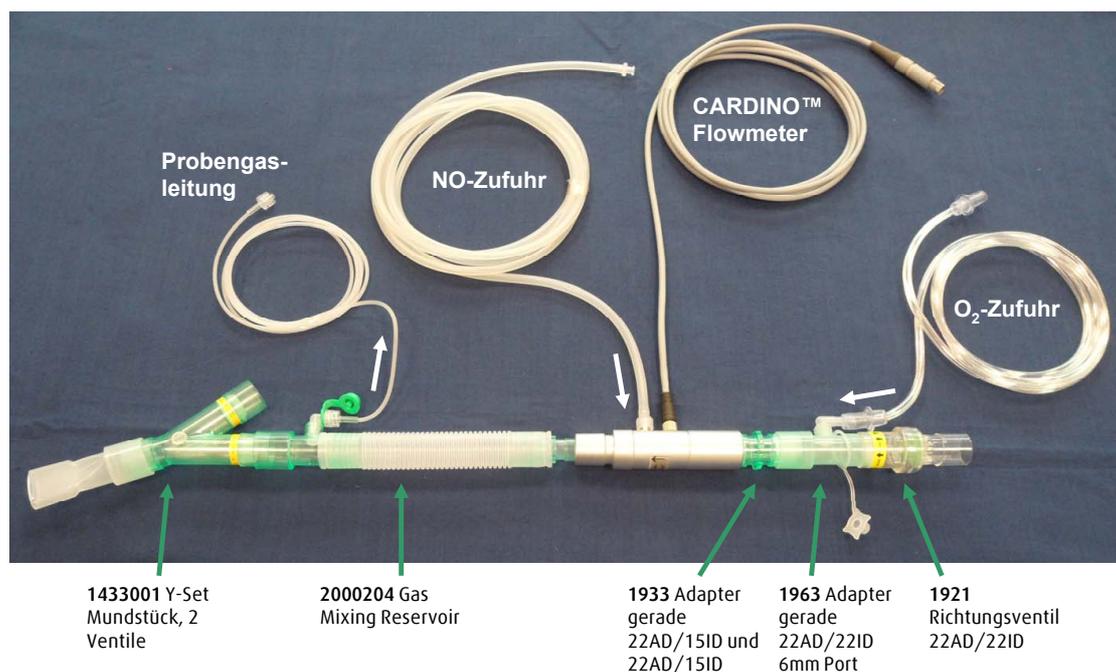
Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen gemäß bestehender Vorschriften geprüft, und das BfArM hat der Studie zugestimmt.

Entsprechend des geplanten Studienablaufes inhalierten die Patienten 160 ppm NO über ein NO device (Cardino™ = NO-A, Maquet GmbH, Rastatt, Deutschland; vergleiche Abbildung 5), welcher das Gas aus einer 800 ppm Gaskartusche (Linde AG, München, Deutschland) bereitstellte. Das NO-Gas wurde vor Inhalation über das NO device kontinuierlich mit 0,5 bis 1 Liter Sauerstoff vermischt. Die NO-Inhalationen wurden zweimal für 5 Tage durchgeführt und fanden dreimal täglich für 30 Minuten statt. Die Erholungszeit zwischen den Inhalationen lag bei 3 Stunden, basierend auf NO-Studienergebnissen bei gesunden Probanden (Miller et al., 2012). Bereits eine Woche vor Beginn der Studie wurden die Patienten in einer Untersuchung

klinisch beurteilt. Die ersten 5 Tage der Therapie erfolgten bei 3 Patienten unter stationären Bedingungen. Nach 2 Tagen Therapiepause (Wochenende) konnten die weiteren 5 Studientage bei diesen 3 Patienten und bei allen weiteren Patienten von Beginn an unter ambulanten Bedingungen durchgeführt werden. Im Anschluss fand eine einwöchige Nachbeobachtung statt. Um die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten, wurden therapiebegleitend die Herzfrequenz, der Blutdruck und die Sauerstoffsättigung erfasst, die Konzentrationen von NO und NO₂ in der einströmenden Luft bestimmt und das MetHb transkutan gemessen.

Abb. 5: INOmax NIV-Inhalations-Set CARDINO™

INOmax NIV-Inhalations-Set CARDINO™



Bildquelle: PD Dr. Riethmüller

2.2.2 PROBANDEN

Nach ausführlicher Aufklärung über die geplante Therapie und deren mögliche Nebenwirkungen wurden 8 CF-Patienten im Alter von 21 bis 44 Jahren in die dargestellte Studie eingeschlossen. Alle teilnehmenden Patienten waren über mindestens zwei Wochen vor Beginn der ersten NO-Inhalation in klinisch stabilem Zustand. Die übliche individuelle orale und inhalative Antibiotikatherapie wurde eine Woche vor der ersten NO-Applikation beendet. Als krankheitsbedingt notwendige Begleitmedikation wurden Mannitol (n = 1), Pulmozyme (n = 2) oder hypertone Kochsalzlösung (n = 5) als Inhalation eingesetzt.

2.2.2.1 EINSCHLUSSKRITERIEN

Die folgenden Kriterien wurden für die Teilnahme an der Studie vorausgesetzt:

1. nachgewiesene CF-Erkrankung
2. Alter von mindestens 18 Jahren
3. $FEV_1 < 80 \% \text{ und } > 30 \%$
4. chronische Keimbesiedlung der Lunge (seit mind. 6 Monaten)
5. Sauerstoffsättigung (SaO_2) $> 90 \%$
6. Methämoglobin (MetHb) $< 3 \%$ vor Beginn der Therapie mit NO

2.2.2.2 AUSSCHLUSSKRITERIEN

Die nachfolgend aufgeführten Kriterien führten zu einem Ausschluss von der Studie:

1. Klinisch zu beobachtende Verschlechterung des Krankheitsgeschehens (akute Exazerbation)
2. Notwendige Sauerstofftherapie
3. Schwangerschaft und Stillzeit oder unzureichende Kontrazeption
4. Rechtsherzinsuffizienz oder pulmonale Insuffizienz
5. Leberinsuffizienz (ALT/AST > 1,5)
6. Hämoglobin unter 13 mg/dl
7. Behandlung mit Tobramycin oder Aztreonam

2.2.2.3 ABBRUCHKRITERIEN

Folgende Kriterien führten zu einer Beendigung der Therapie:

1. Protokollverletzung
(z.B. das Auslassen der Studienmedikation an einem der Therapietage)
2. Unerwünschte Nebenwirkungen
(wie arterielle Hypotension mit systolischen Werten unter 90 mmHg, Anstieg des MethHb > 5 %, Abfall der Sauerstoffsättigung SaO₂ < 88 %, Dyspnoe oder Lethargie)
3. Akute pulmonale Komplikationen
(bspw. Pneumothorax, endotracheale oder bronchiale Hämorrhagien)
4. Akute pulmonale Exazerbationen
(mit Zeichen wie der Veränderung der Menge und Farbe des Sputum, zunehmendem Husten und Krankheitsgefühl, zunehmende Dyspnoe, Müdigkeit, Lethargie, Gewichtsverlust, radiologische Veränderungen oder Abfall der Lungenfunktion um mehr als 10 %)
5. Jede weitere Beeinträchtigung, welche die Gesundheit der Patienten in Gefahr bringen könnte

2.2.3. STUDIENBEDINGTE UNTERSUCHUNGEN

Studienbegleitend wurden Vitalparameter, Laborparameter und anamnestische Daten erhoben. Außerdem wurden weitere therapierrelevante Maßnahmen z.B. zur Verbesserung der Lungenfunktion durchgeführt (Inhalation, Sekretolyse, orale Antibiotika).

Die nachfolgenden Informationen wurden darüber hinaus erhoben.

2.2.3.1 BLUT

Zur Überwachung der Entstehung von MetHb als bekannte Reaktion bei der Inhalation mit NO wurde an Tag 1 und 2 vor, während und nach der NO-Inhalation eine Blutgasanalyse (MetHb, Laktat, pO₂, pCO₂, pH) durchgeführt. Weiterführend wurde ab Tag 3 nur noch eine Messung am Ende des täglichen Inhalationszyklus vorgenommen.

