

Aus der Medizinischen Klinik – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke
Pneumologie
Leiter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

**Vergleich zweier Antibiotika-Kombinationen bei der Kultivierung
humaner Nasalepithel-Sphäroide von Probanden mit
Mukoviszidose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christoph Kellermann
aus Waldkirchen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dominik Hartl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. F. Gamarra

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2010

Gewidmet

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Kinozilien und mukoziliäre Funktion	1
1.2 Stoffwechselkrankheit Mukoviszidose	2
1.3 Kultivierung respiratorischen Epithels	3
1.4 Möglichkeiten zur Beurteilung der ziliären Funktion	4
1.5 Sphäroide aus humanem respiratorischen Epithel	5
1.6 Fragestellung	6
2 Material und Methodik	7
2.1 Kultivierung der Nasalepithel-Sphäroide	7
2.1.1 Probandenkollektiv	7
2.1.2 Probengewinnung	7
2.1.3 Kultivierung des Zellmaterials	8
2.1.3.1 Kulturmedien	8
2.1.3.2 Zellkultur	9
2.2 Messung und Auswertung	11
2.2.1 Kontrolle und Vergleich der Kultur mit Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin	11
2.2.2 Messung der mukoziliären Funktion	12
2.2.2.1 Anordnung der Messapparatur	12
2.2.2.2 Durchführung des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion	13
2.2.2.3 Messung der Rotationsfrequenz und der Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide	15
2.2.3 Vergleich der Transportgeschwindigkeit der Sphäroide mit der FEV ₁ der Probanden	16
2.2.4 Statistik	16
3 Ergebnisse	18
3.1 Kultur Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/ Tobramycin	18
3.2 Rotationsfrequenz und Geschwindigkeit von Nasalepithel-Sphäroiden	20
3.3 Einfluss von γ -ATP auf die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden und deren Transportgeschwindigkeit an ihrer Oberfläche	21
3.4 Zusammenhang der Geschwindigkeit der Sphäroide mit der FEV ₁	23
4 Diskussion	25
4.1 Diskussion des Materials und der Methodik	25

4.1.1	Antibiotika Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/ Tobramycin	25
4.1.2	Adenosintriphosphat als Stimulans der Rotationsfrequenz der Sphäroide	26
4.1.3	Kultivierungsmethode	28
4.1.4	Sphäroid-Modell.....	29
4.1.5	Aufbau und Durchführung des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion	31
4.2	Diskussion der Ergebnisse	33
4.2.1	Vergleich der Kultur Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/ Tobramycin	33
4.2.2	Rotationsfrequenz und Geschwindigkeit von Nasalepithel-Sphäroiden	33
4.2.3	Einfluss von γ -ATP auf die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden	34
4.2.4	Zusammenhang der Geschwindigkeit der Sphäroide mit der FEV ₁	36
5	Zusammenfassung.....	37
5.1	Ziele der Arbeit	37
5.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	38
5.3	Schlussbetrachtung.....	38
	Literaturverzeichnis.....	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Zellkultur mit 24-Loch-Multiwellplatte und eingesetztem Zellkultur-Insert	10
Abbildung 2: Zusammenlagerung von nasalen Epithelstreifen zu Sphäroiden	11
Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Messung der Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden	13
Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion.....	14
Abbildung 5: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen eines Sphäroids in verschiedenen Phasen einer Rotation.....	15
Abbildung 6: Anzahl der Sphäroide für die Antibiotika-Kombinationen Penicillin/Streptomycin und Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin (Mittelwerte \pm Standardfehler).....	20
Abbildung 7: Verlauf der Rotationsfrequenz der Sphäroide (Mittelwert \pm Standardfehler) vor und nach Stimulation mit 0,5-millimolarem γ -ATP. Der Zeitpunkt der Stimulation lag bei null Minuten. Der Anstieg der Rotationsfrequenz nach der Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,01$; Varianzanalyse mit GEE-Ansatz).....	22
Abbildung 8: Verlauf der Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide (Mittelwert \pm Standardfehler) vor und nach Stimulation mit 0,5-millimolarem γ -ATP. Der Zeitpunkt der Stimulation lag bei null Minuten. Der Anstieg der Transportgeschwindigkeit nach der Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,001$; Varianzanalyse mit GEE-Ansatz)	23
Abbildung 9: Das Molekül Adenosintriphosphat.....	27
Abbildung 10: Das Molekül Adenosine-5'-[γ -thio] triphosphate Tetralithium salt	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Antibiotika und Kontamination der Kulturen (jeweils Anzahl der Inserts).....	18
Tabelle 2: Zusammenhang zwischen Antibiotika und Entstehung von Sphäroiden in den Kulturen (jeweils Anzahl der Inserts).....	19
Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Antibiotika und Entstehung rotierender Sphäroide in den Kulturen (jeweils Anzahl der Inserts).....	19