Sonstige Blutuntersuchungen (Differentialblutbild, Harnstoff, Kreatinin, Leberenzyme, CRP) wurden vor Beginn der Studie und an den Tagen 1, 2, 5 analysiert oder wenn es begründeten klinischen Anlass dazu gab.

Weitere 5 ml Blut, die an den Tagen 1 und 10 abgenommen wurden, machten die Bestimmung weiterer Blutwerte bei Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie möglich.

2.2.3.2 SPUTUM

Um die Bakterienlast des Sputums zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie zu bestimmen, wurde von allen Patienten vor und nach Beginn der Inhalation an allen Therapietagen spontan produziertes Sputum gesammelt und am Tag der Probengewinnung im Labor weiterverarbeitet. Nach Verdünnung wurden die gewonnenen Proben bei - 20 °C konserviert. Auch die Anzahl der Leukozyten wurde bei jedem Sputum erhoben.

2.2.3.3 LUNGENFUNKTION

Die Lungenfunktionsparameter Forcierte Vitalkapazität (FVC), Forcierte Einsekunden Vitalkapazität (FEV_1), Maximaler expiratorischer Fluss (MEF_{25-75}) wurden per Spirometrie mit Hilfe eines Asthma Monitor® AM1 (Care fusion, Hoechberg) ermittelt. Die Messungen erfolgten an den Tagen 1 und 2 vor und nach allen Inhalationen mit NO, an den Tagen 3 bis 10 zu Beginn und nach Ende eines Therapietages.

2.2.4. MIKROBIOLOGIE

Um den möglichen bakteriziden Einfluss der Stickstoffmonoxidtherapie auf die bakterielle Besiedlung der Lunge zu untersuchen, wurden täglich vor und nach der Therapie gewonnene Sputumproben der Studienteilnehmer mikrobiologisch untersucht.

2.2.4.1 PROBENAUFBEREITUNG

Das Sputum wurde von den Patienten in ein steriles Gefäß abgehustet. Noch am Tag der Probengewinnung wurde das Sputum je nach Viskosität und Beschaffenheit mit Dithiothreitol (DTT) 0,1 % (Ausgangslösung bestehend aus 3,75 ml Sputasol, Oxoid (entspricht DTT) + 46,25 ml Ampuwa) verdünnt, um eine quantitative Analyse zu ermöglichen. Um die Proben exakt zu verdünnen und homogen aufzubereiten, wurden sie zunächst abgewogen und nach hinzufügen der entsprechenden Menge DTT mit einem Vortex Gerät gemischt. 1 ml des aufbereiteten Sputums (= V_0) wurde für die Quantifizierung der Mikroorganismen weiter verdünnt. Hierzu wurden 10 μ l der Probe entnommen und in ein Eppendorf-Cup gegeben, in welches zuvor 990 μ l PBS (phosphatgepufferte Saline) pipettiert wurden.

Dieser Verdünnungsschritt (Verdünnung je 1:1000) wurde mehrfach durchgeführt, so dass eine Verdünnungsreihe des Ausgangssputums bis zum Faktor 10^9 hergestellt werden konnte. Je 92 μ l der unterschiedlich verdünnten Proben wurden anschließend mittels eines Spiral Platers (spiral plater model c, Spiral Systems, Cincinnati, USA) auf je einer Endo-Platte (Selektion der gram-negativen Keime) und einer CNA-Platte (Selektion der gram-positiven Keime) ausplattiert, um die Quantifizierung eines breit gefächerten Keimspektrums zu ermöglichen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h in einem Brutschrank bei 37 °C konnten die Kolonien schließlich ausgezählt werden. Hierfür wurde die Platte mit der stärksten Verdünnung ausgewählt, die noch zählbare Kolonien beinhaltete, um die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) zu bestimmen. Die Gesamtzahl an KBE pro ml wurde unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors der Probe berechnet.

2.2.4.2 MIKROBIOLOGISCHE KEIMIDENTIFIZIERUNG

Unter Verwendung üblicher mikrobiologischer Methoden zur Bestimmung von Bakterien wie Morphologie, Oxidase-Test, Staph-Test konnten die Kolonien ihrer jeweiligen Art zugeordnet werden.

Besonderes Augenmerk der Auswertung galt der genauen Bestimmung der *P. aeruginosa* Kolonienanzahl im Sputum zu ausgewählten Studienzeitpunkten. Gleichzeitig wurden auch andere pathologisch auftretende Keime identifiziert und quantifiziert. Im Rahmen der Studie wurden folgende Erreger in die Bewertung einbezogen:

Pseudomonas aeruginosa

Morphologisch bilden die gramnegativen Stäbchen oftmals metallisch glänzende kleine Kolonien, die farblich von rosarot über gelblich-grün bis lila aufgrund der Eigenschaft zur Pigmentbildung variieren können. Charakteristisch fällt ein lindenblütenartiger süßlicher Geruch des Keims auf. Häufig produzieren die Bakterienkolonien eine Schleimschicht, die durch die Mutation eines

Glycoproteins entsteht und typischerweise bei Patienten mit CF auftauchen. Der Oxidase-Test (Nachweis der Cytochrom-C-Oxidase der Atmungskette) führt zu einer positiven Reaktion und ermöglicht so die Differenzierung zu morphologisch ähnlichen Keimen (Kayser et al., 2005).

Staphylococcus aureus (incl. MRSA)

Der *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) wächst in traubenförmigen Kolonien auf bluthaltigen Nährböden und zeigt eine negative Oxidase-Reaktion (Kayser et al., 2005).

Mycobacterium abscessus

Es gehört zur Gruppe der nichttuberkulösen Mykobakterien und zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum im Vergleich zu anderen nur schwer anzüchtbaren *Mycobacterium species* aus ("rapid grower"). Das grampositive Bakterium kann auf Löwenstein-Jensen-Agar weißlich bis graue Kolonien bilden (Kayser et al., 2005).

Achromobacter denitrificans

Es handelt sich um gramnegative, stäbchenförmige Bakterien, die im Katalase- und Oxidase-Test positiv sind. *Achromobacter denitrificans* können sowohl unter aerobe als auch anaeroben Bedingungen existieren (Kayser et al., 2005).

Stenotrophomonas maltophilia

Charakteristisch sind die gelblich bis cremefarbenen Kolonien auf geeigneten Nährmedien. Die Oxidase-Reaktion ist wiederum negative (Kayser et al., 2005).

E. coli (ESBL)

Das sind gramnegative, gerade Stäbchen, die Laktose rasch abbauen. Die Anzucht erfolgt z.B. auf Endo-Agar, der Keim entwickelt dann einen charakteristischen Metallglanz (Kayser et al., 2005).

Aspergillus flavus und Aspergillus fumigatus

Sie weisen ein typisches Wachstum in Myzelform auf den meisten gebräuchlichen Medien auf. Eine selektive Kultivierung kann mittels Sabouraud-Agar durchgeführt werden. Im Mikroskop sind filamentöse, septierte, Y-förmige Hyphen charakteristisch (Kayser et al., 2005).

Candida albicans

Candida albicans ist auf üblichen Nährmedien zu kultivieren, und nach einer Inkubationszeit von ca. 48 h bilden sich runde, weißliche Kolonien mit einer diskret angerauten Oberfläche. Zur weiteren Differenzierung können morphologische und biochemische Merkmale beitragen (Kayser et al., 2005).

2.2.5. LEUKOZYTENMESSUNG

Die Leukozytenwerte wurden im verdünnten Sputum mit Hilfe einer hämatologischen Messeinheit (ADVIA 120, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, USA), unmittelbar nach Erhalt der Probe im Labor, gemessen.