Abkürzungen

AECGM	Airway Epithelial Cell Growth Medium
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	Ciliary beat frequency
CCD	Charge-coupled device
CF	Cystic fibrosis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
GEE	Generalized estimating equation
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
NCS	Newborn Calf Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Polyethylene terephthalate
RNS	Ribonukleinsäure

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Antibiotika-Kombinationen bei der Kultivierung nasalen Epithels von Probanden mit Mukoviszidose hinsichtlich ihrer Wirksamkeit verglichen. Hierfür wurde nasales Epithel in Form von rotierenden Sphäroiden kultiviert. Ferner wurde an den Nasalepithel-Sphäroiden die mukoziliäre Funktion respiratorischen Epithels und ihre Stimulierbarkeit durch Adenosintriphosphat (ATP) *in vitro* untersucht.

1.1 Kinozilien und mukoziliäre Funktion

In den Epithelien der Atemwege befindet sich ein mehrreihiges Flimmerepithel. Jede Epithelzelle trägt zirka 200 Kinozilien am apikalen Zellpol. Kinozilien oder Zilien sind bewegliche, haarförmige Zellfortsätze [69]. Sie sind 5 bis 7 μm lang und schlagen zirka 25 Mal pro Sekunde. Die Zilien sind von periziliärer Flüssigkeit umgeben, die für den Zilienschlag ein bezüglich Viskosität und Befeuchtung optimales Milieu schafft [4, 64]. Die Schicht der periziliären Flüssigkeit ist etwa so hoch wie die Zilien selbst. Darüber befindet sich eine Schleimschicht. Die Spitzen der Zilien reichen in diese hinein und befördern durch koordinierten Schlag den oberflächlichen Schleimfilm samt der darin gebundenen Partikel in Richtung Pharynx. Der Bewegungsablauf besteht aus einem Vorwärtsschlag in gestreckter Stellung, der den Schleim transportiert, sowie einem Rückwärtsschlag, bei welchem sich die Zilie krümmt und in die Ausgangsposition zurückkehrt. Das mukoziliäre System mit seinem Abtransport von eingeatmeten Partikeln und Krankheitserregern ist somit von grundlegender Bedeutung für die Protektion der Atemwege. Die Frequenz des Zilienschlages weist eine zirkadiane Rhythmik auf. Sie ist am frühen Morgen signifikant höher und nimmt zur Tagesmitte hin ab [68]. Die Schlagfrequenz kann durch verschiedene Substanzen beeinflusst werden. So stimulieren beispielsweise Adenosintriphosphat [Abschnitt 1.8], Purinrezeptoragonisten [35], Katecholamine [12, 40, 42, 65], Prostaglandine [21, 60] und Calcitonin gene-related peptide [59] den Zilienschlag. Andere Substanzen wie Nitrogendioxid [23], Schwefeldioxid [36], Kokain [56], Substanz P [61], Morphin [57] und Lokalanästhetika [9] vermindern die ziliäre Aktivität.

Zudem wurde die Temperaturabhängigkeit des Zilienschlages untersucht; Jorissen und Bessems [33] sowie Gamarra et al. [16] beschrieben eine Zunahme der ziliären Aktivität bei einer Temperatursteigerung bis 40° Celsius beziehungsweise bis 37° Celsius, bei weiterer Steigerung eine Abnahme.

1.2 Stoffwechselkrankheit Mukoviszidose

Bei der Mukoviszidose oder zystischen Fibrose handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erbkrankheit der exokrinen Drüsen, die durch defekte Chloridkanäle in den Epithelzellmembranen gekennzeichnet ist [8]. Das cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms Nr. 7 (7q31.2) lokalisiert. Es sind mehr als 1.000 Mutationen dieses Gens beschrieben, in Westeuropa tritt die Mutation Delta-F-508 mit knapp 70 % am häufigsten auf. Als Folge resultiert ein pathologisches Genprodukt, das CFTR-Protein. Bei diesem Protein handelt es sich um einen fehlerhaften Chloridkanal, der in sämtlichen exogenen Drüsen (Bronchialsystem, Dünndarm, Pankreas, Gallenwege, Gonaden, Schweißdrüsen) zu einer Störung des Ionentransports für Natrium und Chlorid führt, hieraus resultiert eine veränderte Mukoviskosität.

Die Inzidenz liegt bei einem Erkrankungsfall auf 2.000 bis 4.000 Geburten in Mitteleuropa (Heterozygotenfrequenz 4 % der Bevölkerung); es handelt sich somit um die häufigste angeborene Stoffwechselkrankheit der weißen Bevölkerung Europas und der USA.

Die Klinik der Mukoviszidose weist ausgesprochen unterschiedliche Verläufe auf, teilweise bedingt durch die jeweilige CFTR-Mutation.

In den Atemwegen kommt es aufgrund der zähen Schleimablagerungen zu chronischem pertussiformen Husten, rezidivierenden Bronchialinfekten (häufig verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*), Bronchiektasen und obstruktivem Emphysem. Die Verminderung der periziliären Flüssigkeit scheint die mukoziliäre Clearance zu verschlechtern [4]. Die mukoziliäre Clearance gilt aber als angeborener Verteidigungsmechanismus der Bronchien, die Atemwege werden durch die Selbstreinigung vor bakteriellen und anderen Infekten geschützt [44]. Eine Einschränkung der Funktion führt zu vermehrter bakterieller Besiedlung und respiratorischen Infekten [7]. Die Verbesserung der

mukoziliären Clearance und Methoden zu deren Messung spielen als Erfolgsmaßstab in der klinischen Forschung auf dem Gebiet der Zystischen Fibrose eine wichtige Rolle [14].

Als respiratorische Komplikationen der Mukoviszidose treten pulmonale Hypertonie, respiratorische Insuffizienz, Pneumothorax in zirka 10 % der Fälle, Hämoptysen und allergische bronchopulmonale Aspergillose auf.

Des Weiteren kommt es zu distalen intestinalen Obstruktionssyndromen, exokriner Pankreasinsuffizienz mit chronischen Durchfällen und Maldigestionssyndrom. Die Leber und die Galle betreffend treten biliäre Zirrhose und Cholelithiasis auf. Frauen zeigen eine verminderte Fertilität, Männer können wegen einer bilateralen Vas deferens-Obliteration unfruchtbar sein. Die Lebenserwartung beim erwachsenen Patienten wird in erster Linie durch die pulmonalen Komplikationen bestimmt.

1.3 Kultivierung respiratorischen Epithels

Es gibt verschiedene In-vitro-Verfahren zur Kultivierung respiratorischen Epithels, eingeteilt in dissoziierte Zellkultursysteme sowie Methoden, bei denen der Zellverband erhalten bleibt [31, 33].

Beim erstgenannten Verfahren wird das Gewebematerial mit Proteaselösungen behandelt; dies führt zu einer Dissoziation des Zellverbandes. Die Zellsuspensionen werden von Fibroblasten befreit und als Monolayerkultur oder in flüssigen Kulturmedien als Suspensionskultur weiterverwendet. Bei der Suspensionskultur bleiben die Zilien erhalten oder bilden sich nach einem temporären Verlust erneut aus [47]. Bei der Monolayerkultur hingegen geht die Differenzierung des respiratorischen Epithels verloren; die Zellen verlieren ihre Zilien [52]. Werden diese Zellen jedoch in eine Kultur mit so genanntem air-liquid interface überführt, kommt es nach vier bis sechs Wochen zu einer erneuten Ziliogenese, es erscheinen wieder Zilien [20, 29, 30].

Gängige Methoden, bei denen der Zellverband erhalten bleibt, sind Explantat- und Organkulturen. Hierbei werden Gewebeverbände, beispielsweise aus Biopsien oder Operationspräparaten (nasale Polypen), im Ganzen kultiviert, der Zell-Stroma-Verband und die epitheliale Differenzierung bleiben erhalten [1, 9, 17, 38].