2.3. DATENAUSWERTUNG UND STATISTISCHE ANALYSE

Für die vorliegende Phase-I-Studie war aufgrund fehlender Effektivdaten keine biometrische Planung möglich, so dass das primäre Ziel der Studie die Sicherheit der NO-Therapie war. Alle Parameter wurden somit deskriptiv ausgewertet. Der t-Test (bei Normalverteilung) oder der Wilcoxon-Test wurde an geeigneten Stellen angewendet. Die statistische Auswertung wurde als Intention-to-treat-Analyse (ITT) und als Per-Protocol-Analyse (PP) beschrieben. Die Sicherheit der Therapie wurde mittels Intention-to-treat-Analyse bei allen Patienten bewertet. Die Auswertung der Effizienz der Therapie wurde einmal über die ITT bestimmt und außerdem in der PP. Die PP schließt alle Patienten ein, die acht von zehn Tagen die Studientherapie erhielten, mindestens zwei von drei NO-Inhalationen täglich durchführten und die Therapie ohne Einschränkung durchführen konnten. Für die Bewertung der PP sind die Daten von mindestens sechs Patienten laut Vorberatung durch das BfArM vorausgesetzt worden.

3. ERGEBNISSE

3.1 PATIENTEN

Die Durchführung der Studie als prospektive, offene, klinische Phase I Studie erfolgte über 7 Monate. Insgesamt 8 Patienten inhalierten Stickstoffmonoxid (Konzentration von 160 ppm) dreimal täglich für 30 Minuten über zweimal 5 Tage.

Tabelle 2: Demographische Daten und Patientenprofile

Merkmal	Anzahl
Patienten – no.	8
Weibliches Geschlecht – no. (%)	2 (25)
Alter [Jahren] ^a	34.6 ± 7.5
Gewicht [kg] ^a	59.1 ± 8.3
Blutdruck [mmHg], systolisch – diastolisch ^a	119 ± 9 – 74 ± 8
Herzfrequenz [Schläge/min] ^a	77 ± 7.5
Pankreasinsuffizienz – no. (%)	7 (87.5)
<i>P. aeruginosa</i> , nicht mukoid – no.	8
<i>P. aeruginosa</i> , mukoid – no.	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> – no.	1
<i>Staphylococcus aureus</i> – no.	2
Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i> – no.	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> – no.	1
<i>Aspergillus flavus</i> – no.	1
<i>Candida albicans</i> – no.	2
<i>Mycobacterium abscessus</i> – no.	2
<i>E. coli</i> ESBL – no.	1
<i>Achromobacter denitrificans</i> – no.	1

^a Mittelwerte ± SD; no = Anzahl

3.2 SICHERHEIT DER THERAPIE MIT NO

Im Verlauf der Studie traten keine schweren unerwünschten Nebenwirkungen auf, die das Beenden der Studie veranlasst hätten. Darüber hinaus musste kein Patient die Therapie mit NO vorzeitig beenden. Es traten insgesamt sieben unerwünschte Nebenwirkungen auf. Davon waren vier als vorübergehende Mundtrockenheit (Xerostomie) beschrieben, welche durch die Inhalation der Studienmedikation über den Mund hervorgerufen wurde. Zwei der Studienpatienten entwickelten ein medikamenten-unspezifisches, unerwünschtes Ereignis im Sinne eines nicht fieberhaften, grippalen Infektes der oberen und unteren Atemwege mit Husten. Bei beiden Patienten war eine antibiotische Therapie unter klinischen Gesichtspunkten nicht indiziert. Da virale Infekte in aller Regel kaum eindeutig identifizierbar sind und eine therapeutische Konsequenz in den beiden Fällen nicht vorhanden war, wurde auf eine molekulargenetische Diagnostik (z.B. PCR) verzichtet. Ein Patient hatte während des Therapieintervalls eine Gastroenteritis, welche keinen Bezug zur Studienmedikation hatte. Die gastrointestinale Symptomatik des Patienten begann an Tag 7 des Studienbeginns, und der Patient gab an, dass die Infektion im Zusammenhang mit einer Mahlzeit stehen würde. Die Therapie mit NO wurde für zwei Tage zurückgestellt und anschließend erfolgreich beendet. Die Werte des MetHb stiegen bei 7 von 8 Patienten um weniger als 3,0 % während der 30-minütigen Inhalationsphase an und sanken im Anschluss an die Therapie nach 3,5 h auf den Ausgangswert ab. Bei einer weiblichen Studienteilnehmerin erreichte das MetHb bei jeder Inhalationsphase mit NO bereits nach 25 Minuten den Wert von 3,0 %. Dies führte zu einem Beenden der Therapie nach dieser Zeit. Das mittlere gemessene NO₂ lag bei 4,0 ± 0,8 ppm während der Behandlung mit NO. Die Sauerstoffsättigung hielt sich bei allen Patienten über 95 %, wobei konsequent Sauerstoff zugeführt wurde. Der arterielle Blutdruck sank um nicht mehr als 5 % zum mittleren systolischen Ausgangswert, und die Herzfrequenz der Patienten veränderte sich nicht signifikant. Darüber hinaus wurden nach Abschluss der NO-Therapie keine

Veränderungen der Werte für Hämoglobin, die Thrombozyten, die Nieren- und Leberwerte festgestellt.

Tabelle 3: Sicherheit von NO bei CF-Patienten

PARAMETER	VOR	NO	NACH	P-WERT
Systolischer Blutdruck - no. 25 (mmHg)	114.0 ±12.2*	109.2 ±14.4		0.09
Diastolischer Blutdruck - no. 25 (mmHg)	70.5 ±7.8	69.9. ±8.3		0.38
Herzfrequenz - no. 228 (Schläge/min)	89.2 ±17.1	88.5 ±15.6		0.31
NO₂ - no. 228 (ppm)	0	4.0 ±0.8		<0.001
MetHb	0.6 ±0.4	2.7 ±0.4		<0.001
MMEF - no. 92 (%)	28.9 ±16.2	28.5 ±16.5		0.49
Leukozyten - no. 8 (1/µl)	10269 ±4768	10269 ±4105	11095 ±3486	0.70
Neutrophile Granulozyten - no. 8 (%)	72.5 ±8.5	76.5 ±6.8	72.5 ±8.8	1.0
Thrombozyten (1000/µl)	307 ±51	328 ±54	342 ±57	0.21
Kreatinin (mg/dl)	0.7 ±0.1	0.8 ±0.2	0.8 ±0.2	0.46
AST (U/l)	24.9 ±5.3	25.9 ±8.6	25.1 ±4.5	0.92
ALT (U/l)	25.5 ±8.5	26.3 ±10.3	26.4 ±9.7	0.85
CRP (mg/dl)	1.2 ±0.9	1.2 ±1.3	1.5 ±1.6	0.64
IgG (g/d)	13.3 ±4.4	13.1 ±5.9	14.3 ±4.6	0.67

* : Mittelwerte ± SD; der T-test wurde bei allen statistischen Auswertungen angewandt.
 NO₂: Stickstoffdioxid; MetHb: Methämoglobin; MMEF: (Mittlerer) Maximaler expiratorischer Fluss; AST: Aspartataminotransferase; ALT: Alaninaminotransferase;
 CRP: C-reaktives Protein; no.: Anzahl der gemessenen Parameter

3.3 BAKTERIELLE UND MYKOTISCHE BESIEDLUNG

Die Intention-to-treat-Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der koloniebildenden Einheiten (KBE) aller während der Studie betrachteten Bakterien (\log_{10} KBE: vor Inhalation von NO: $7,4 \pm 2,7$; nach Inhalation von NO: $3,8 \pm 1,7$; $p = 0,0008$) und aller auftretenden Pilze (\log_{10} KBE: vor Inhalation von NO: $5,6 \pm 3,1$; nach Inhalation von NO: $2,6 \pm 2,4$; $p = 0,0019$). Die Behandlung mit NO führte zu einer Reduktion der KBE bei zahlreichen Bakterien und Pilzen um mehrere Zehnerpotenzen: *P. aeruginosa* um 3,5, *E. coli* um 12, *S. maltophilia* um 3, *S. aureus*, inklusive des *Methicillin-resistenten S. aureus (MRSA)* um 1, *A. denitrificans* um 2, *M. abscessus* um 4,5, *C. albicans* um 2,5, *A. fumigatus* und *A. flavus* um 2,5.