Wird das Zellmaterial durch Bürstenabstriche aus nasalem Epithel gewonnen, bleibt der Epithelverband ebenfalls intakt [5]. Bei der Kultivierungsmethode, wie sie in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam und von Gamarra et al. [16] in ähnlicher Weise bereits beschrieben wurde, wird das durch Bürstenabstrich gewonnene Material, bestehend aus einzelnen Nasalepithelzellen sowie Streifen von Nasalepithel mitsamt Schleim, zusammen in Kultur gebracht. Die so entstehende dreidimensionale Form der Zellkultur mit rotierenden Sphäroiden wird in Abschnitt 1.5 genauer beschrieben.

1.4 Möglichkeiten zur Beurteilung der ziliären Funktion

Eine Möglichkeit, die ziliäre Funktion zu beurteilen, ist die Messung der ziliären Schlagfrequenz. Hierfür sind mehrere Methoden etabliert, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

Häufig wird die photometrische beziehungsweise photoelektrische Methode verwendet [3, 13, 27, 33, 54, 56, 57, 60, 66, 68]. Hier kommt ein Mikroskop zum Einsatz, wobei die eingelegte Probe von einer Lichtquelle durchstrahlt wird. Durch den Zilienschlag wird der Lichtstrahl unterbrochen, es kommt zu Variationen der resultierenden Lichtintensität. Diese Änderungen werden mit einem Photodetektor gemessen. Diese Signale werden in elektrische Spannungsimpulse überführt, verstärkt, anschließend auf einem Oszilloskop dargestellt und mittels Fourier-Transformation in das entsprechende Frequenzspektrum umgerechnet.

Alternativ kann der Zilienschlag mittels Mikroskop und einer damit verbundenen Videokamera mit einem Videorekorder (High-Speed-Video-Aufzeichnung) aufgezeichnet werden [21, 22, 36, 52, 55, 71]. Die Messung der ziliären Schlagfrequenz erfolgt durch eine anschließende Auswertung der Videobänder in Zeitlupe. Durch die Videoaufnahmen können zusätzliche Informationen, die Richtung und Form des Zilienschlages betreffend, gewonnen werden.

Daneben finden Kombinationen aus photometrischer Methode und Videotechnik Anwendung, wobei die aus dem Zilienschlag resultierende Änderung der Lichtintensität durch einen Photodetektor vom Videobildschirm erfasst wird und einer Fourier-Transformation unterzogen wird [11, 17, 38, 39, 46].

Die Messung der ziliären Schlagfrequenz von kultiviertem respiratorischem Epithel ohne umgebenden Schleim berücksichtigt aber weder die Koordination des Zilienschlages bezüglich

des Schleimtransports noch die Eigenschaften des Schleimes oder die Interaktion zwischen Zilien und Schleim.

Eine Alternative zur Beurteilung der ziliären Aktivität ist daher die Messung der Geschwindigkeit des Schleimtransports, zum Beispiel als Transportgeschwindigkeit von Partikel, die auf dem respiratorischen Epithel positioniert werden. Hierfür können Farbstoffe [18], radioaktiv markierte Partikel [48, 63] oder – in vivo – auch Geschmacksstoffe [45] verwendet werden. Sphäroide aus respiratorischem Epithel, wie sie im folgenden Abschnitt beschrieben werden, stellen ebenfalls ein Modell zur Messung der Geschwindigkeit des Schleimtransports dar.

1.5 Sphäroide aus humanem respiratorischen Epithel

Corssen und Allen [9, 10] beschrieben erstmals, dass sich aus Fragmenten respiratorischen Epithels in Kulturmedium „little globes“ formten, die wegen ihrer schlagenden Zilien an der äußeren Oberfläche rotierten. Hierfür wurden Gewebeproben aus Biopsien von Trachea und Bronchien in Kulturmedium gegeben.

Bridges et al. [5] berichteten über ein „nonadherent hollow spheroidal epithelial tissue model“, multizelluläre Sphäroide aus humanem nasalen Epithel, gewonnen aus nasalen Bürstenabstrichen. Die Autoren beschrieben traubenartige Zellcluster, die sich nach einigen Stunden in Kulturmedium zu Sphäroiden mit flüssigkeitsgefüllten, zystischen Lumina formten. Weiter erwähnten sie eine Polarität der sphäroidalen Wandzellen mit nach außen weisenden Zilien an der apikalen Membran sowie junktionalen Komplexen an den nach innen weisenden basolateralen Membranteilen. Es zeigte sich ein synchroner Zilienschlag, der zu einer Rotation mit regelmäßiger Geschwindigkeit führte.

Jorissen et al. [32] führten mit Sphäroiden aus respiratorischem Epithel Untersuchungen hinsichtlich der Ultrastruktur der Zilien durch, Neugebauer et al. [47] überprüften die Ziliogenese und Pedersen et al. [49, 50] führten Forschungen zum Membrantransport bei Sphäroiden durch.

Gamarra et al. [16] kultivierten Proben aus nasalen und bronchialen Bürstenabstrichen, bestehend aus respiratorischem Epithel samt anliegendem Schleimfilm. Sie untersuchten mithilfe der entstandenen Sphäroide zum einen die Temperaturabhängigkeit des ziliären Transports.

Zum anderen wurde die Beeinflussbarkeit des ziliären Transports durch Isoproterenol untersucht. Isoproterenol, ein β_2 -Rezeptor-Agonist, führte konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Rotationsfrequenz.

Von Gamarra et al. wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide in der Größenordnung der Transportgeschwindigkeit respiratorischen Epithels beim Menschen in vivo liegt. Somit kann die Geschwindigkeit der im Schleim rotierenden Sphäroide als Äquivalent zur Transportgeschwindigkeit, mit der die Zilien in vivo den Schleim befördern, aufgefasst werden.

1.6 Fragestellung

In einer Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Durchführbarkeit einer Sphäroid-Kultur aus der Nasenschleimhaut von Patienten mit Mukoviszidose untersucht. Die Rotationsfrequenz der Kulturen wurde als Maß für die mukoziliäre Funktion und ihre Stimulierbarkeit mit ATP untersucht. Als Antibiotika für die Zellkultur wurden Penicillin und Streptomycin verwendet. Bei den Probanden mit Mukoviszidose traten – vermutlich aufgrund der chronischen Infektionen in den Atemwegen dieser Patienten – häufig Kontaminationen der Kulturen auf, die zum Absterben der Zellen führten.

Daraus ergab sich die Fragestellung für die vorliegende Arbeit: Es sollte untersucht werden, ob sich durch eine optimierte Antibiotika-Kombination das Resultat der Zellkultur verbessern ließe. Dazu wurde das Zellmaterial aus dem Nasalepithel jedes Probanden aufgeteilt und entweder mit der herkömmlichen Kombination aus Penicillin und Streptomycin oder mit einer Mischung aus Ceftazidim, Vancomycin und Tobramycin kultiviert. Die beiden Arten der Zellkultur wurden hinsichtlich der Kontamination und der Bildung von Sphäroiden respektive rotierenden Sphäroiden verglichen. Weiterhin wurde die basale Rotationsfrequenz der Sphäroide gemessen, daraus die Transportgeschwindigkeit an ihrer Oberfläche errechnet sowie die Stimulierbarkeit mit ATP untersucht.

Ferner wurde ein möglicher Zusammenhang der Rotationsfrequenz der Sphäroide mit dem Wert des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Sekunde (FEV_1) der zugehörigen Patienten überprüft.

2 Material und Methodik

2.1 Kultivierung der Nasalepithel-Sphäroide

2.1.1 Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv rekrutierte sich aus Freiwilligen, die wegen zystischer Fibrose in der Mukoviszidose-Ambulanz für Erwachsene in der Medizinischen Klinik, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München – Campus Innenstadt, als Patienten behandelt wurden. Für den Vergleich der beiden Antibiotika-Kombinationen bestand die Prämisse, nur Patienten einzuschließen, die in den zwei Wochen vor der Entnahme nicht antibiotisch behandelt wurden. Insgesamt nahmen an der Studie acht Patienten teil, drei weibliche und fünf männliche im Alter von 26 bis 42 Jahren (Median 33 Jahre).