Der *extended broad spectrum β -lactamase (ESBL)-produzierende E. coli* und beide *Aspergillus species* waren im Anschluss an die Therapie mikrobiologisch nicht mehr nachweisbar. In der Zusammenschau bestätigen diese Ergebnisse, dass die dreimal täglich durchgeführte Therapie mit 160 ppm NO an zweimal 5 Tagen eine antimikrobielle Aktivität aufweist, die sogar eine Wirksamkeit gegen multiresistente Mikroorganismen erkennen lässt.

Tabelle 4: Sekundärparameter – Ausgangswerte und Werte nach Abschluss der Behandlung (Intention-to-treat (ITT)- und Per-Protocol (PP)-Analyse)

PARAMETER	ITT (N = 8)			PP (N = 6)		
	VOR	NACH	P-WERT	VOR	NACH	P-WERT
FVC [%]	63.3	75.6	0.012	64.9	78.5	0.028
	±13*	±14.6		±8.4	±10.8	
FEV₁ [%]	49.9	58.7	0.012	51.2	62.2	0.028
	±11.2	±14.3		±9.0	±11.4	
MEF₂₅₋₇₅ [%]	28.6	36.7	0.036	26.1	36.7	0.046
	±15.6	±18.6		±11.5	±13.4	
LEUKOZYTEN IM SERUM [x10³/µL]	10.81	11.1	0.36	10.86	11.22	0.37
	±4.2	±3.5		±4.4	±3.4	
NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IM SERUM [%]	73.0	72.5	0.41	73.8	74.2	0.45
	±8.2	±8.2		±8.8	±8.8	
CRP [mg/dl]	2.72	1.54	0.24	3.15	1.12	0.17
	±3.8	±1.6		±4.4	±1.1	
IgG [g/l]	13.3	14.3	0.12	12.6	12.8	0.34
	±4.4	±4.6		±3.8	±4.1	
LEUKOZYTEN IM SPUTUM [x10³/µl]	62.2	20.9	0.01	62.2	19.5	0.03
	±47.7	±13.5		±45.4	±10.2	
NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IM SPUTUM [%]	40.8	26.6	0.0001	43.7	28.2	0.0002
	±17.4	±16.1		±13.8	±16.2	

* : Mittelwert ± SD. FVC: Forcierte Vitalkapazität; FEV₁: Einsekundenkapazität; MEF: Maximaler expiratorischer Fluss; CRP: C-reaktives Protein; IgG: Immunoglobulin G; Der P-Wert wurde mittels Wilcoxon-Test bestimmt.

3.4 Forcierte Einsekunden Vitalkapazität (FEV₁)

In der ITT-Analyse stiegen die FEV₁-Werte im Mittel absolut und relativ zum Ausgangswert um $8,8 \pm 4,9 \%$ und $17,3 \pm 8,9\%$ an ($p = 0,012$), vergleiche Abbildung 6C. Die PP-Analyse betrachtend stiegen die Werte der FEV₁ absolut und relativ zum Ausgangswert um $10,9 \pm 3,4 \%$ und $21,4 \pm 5,7 \%$ ($p = 0,028$), siehe Tabelle 4 auf Seite 34. Ein Anstieg der FVC absolut und relativ zum Ausgangswert konnte in der ITT-Analyse mit $12,4 \pm 5,1 \%$ und $20,1 \pm 8,4 \%$ ($p = 0,012$) festgestellt werden. In der PP-Analyse ergaben sich diese Werte: $13,6 \pm 5,4 \%$ und $21,0 \pm 8,7 \%$ ($p = 0,028$). Der maximale expiratorische Fluss 25-75 (MEF₂₅₋₇₅) verbesserte sich in der ITT-Analyse absolut und relativ zum Ausgangswert um $8,1 \pm 8,3\%$ und $33,4 \pm 50,4\%$ ($p = 0,036$) und in der PP-Analyse um $10,7 \pm 6,8\%$ und $49,2 \pm 46\%$ ($p = 0,046$), vergleiche Tabelle 3 auf Seite 32. Diese Ergebnisse zeigen das mögliche Potential einer Therapie mit NO für CF-Patienten. Die Verbesserung der Lungenfunktion kann demnach in einem Ausmaß beobachtet werden, welches mit den zahlreichen antibiotischen Therapiestrategien selten erreicht werden konnte.

Die Therapie mit NO konnte die in der Lunge ablaufende Inflammation herabsetzen, wie die Anzahl der gemessenen Leukozyten im Sputum belegt (Tabelle 3). Dennoch wurden keine Veränderungen im Vergleich der Entzündungsparameter im Blut (Leukozyten, neutrophile Granulozyten, CRP und IgG) vor und nach der Therapie gesehen.

Zusammenfassend deuten die Daten der Studie darauf hin, dass Stickstoffmonoxid eine neue Therapieoption für CF-Patienten darstellen könnte, da es die mikrobiologische Keimbelastung verringert, die Entzündungsaktivität in der Lunge herabsetzt und in der Folge eine Verbesserung der Lungenfunktion herbeiführt.

Abb. 6: NO senkt die Anzahl der Bakterien und Pilze in den Atemwegen von CF-Patienten und verbessert die Lungenfunktion

Abb. 6A

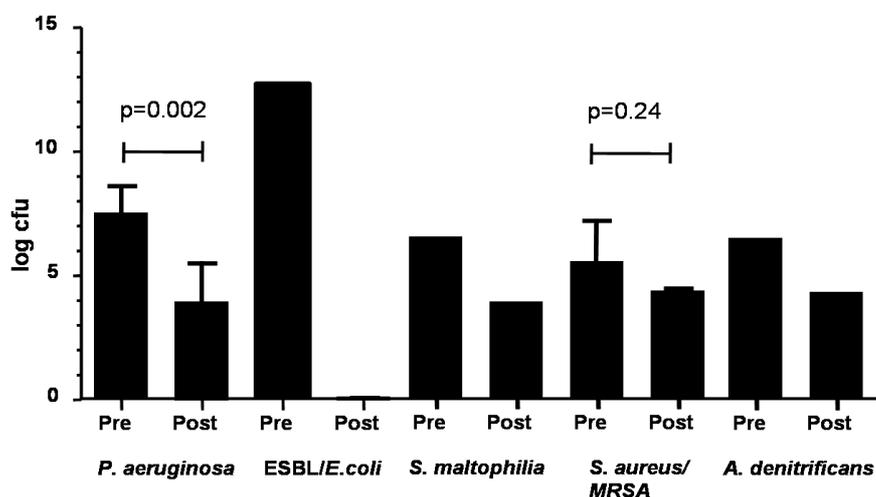


Abb. 6B

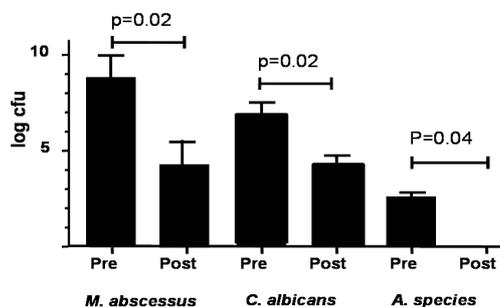
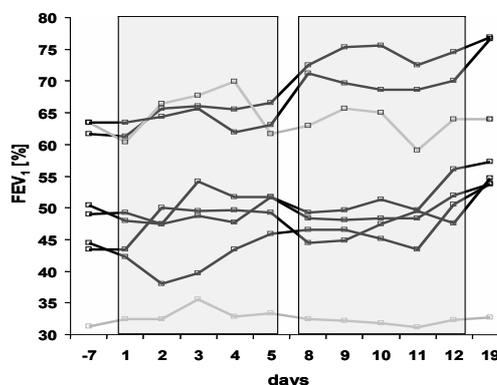


Abb. 6C



Die Bakterien im Sputum von 8 CF-Patienten wurden vor und nach den NO-Inhalationen quantifiziert. Hierfür wurden standardisierte Verdünnungsmethoden angewandt und bakterienspezifische Nährmedien verwendet. **A**, Bakterien. **B**, *Mycobacterium abscessus* und Pilze. Die p-Werte wurden mittels t-Test ermittelt, sobald mehr als 2 Keime im Sputum eines Patienten der 8 Patienten nachweisbar waren. "Pre" entspricht den Werten vor NO-Inhalation, "post" den Werten nach der NO-Therapie. **C**, Die Einsekundenkapazität (FEV₁) wurde bei den Patienten mittels Spirometrie bestimmt. Die NO-Inhalation mit 160 ppm fand dreimal täglich an zweimal 5 Tagen statt. Die grau markierten Felder zeigen die Dauer der NO-Inhalation. Die grauen Linien stellen die Verläufe der Patienten dar, die während der Therapiephase virale Atemwegsinfektionen entwickelt haben.