2.1.2 Probengewinnung

Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität und mit dem Einverständnis der Probanden. Bei jedem Probanden wurde mit einem Zytologiebürstchen respiratorisches Oberflächenepithel aus beiden Nasenhöhlen entnommen. Dazu wurde das mit 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchloridlösung angefeuchtete Bürstchen lateral in die unteren Nasengänge eingeführt, aus der Hülle geschoben und mehrmals vor- und zurückbewegt. Das so gewonnene Material, bestehend aus Epithelstreifen, Zellen und Schleim, wurde anschließend in ein mit 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchloridlösung gefülltes Röhrchen abgestreift. Dies geschah durch wiederholtes Vorschieben des Bürstchens aus und Zurückschieben in seine Hülle. Anschließend wurde das Material – wie im Folgenden beschrieben – zur Kultivierung weiterbehandelt. Zwischen der

Entnahme und der Anlage der Kultur vergingen in der Regel 15 bis 120 Minuten, einmal auch vier Stunden.

2.1.3 Kultivierung des Zellmaterials

2.1.3.1 Kulturmedien

Zunächst sollen die beiden zu vergleichenden Kulturmedien, die sich in der Zusammensetzung der Antibiotika unterschieden, beschrieben werden. Das Grundmedium setzte sich aus Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECGM) C-21060 mit SupplementMix C-39165 (beides PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und 10 % Newborn Calf Serum (NCS, GIBCO, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland) zusammen.

Dem einen Teil des Mediums wurden Penicillin und Streptomycin (Penicillin-Streptomycin, GIBCO, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland) in einer Endkonzentration von 10 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin sowie Amphotericin B (Fungizone, GIBCO, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben.

Dem anderen Teil des Mediums wurden stattdessen die Antibiotika Ceftazidim, Vancomycin und Tobramycin zugegeben. Sie wurden als Trockensubstanz (Ceftazidimhydrat, Vancomycinhydrochlorid und Tobramycin, von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bezogen, in Phosphate Buffered Saline (PBS, von Dulbecco's, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gelöst (Ceftazidimhydrat: 10 mg/ml; Vancomycinhydrochlorid: 10 mg/ml; Tobramycin: 8 mg/ml) und durch einen Bakterienfilter (Minisart, Porengröße 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) steril filtriert. Dem Medium wurden 100 µg/ml gelöstes Ceftazidim und Vancomycin, 80 µg/ml gelöstes Tobramycin, sowie 1,25 µl/ml Amphotericin B (aufgeführt sind jeweils die Endkonzentrationen) zugefügt.

2.1.3.2 Zellkultur

Jeder der beschriebenen Arbeitsschritte erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einem Arbeitsplatzabzug (Laminar Airflow, Heraeus, Hanau, Deutschland).

Das durch Bürstenabstrich gewonnene Material, bestehend aus nasalem Epithel und Schleim, wurde zunächst in 1,5 ml Penicillin/Streptomycin-Medium gewaschen, indem es vorsichtig in eine mit Medium gefüllte Petrischale pipettiert wurde. Anschließend wurde das Probenmaterial aufgeteilt, um es anschließend entweder mit Penicillin/Streptomycin oder Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin weiterzubehandeln.

Etwa die Hälfte des Materials wurde noch zweimal in 1,5 ml Penicillin/Streptomycin-Medium gewaschen, der andere Teil wurde ebenfalls zweimal in 1,5 ml mit Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin-Medium gewaschen. Nach der Reinigung wurden die beiden Teile des Probenmaterials jeweils auf fünf bis neun Zellkultur-Inserts (abhängig von der Menge des Zellmaterials) verteilt. Der Boden der Inserts bestand aus einer geätzten Membran mit permeablen Poren (Cell Culture Insert, track-etched polyethylene terephthalate membran, 8 µm Porengröße, $1,0 \times 10^8$ Poren/cm², Falcon™, Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, N. J., USA). Die Inserts wurden in 24-Loch-Multiwellplatten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 well, Falcon™, Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, N. J., USA) eingesetzt, sodass zwei Kompartimente entstanden, zum einen das Insert als oberes Kompartiment, zum anderen das Well als unteres Kompartiment. In jedes Well wurden basal 400 µl des jeweiligen Mediums gegeben, in das Insert 100 µl Medium. Der Aufbau der Zellkultur ist in Abbildung 1 dargestellt.