Adaptiert aus (Riethmueller et al., 2015)

4. DISKUSSION

Die durchgeführte Phase-I-Studie beschäftigte sich als erste am Patienten durchgeführte Studie mit der prinzipiellen Durchführbarkeit und Sicherheit von intermittierender Inhalation von 160 ppm NO bei Patienten mit CF. Die erste Studie dieser Art führte zu dem Ergebnis, dass diese Form der Therapie sicher ist und somit ein definiertes Ausmaß an unerwünschten Nebenwirkungen ausblieb. Des Weiteren konnte eine relevante Reduktion der Bakterien und Pilze im Sputum der behandelten Patienten nachgewiesen werden. Bemerkenswert war der signifikante Rückgang der Entzündungsprozesse in der Lunge und die signifikante Zunahme der Lungenfunktion unter der intermittierenden NO-Therapie.

Diese Beobachtungen bezüglich der Sicherheit und Durchführbarkeit von mehrfachen täglichen Inhalationen mit 160 ppm NO über je eine Dauer von 30 Minuten stimmen mit den Untersuchungen von Miller et al. bei einer Gruppe von gesunden Erwachsenen überein (Miller et al., 2012).

In der Vergangenheit durchgeführte *in vitro* Studien haben eine Vielzahl an verschiedenen Stickstoffmonoxid (NO)-Donoren oder gasförmiges NO verwendet und bewiesen, dass NO eine antimikrobielle Aktivität gegen ein großes Spektrum an Bakterien, Viren, Würmern und Parasiten besitzt (Miller et al., 2009, De Groote and Fang, 1995). Auch eine Wirksamkeit gegen den mukoiden Stamm des *P. aeruginosa*, der in den Biofilmen der Atemwege von CF-Patienten vorkommt, konnte nachgewiesen werden (Yoon et al., 2006).

Sowohl grampositive als auch gramnegative Keime sind durch gasförmiges NO angreifbar. Selbst der *Methicillin-resistente S. aureus* zeigte eine Sensibilität gegenüber den reaktiven NO-Nebenprodukten (Ghaffari et al., 2006), von welchen die antibakterielle Wirkung hauptsächlich ausgeht (Fang, 1997).

Die molekularen Mechanismen dieses reaktionsfreudigen Gases beinhalten die Interaktion mit DNA-Reparaturmechanismen, die Bindung an die Häm- oder Thiolgruppe von Proteinen und die Zerstörung von Lipidbestandteilen der Membranen (Fang, 1997, Vazquez-Torres et al., 2008). Diese und andere

Mechanismen werden als ein wesentlicher Faktor für die potente bakterizide Wirksamkeit von NO gesehen. Darüber hinaus ist Stickstoffmonoxid an der Modulation der körpereigenen Immunantwort beteiligt, indem Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Epithelzellen durch die Anwesenheit von NO aktiviert werden und somit immunmodulatorische Prozesse in Gang gesetzt werden (Vazquez-Torres et al., 2008, Fang, 1997). Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, da Makrophagen und besonders neutrophile Granulozyten einen wichtigen Bestandteil der körpereigenen Abwehrprozesse gegen Bakterien darstellen. Miller et al. konnten bereits an einem Ratten-Modell zeigen, dass die inhalative Verabreichung von 160 ppm NO bakterizid gegen eine akute *P. aeruginosa* Pneumonie wirkt (Miller et al., 2013) und weder toxische noch mutagene Effekte auf eine humane Zelllinie aufweist (Ghaffari et al., 2006). So stellte sich die Frage, ob diese Art der Therapie eine Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit bakteriellen Lungeninfektionen darstellen könnte.

NO ist bereits ein zugelassenes Medikament für Neugeborene in einer Konzentration von ca. 20 ppm und kann über Wochen kontinuierlich verabreicht werden (Therapeutics, 2013). Eine antimikrobielle Aktivität von NO wurde in der Vergangenheit bei diesen niedrigen Konzentrationen jedoch nicht beobachtet. Der Anstieg des Methämoglobin-Wertes im Blut ist die wohl meist aufgetretene signifikante Nebenwirkung, die mit der inhalativen NO-Therapie in Verbindung steht. Hohe Werte des MetHb im Blut von Patienten, welche meist eine bereits reduzierte Oxygenierungsfähigkeit aufgrund ihrer krankheitsbedingt vorgeschädigten Lunge vorweisen, können zu relevanten Hypoxien führen. Die kontinuierliche, also dauerhafte Inhalation von nur 60-80 ppm NO führt bereits zu einem Anstieg des MetHb Wertes auf bis zu 12 % (Therapeutics, 2013).

Der klinischen Studie vorrausgehende Untersuchungen beinhalteten folgende wichtige Informationen:

Die Halbwertszeit von NO wird im menschlichen Organismus auf 60 Minuten geschätzt. NO wird von der MetHb-Reduktase in Nitrite und Nitrate verstoffwechselt und schlussendlich über den Urin ausgeschieden. Die Entstehung von MetHb ist pharmakokinetisch bedingt, und es konnte

nachgewiesen werden, dass der Anstieg des MetHb während der Inhalation von 160 ppm NO bei ungefähr 1 % liegt. Diese Erhebungen konnten somit sicherstellen, dass NO über je 30 Minuten alle 4 Stunden kontinuierlich verabreicht werden kann, ohne die MetHb-Werte über 3 % ansteigen zu lassen. Außerdem wird 30 Minuten nach NO-Applikation der Ausgangswert für MetHb wieder erreicht (Miller et al., 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen diese Hypothese. Die Werte für MetHb blieben bei allen, außer einer Patientin, unter 3 %. Bei dieser einen Patientin wurde der Wert von 3 % MetHb bereits nach 25-minütiger Inhalation erreicht. Eine Begründung für diese Beobachtung ist bisher unklar. Ob es möglicherweise geschlechtsspezifische Unterschiede gibt, ist nicht geklärt.

Zweifelsohne würde die Inhalation von 160 ppm NO über einen längeren Zeitraum zu toxischen Werten an NO₂ führen (Hurford, 2005), eine Methämoglobinämie und nicht tolerierbare Hypoxämien verursachen. Die intermittierende NO-Inhalation könnte jedoch eine nebenwirkungsarme Alternative zur kontinuierlichen Therapie darstellen. Diese Art der NO-Therapie, welche Pausen von 3,5 Stunden vorsieht, um die MetHb und NO₂ Werte auf das Ausgangsniveau zu senken, erwies sich in einer Studie mit 10 gesunden Probanden auch nach mehrfachen Behandlungszyklen als sicher (Miller et al., 2012).

Von insgesamt sieben aufgetretenen unerwünschten Ereignissen waren vier eine vorübergehende Mundtrockenheit, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Studienmedikation bedingt war. Diese Nebenwirkung wurde auch schon in einer früheren NO-Studie an gesunden Erwachsenen beobachtet und am ehesten durch die 30 Minuten andauernde Applikation über ein Mundstück begründet (Miller et al., 2012).

NO₂ und NO sind freie Radikale, die Schleimhautirritationen und Schädigungen am Lungengewebe verursachen können (Therapeutics, 2013). Das Ausmaß dieser Entzündung kann indirekt im Blut und Sputum der Patienten gemessen werden. Dafür können an der Entzündungskaskade beteiligte Zytokine und

Chemokine wie die Myeloperoxidase, TNF-alpha, IL-6 und IL-8 bestimmt werden. Des Weiteren kann eine akute Entzündung auch nach klinischen Parametern beurteilt werden. Hierbei können die Anzahl an Hustenanfällen und vor allem aussagekräftige Lungenfunktionstests mögliche klinische Parameter sein. Sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Studie an der gesunden Kohorte wurden klinische Untersuchungen und Messungen weiterer klinischer Parameter vor und nach der NO-Inhalation erhoben, jedoch bisher nicht weiter ausgewertet. Möglicherweise könnte eine akute Entzündungsreaktion durch die bronchodilatative Wirkung von NO verschleiert worden sein. Sollten zukünftige Studien darauf abzielen, eine NO-Therapie über mehr als 30 Tage zu verabreichen, sollte eine langfristige Überwachung der Lungenfunktion in Betracht gezogen werden.

In der hier vorliegenden Phase-I-Studie bestätigte sich nun, dass die intermittierende, inhalative Therapie mit hochdosiertem NO sicher ist und sich auch für CF-Patienten eignet. Keiner der teilnehmenden CF-Patienten musste die NO-Therapie aufgrund von Nebenwirkungen beenden. Lediglich bei einer weiblichen Studienteilnehmerin wurde, wie erwähnt, der Grenzwert für MetHb von 3,0 % bereits nach 25 Minuten erreicht.

Obwohl die Studie nicht auf weitere Endpunkte ausgelegt war, konnte überzeugend nachgewiesen werden, dass die Inhalation von 160 ppm NO eine signifikante Reduktion der Keimzahlen von zahlreichen Bakterien und Pilzen im Sputum der Patienten erreicht. Diese Tatsache ist besonders erwähnenswert, da die antimikrobielle Wirkung selbst bei Bakterien, die intrinsische oder erworbene Resistenzmechanismen aufweisen (*ESBL-produzierende E.coli*, *M. abscessus* und *Aspergillus species*), festzustellen war.

Die eindruckliche Reduktion der Bakterienlast führte folglich zu einer herabgesetzten Entzündungsaktivität in der Lunge, und die Patienten zeigten einen Anstieg des Lungenfunktionsparameters FEV₁ vom Ausgangswert auf einen Wert, der nach einer antibiotischen Therapie nur sehr selten zu beobachten ist (Regev-Shoshani et al., 2013b, Regev-Shoshani et al., 2013a).

Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass der Zeitraum der NO-Therapie frei von jeglicher antibiotischen Therapie der Patienten war.

Antibiotika entfalten ihre Wirkung an gezielten Strukturen im Organismus von Bakterien. NO hingegen hat zahlreiche Wirkweisen und weniger spezifische Zielstrukturen, die nicht auf bestimmte Organismen beschränkt sind. Als körpereigenes Substrat wirkt NO bereits im gesunden Organismus bakterizid und viruzid (Ghaffari et al., 2006). Die nicht auf eine bestimmte Struktur gerichteten Effekte beruhen auf oxidativen und nitrosylierenden Eigenschaften des Gases und seiner Reaktionsprodukte. NO greift die für Mikroorganismen essentiellen Stoffwechselproteine an, indem diese Proteine an ihren Häm- oder Thiolgruppen verändert werden (Regev-Shoshani et al., 2013b, Regev-Shoshani et al., 2013a).

In Zahlen führt NO bei allen Bakterien, Viren und Pilze zu einer schädigenden Wirkung. Diese Reaktion liegt wahrscheinlich in der nitrosylierenden Eigenschaft von NO begründet, die neben einer komplexen Immunmodulation eine Interaktion mit der RNA-Replikation und DNA-Reparaturmechanismen verursacht. Außerdem entstehen Veränderungen in der Zellstruktur und -funktion (Miller et al., 2013, De Groote and Fang, 1995, McMullin et al., 2005, Miller et al., 2007).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die gepulste, hochdosierte Inhalation von Stickstoffmonoxid eine neue Therapiestrategie darstellen könnte, um die Therapie der chronischen, bakteriellen und mykotischen Lungeninfektionen bei CF-Patienten zu verbessern. Auch Patienten mit anderen Grunderkrankungen, die an Lungeninfektionen leiden oder für diese prädestiniert sind, wie beispielsweise Infektionen mit Mykobakterien, COPD oder beatmungsassoziierte Pneumonien, könnten in ähnlicher Weise von dieser neuen Art der Therapie profitieren. Antibiotika-resistente Mikroorganismen sind mittlerweile die Ursache von ca. 70 % aller tödlich verlaufenden nosokomialen Infektionen, und die Nachfrage nach neuen, antibakteriellen Therapien ist in Anbetracht der zunehmenden Gefahr, die von multiresistenten Mikroorganismen ausgeht, hoch (Hetrick et al., 2008).

Darüber hinaus könnte die NO-Therapie unerwünschte Nebenwirkungen - hervorgerufen durch häufige Antibiotikatherapien - verringern. Eine Verbesserung der Lebensqualität, Prognose und Lebenserwartung der betroffenen Patienten könnte angestrebt werden. Außerdem würde über die Etablierung einer komfortablen Heimtherapie die Summe der Kosten für zahlreiche Behandlungen und Krankenhausaufenthalte möglicherweise reduziert werden.

Zeigt sich die hochdosierte und gepulste Therapie mit NO als effektiv und sicher für die Patienten, könnte sich in Zukunft eine neue Strategie in der Bekämpfung von chronischen Bakterien- und Pilzinfektionen bei CF-Patienten ergeben. Auf diesem Weg sind jedoch noch zahlreiche weitere Schritte zu realisieren. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie ist es wünschenswert, dass weitere Studien beispielsweise zur Feststellung der optimalen Therapie- und Erhaltungsdosis zugesichert, geplant und durchgeführt werden können. Es müsste zudem der Frage nachgegangen werden, wie lange die Wirkung von NO nach der Therapie einen anhaltenden und gleichzeitig therapeutisch relevanten Effekt zeigt. Vor allem auch die bisher nur stationär durchgeführte Applikation und an ein stationäres Setting gebundene Applikationsvorrichtung fordert eine Weiterentwicklung, um eine Durchführung der Therapie auch in der häuslichen Umgebung der Patienten zu ermöglichen. Dies ist gerade deshalb wichtig, da sich im Rahmen der Studie ergab, dass die hohen NO-Konzentrationen durch eine gepulste Therapie, d.h. mehrmals täglich, sicher und gut verträglich sind. Des Weiteren könnte erarbeitet werden, ob die Pharmakodynamik des Gases eine zweimal tägliche Applikation von NO zulassen würde. Auf dem Feld der Pharmakologie sind bei Etablierung einer NO-Therapie auch die langfristig möglichen Wirkungen auf den Organismus von Bedeutung.

Um die vermuteten Effekte der NO-Therapie zu bestätigen, sollten weitere Studien der Phase II und III durchgeführt werden. Es wäre wünschenswert, die prinzipiell kleine Fallzahl von acht Patienten der vorliegenden Studie in den folgenden Studien zu vergrößern.

Wie oben erwähnt wäre es vorstellbar, die Effekte von einer Therapie mit NO bei anderen Patientengruppen zu überprüfen. Gerade bei Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung könnten infektiöse Exazerbationen, eine die Lebensqualität maßgeblich einschränkende Komplikation der Erkrankung, von dieser Therapieoption Nutzen ziehen. Eine Indikationserweiterung wäre auch für den Bereich der chronischen *Aspergillus*-Besiedlungen bei immunsupprimierten Patienten denkbar. Diese Gedanken machen deutlich, dass die weitere Erforschung der therapeutischen Verabreichung von NO die Bekämpfung von schwer behandelbaren Infektionen revolutionieren könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl die CF eine Multiorganerkrankung ist, stellt die Lungenerkrankung, bedingt durch chronische Infektion mit Problemkeimen, mit 85 % der Mortalität die Haupttodesursache der betroffenen Patienten dar. CF-Patienten erhalten über die gesamte Lebensspanne hinweg eine zunehmende Dosis an Antibiotika, die unter anderem aufgrund vermehrter Resistenzentwicklungen zu rezidivierenden, therapeutisch schwer angehbaren Lungeninfektionen führen.