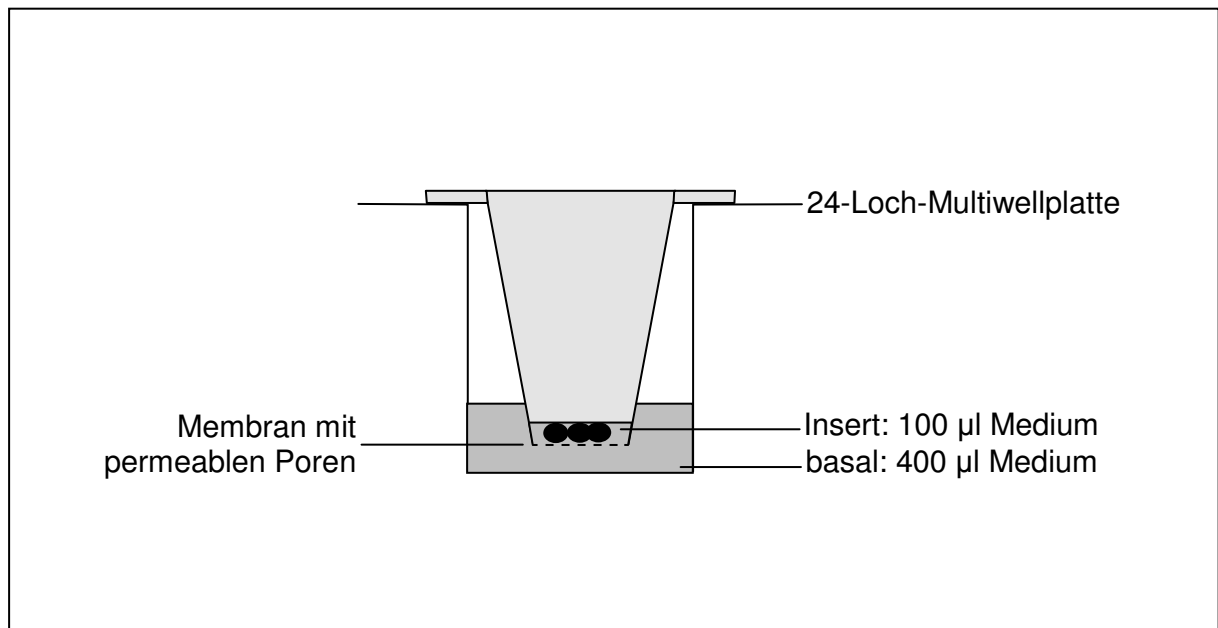


Abbildung 1: Aufbau der Zellkultur mit 24-Loch-Multiwellplatte und eingesetztem Zellkultur-Insert.

Nach der Anlage der Zellkultur wurden die Proben im Inkubator (HERAcell, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37° Celsius, 5 % CO₂ und zirka 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die anschließende Messung der mukoziliären Funktion wurden Proben zwischen zwei und fünf Tagen Inkubationszeit verwendet.

Jeden Tag wurde zusätzlich 100 µl frisches Medium in die Inserts gegeben, an Tag 2 und Tag 4 wurden die Inserts außerdem in neue Wells umgesetzt und mit 400 µl frischem Medium basal versehen.

In der Kultur lagerten sich Sphäroide aus Epithelstreifen zusammen und begannen zu rotieren (in Abbildung 2 schematisch gezeigt).