Stickstoffmonoxid (NO) ist eine im menschlichen Organismus vorkommende Verbindung, die in vitro und in vivo an Tiermodellen eine antimikrobielle Wirkung gegenüber einem großen Spektrum an Mikroorganismen zeigte. Außerdem bewies eine Phase I Studie an gesunden Erwachsenen, dass die intermittierende Applikation von 160 ppm NO sicher ist.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Phase I Studie untersuchte die Sicherheit und Durchführbarkeit einer intermittierenden Inhalation von 160 ppm NO an acht CF Patienten. Hierfür erhielten die Patienten dreimal täglich über eine Zeitspanne von zweimal fünf Tagen 160 ppm NO über eine Dauer von 30 Minuten. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Verabreichung von hochdosiertem NO sicher ist und bei keinem Patienten Nebenwirkungen aufgetreten sind, die zu einer Beendigung der Studie geführt hätten.

Die Intention-to-treat-Analyse ergab im Mittel eine signifikante Reduktion der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) aller untersuchten Bakterien und Pilze. Zudem stieg der Lungenfunktionsparameter FEV₁ im Vergleich zum Ausgangswert um $17,3 \pm 8,9$ % an ($p = 0,012$).

Schlussfolgernd stellt sich die Frage, ob eine NO-Therapie bei CF-Patienten die Behandlung von chronischen bakteriellen Lungeninfektionen verbessern kann. Vor allem eine effiziente Therapie von sogenannten Problemkeimen mit erworbenen oder bestehenden Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika könnte durch die Behandlung mit NO in der Zukunft an Bedeutung gewinnen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AGENCY, E. M. 2013. EPAR - Product information.

ANON 2007. 2006 annual data report to the center directors Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry.

BENDER, K. A., ALEXANDER, J. A., ENOS, J. M. & SKIMMING, J. W. 1997. Effects of inhaled nitric oxide in patients with hypoxemia and pulmonary hypertension after cardiac surgery. *Am J Crit Care*, 6, 127-31.

BOUCHER, R. C. 2004. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, 23, 146-58.

BUNDESVERBAND, C. 2014. *Neugeborenen-Screening* [Online]. Available: http://www.luft-zum-atmen.de/index.php?option=com_content&view=article&id=38&Itemid=30.

COLLINS, F. S. 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256, 774-9.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22.

DARLING, K. E. & EVANS, T. J. 2003. Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis. *Infect Immun*, 71, 2341-9.

DAVIS PB, D. M., KONSTAN MW 1996. Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154.

DE BOECK, K., WILSCHANSKI, M., CASTELLANI, C., TAYLOR, C., CUPPENS, H., DODGE, J., SINAASAPPEL, M. & DIAGNOSTIC WORKING, G. 2006. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 61, 627-35.

DE GROOTE, M. A. & FANG, F. C. 1995. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis*, 21 Suppl 2, S162-5.

DINWIDDIE, R. 2005. Anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 4 Suppl 2, 45-8.

DOCKTER G, L. H., TÜMMLER B, WUNDERLICH P, DITTRICH-WEBER H 1997. *Mukoviszidose (2. Auflage)*, Stuttgart/ New York, Thieme.

DORING, G., CONWAY, S. P., HEIJERMAN, H. G., HODSON, M. E., HOIBY, N., SMYTH, A. & TOUW, D. J. 2000. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*, 16, 749-67.

DORING, G. & WORLITZSCH, D. 2000. Inflammation in cystic fibrosis and its management. *Paediatr Respir Rev*, 1, 101-6.

EMERSON, J., ROSENFELD, M., MCNAMARA, S., RAMSEY, B. & GIBSON, R. L. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 34, 91-100.

FAJAC, I. & SERMET-GAUDELUS, I. 2013. [Cystic fibrosis: new treatments targeting the CFTR protein]. *Rev Mal Respir*, 30, 255-61.

FALAGAS, M. E. & BLIZIOTIS, I. A. 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*, 29, 630-6.

FANG, F. C. 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*, 99, 2818-25.

FOUNDATION, C. F. 2009. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report 2009. Bethesda.

FOUNDATION, C. F. 2011. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report 2011.

GHAFFARI, A., MILLER, C. C., MCMULLIN, B. & GHAHARY, A. 2006. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide*, 14, 21-9.

GHAFFARI, A., NEIL, D. H., ARDAKANI, A., ROAD, J., GHAHARY, A. & MILLER, C. C. 2005. A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. *Nitric Oxide*, 12, 129-40.

GORTNER, L., MEYER, S. & SITZMANN, F. 2012. *Duale Reihe Pädiatrie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

GRASEMANN, H., KURTZ, F. & RATJEN, F. 2006. Inhaled L-arginine improves exhaled nitric oxide and pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 174, 208-12.

HETRICK, E. M., SHIN, J. H., STASKO, N. A., JOHNSON, C. B., WESPE, D. A., HOLMUHAMEDOV, E. & SCHOENFISCH, M. H. 2008. Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *ACS Nano*, 2, 235-46.

HOIBY, N., CIOFU, O. & BJARNSHOLT, T. 2010. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol*, 5, 1663-74.

HOIBY, N., KROGH JOHANSEN, H., MOSER, C., SONG, Z., CIOFU, O. & KHARAZMI, A. 2001. Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect*, 3, 23-35.

HURFORD, W. E. 2005. Nitric oxide as a bactericidal agent: is the cure worse than the disease? *Respir Care*, 50, 1428-9.

IGNARRO, L. J., FUKUTO, J. M., GRISCAVAGE, J. M., ROGERS, N. E. & BYRNS, R. E. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8103-7.

JELSBAK, L., JOHANSEN, H. K., FROST, A. L., THOGERSEN, R., THOMSEN, L. E., CIOFU, O., YANG, L., HAAGENSEN, J. A., HOIBY, N. & MOLIN, S. 2007. Molecular epidemiology and dynamics of Pseudomonas aeruginosa populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun*, 75, 2214-24.

KAYSER, F., BÖTTGER, E., ZINKERNAGEL, R., HALLER, O., ECKERT, J. & DEPLAZES, P. 2005. *Medizinische Mikrobiologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

KELLEY, T. J. & DRUMM, M. L. 1998. Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, 102, 1200-7.

KERR, K. G. & SNELLING, A. M. 2009. Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*, 73, 338-44.

KILIAN, K. & KISIEL, B. M. 2006. [Novel therapeutic possibilities in cystic fibrosis]. *Pol Merkur Lekarski*, 20, 586-90.

LEVY, J. 1986. Antibiotic activity in sputum. *J Pediatr*, 108, 841-6.

LOWENSTEIN, C. J. & SNYDER, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 70, 705-7.

MACMICKING, J., XIE, Q. W. & NATHAN, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15, 323-50.

MCCALLUM, S. J., GALLAGHER, M. J., CORKILL, J. E., HART, C. A., LEDSON, M. J. & WALSHAW, M. J. 2002. Spread of an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain from a patient with cystic fibrosis (CF) to non-CF relatives. *Thorax*, 57, 559-60.

MCMULLIN, B. B., CHITTOCK, D. R., ROSCOE, D. L., GARCHA, H., WANG, L. & MILLER, C. C. 2005. The antimicrobial effect of nitric oxide on the bacteria that cause nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients in the intensive care unit. *Respir Care*, 50, 1451-6.

MENG, Q. H., SPRINGALL, D. R., BISHOP, A. E., MORGAN, K., EVANS, T. J., HABIB, S., GRUENERT, D. C., GYI, K. M., HODSON, M. E., YACOUB, M. H. & POLAK, J. M. 1998. Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis. *J Pathol*, 184, 323-31.

MICKLE, J. E. & CUTTING, G. R. 2000. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am*, 84, 597-607.

MICKLE, J. E., MILEWSKI, M. I., MACEK, M., JR. & CUTTING, G. R. 2000. Effects of cystic fibrosis and congenital bilateral absence of the vas deferens-associated mutations on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated regulation of separate channels. *Am J Hum Genet*, 66, 1485-95.

MILLER, C., MCMULLIN, B., GHAFARI, A., STENZLER, A., PICK, N., ROSCOE, D., GHAHARY, A., ROAD, J. & AV-GAY, Y. 2009. Gaseous nitric oxide bactericidal activity retained during intermittent high-dose short duration exposure. *Nitric Oxide*, 20, 16-23.

MILLER, C., MILLER, M., MCMULLIN, B., REGEV, G., SERGHIDES, L., KAIN, K., ROAD, J. & AV-GAY, Y. 2012. A phase I clinical study of inhaled nitric oxide in healthy adults. *J Cyst Fibros*, 11, 324-31.

MILLER, C. C., HERGOTT, C. A., ROHAN, M., ARSENAULT-MEHTA, K., DORING, G. & MEHTA, S. 2013. Inhaled nitric oxide decreases the bacterial load in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Cyst Fibros*, 12, 817-20.

MILLER, C. C., MILLER, M. K., GHAFARI, A. & KUNIMOTO, B. 2004. Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study. *J Cutan Med Surg*, 8, 233-8.

MILLER, C. C., RAWAT, M., JOHNSON, T. & AV-GAY, Y. 2007. Innate protection of *Mycobacterium smegmatis* against the antimicrobial activity of nitric oxide is provided by mycothiol. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3364-6.

MOSKOWITZ, S. M., CHMIEL, J. F., STERNEN, D. L., CHENG, E., GIBSON, R. L., MARSHALL, S. G. & CUTTING, G. R. 2008. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med*, 10, 851-68.

NAHRLICH, L. & ZIMMER, K. P. 2013. Neonatal cystic fibrosis screening-time to begin! *Dtsch Arztebl Int*, 110, 354-5.

O'SULLIVAN, B. P. & FLUME, P. 2009. The clinical approach to lung disease in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 30, 505-13.

OLIVER, A., CANTON, R., CAMPO, P., BAQUERO, F. & BLAZQUEZ, J. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288, 1251-4.

PARAD, R. B., GERARD, C. J., ZURAKOWSKI, D., NICHOLS, D. P. & PIER, G. B. 1999. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun*, 67, 4744-50.

PRICKETT, M. & JAIN, M. 2013. Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl Res*, 161, 255-64.

RATJEN, F., GARTIG, S., WIESEMANN, H. G. & GRASEMANN, H. 1999. Effect of inhaled nitric oxide on pulmonary function in cystic fibrosis. *Respir Med*, 93, 579-83.

REGEV-SHOSHANI, G., CROWE, A. & MILLER, C. C. 2013a. A nitric oxide-releasing solution as a potential treatment for fungi associated with tinea pedis. *J Appl Microbiol*, 114, 536-44.

REGEV-SHOSHANI, G., VIMALANATHAN, S., MCMULLIN, B., ROAD, J., AV-GAY, Y. & MILLER, C. 2013b. Gaseous nitric oxide reduces influenza infectivity in vitro. *Nitric Oxide*, 31, 48-53.

REINHARDT, D. 2001. *Cystische Fibrose*, Berlin, Springer.

RIETHMUELLER, J., DEPPISCH, C., HERRMANN, G., GRAEPLER-MAINKA, U., WIRTZ, H., HEYDER, S., ENGEL, C., MARSCHAL, M., MILLER, C. & DORING, G. 2015. Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis - a phase I clinical study. *eingereicht 01/15 bei Plos One*.

ROSENSTEIN, B. J. & CUTTING, G. R. 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*, 132, 589-95.

SOSNAY, P. R., CASTELLANI, C., COREY, M., DORFMAN, R., ZIELENSKI, J., KARCHIN, R., PENLAND, C. M. & CUTTING, G. R. 2011. Evaluation of the disease liability of CFTR variants. *Methods Mol Biol*, 742, 355-72.

STAAB, D. 2004. Cystic fibrosis -- therapeutic challenge in cystic fibrosis children. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 1, S77-80.

STONE, A. & SAIMAN, L. 2007. Update on the epidemiology and management of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 13, 515-21.

THERAPEUTICS, I. 2013. *INOMAX nitric-oxide-gas* [Online]. Available: <http://inomax.com/content/delivery-systems-downloads/INOmax-PI-web-2013-03.pdf>.

THOMAS, S. R., KHARITONOV, S. A., SCOTT, S. F., HODSON, M. E. & BARNES, P. J. 2000. Nasal and exhaled nitric oxide is reduced in adult patients with cystic fibrosis and does not correlate with cystic fibrosis genotype. *Chest*, 117, 1085-9.

TUMMLER, B. & STUHRMANN, M. 2003. [Molecular genetics principles in cystic fibrosis. An example of genetic illness in pneumology]. *Internist (Berl)*, 44 Suppl 1, S7-15.

VAZQUEZ-TORRES, A., STEVANIN, T., JONES-CARSON, J., CASTOR, M., READ, R. C. & FANG, F. C. 2008. Analysis of nitric oxide-dependent antimicrobial actions in macrophages and mice. *Methods Enzymol*, 437, 521-38.

WORLITZSCH, D., TARRAN, R., ULRICH, M., SCHWAB, U., CEKICI, A., MEYER, K. C., BIRRER, P., BELLON, G., BERGER, J., WEISS, T., BOTZENHART, K., YANKASKAS, J. R., RANDELL, S., BOUCHER, R. C. & DORING, G. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*, 109, 317-25.

YOON, S. S., COAKLEY, R., LAU, G. W., LYMAR, S. V., GASTON, B., KARABULUT, A. C., HENNIGAN, R. F., HWANG, S. H., BUETTNER, G., SCHURR, M. J., MORTENSEN, J. E., BURNS, J. L., SPEERT, D., BOUCHER, R. C. & HASSETT, D. J. 2006. Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *J Clin Invest*, 116, 436-46.

YOUNG, J. D., DYAR, O., XIONG, L. & HOWELL, S. 1994. Methaemoglobin production in normal adults inhaling low concentrations of nitric oxide. *Intensive Care Med*, 20, 581-4.

YOUNG, J. D., SEAR, J. W. & VALVINI, E. M. 1996. Kinetics of methaemoglobin and serum nitrogen oxide production during inhalation of nitric oxide in volunteers. *Br J Anaesth*, 76, 652-6.

7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. med. Joachim Riethmüller. Er hat die Arbeit betreut, das Manuskript korrigiert und die Patientendaten zur Verfügung gestellt.

Die mikrobiologische Auswertung wurde nach Einarbeitung durch Dr. med. Gloria Herrmann von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Dr. C. Engel von PD Dr. med. Joachim Riethmüller.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch PD Dr. med. Joachim Riethmüller verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 20.01.2015

8. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ausdrücklich und herzlichst bei PD Dr. med. Joachim Riethmüller für die Überlassung des Dissertationsthemas und die zuverlässige Betreuung bedanken. Mit seiner ansteckenden Begeisterung für die Thematik und tatkräftigen Unterstützung hat er einen maßgeblichen Beitrag zum Gelingen der vorliegenden Arbeit geleistet.

Danken möchte ich im Weiteren Dr. rer. nat. Constantin Adams für sein stets offenes Ohr und die unkomplizierte Betreuung während der Arbeit im Labor.

Für die vorbildliche Einarbeitung und ihre Unterstützung danke ich Dr. med. Gloria Herrmann.

Zudem möchte ich mich bei dem Team der CF-Ambulanz für die allzeit hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Spezieller Dank gilt Dr. med. Thorsten Bertsch für seine motivierenden Worte und den unermüdlichen Einsatz das Layout der vorliegenden Arbeit zu optimieren. Für das immer zuverlässige Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Helmut und Gertrud Bertsch.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders, denn sie haben mir diesen Weg überhaupt erst ermöglicht.

Abschließend sei allen Patienten für die bereitwillige Teilnahme an der Studie gedankt. Ohne ihr entgegengebrachtes Vertrauen wäre dieses Projekt nicht zustande gekommen.