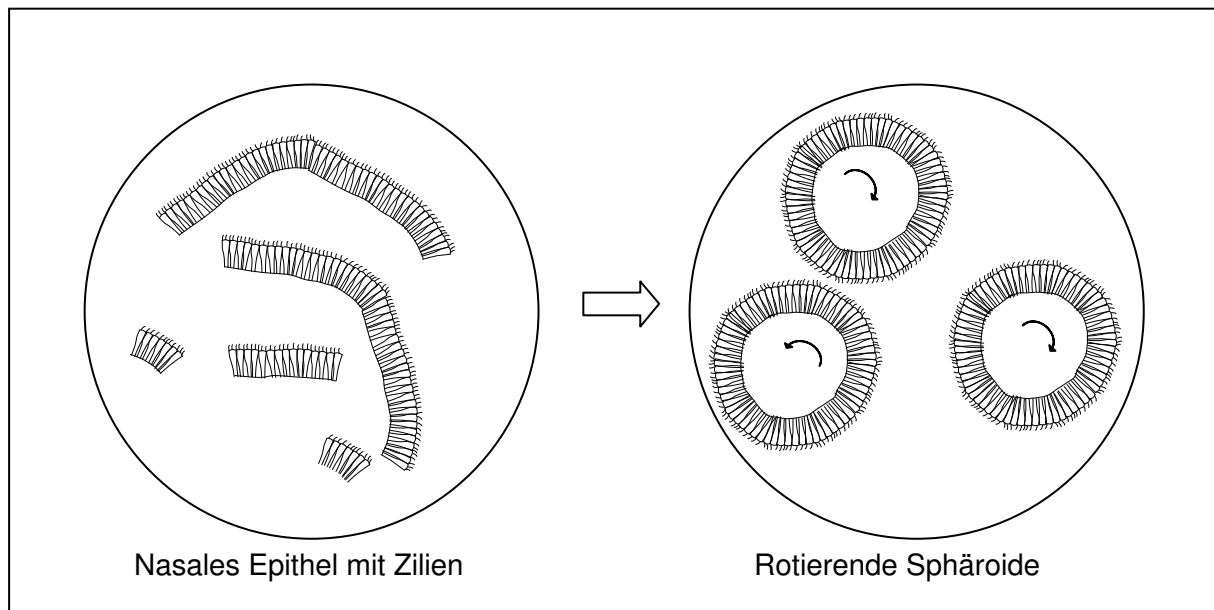


Abbildung 2: Zusammenlagerung von nasalen Epithelstreifen zu Sphäroiden.

2.2 Messung und Auswertung

2.2.1 Kontrolle und Vergleich der Kultur mit Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin

Der Zustand der Proben wurde täglich mit dem Phasenkontrast-Mikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) kontrolliert. Hierbei wurden die Proben hinsichtlich bakterieller Kontamination, der Bildung von Sphäroiden sowie deren Rotation beurteilt. Am letzten Tag der Zellkultur, unmittelbar vor der Durchführung des in 2.2.2 beschriebenen Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion, wurde die Kontamination der einzelnen Proben (Kontamination ja/nein) notiert und für jede Probe einzeln die Gesamtzahl der vorhandenen Sphäroide sowie der rotierenden Sphäroide ermittelt.

2.2.2 Messung der mukoziliären Funktion

2.2.2.1 Anordnung der Messapparatur

Im Zentrum der Anordnung stand eine doppelwandige runde Metallkammer, als Boden hierfür wurde vor jedem Versuch ein Deckgläschen (Durchmesser 15 mm) mit Silikon-Paste eingeklebt. Der Hohlraum innerhalb der doppelten Wand war mittels eines Schlauchsystems an eine Pumpe (BP 742 Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) angeschlossen; diese pumpte destilliertes Wasser mit einer Temperatur von 37° Celsius aus einem Wärmebad (Köttermann, Hänigsen, Deutschland) durch den Hohlraum. Ein Thermostat hielt diese Temperatur in einem Schwankungsbereich von $\pm 0,5^\circ$ Celsius konstant. Auf diese Weise herrschte in der Kammer eine Temperatur von zirka 37° Celsius.

Durch ein zweites Schlauchsystem konnte das Kammerinnere mittels einer Perfusionspumpe (IOC High Precision Multichannel Dispenser, ISMATEC Wertheim-Mondfeld, Deutschland) mit Medium befüllt werden. Für den Versuch wurden die Inserts so in die Kammer eingesetzt, dass das Probenmaterial durch die permeable Membran im Boden des Inserts mit der durch die Kammer gepumpten Flüssigkeit in Kontakt kam. Es entstanden also wieder zwei Kompartimente mit dem Insert als oberem und der Kammer als unterem Kompartiment.

Die Kammer wurde mit ihrem gläsernen Boden in ein Phasenkontrast-Mikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gestellt, das über eine CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) mit einem Videogerät mit Timer (Panasonic, Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japan) und einem Bildschirm (Sony, Tokyo, Japan) verbunden war. Die Aufnahmefrequenz lag bei 25 Einzelbildern pro Sekunde. So konnten einerseits die Sphäroide im Mikroskop beurteilt werden, andererseits deren Rotation auch auf Videoband aufgezeichnet und anschließend offline ausgewertet werden. Der Aufbau des Versuchs ist in Abbildung 3 dargestellt.

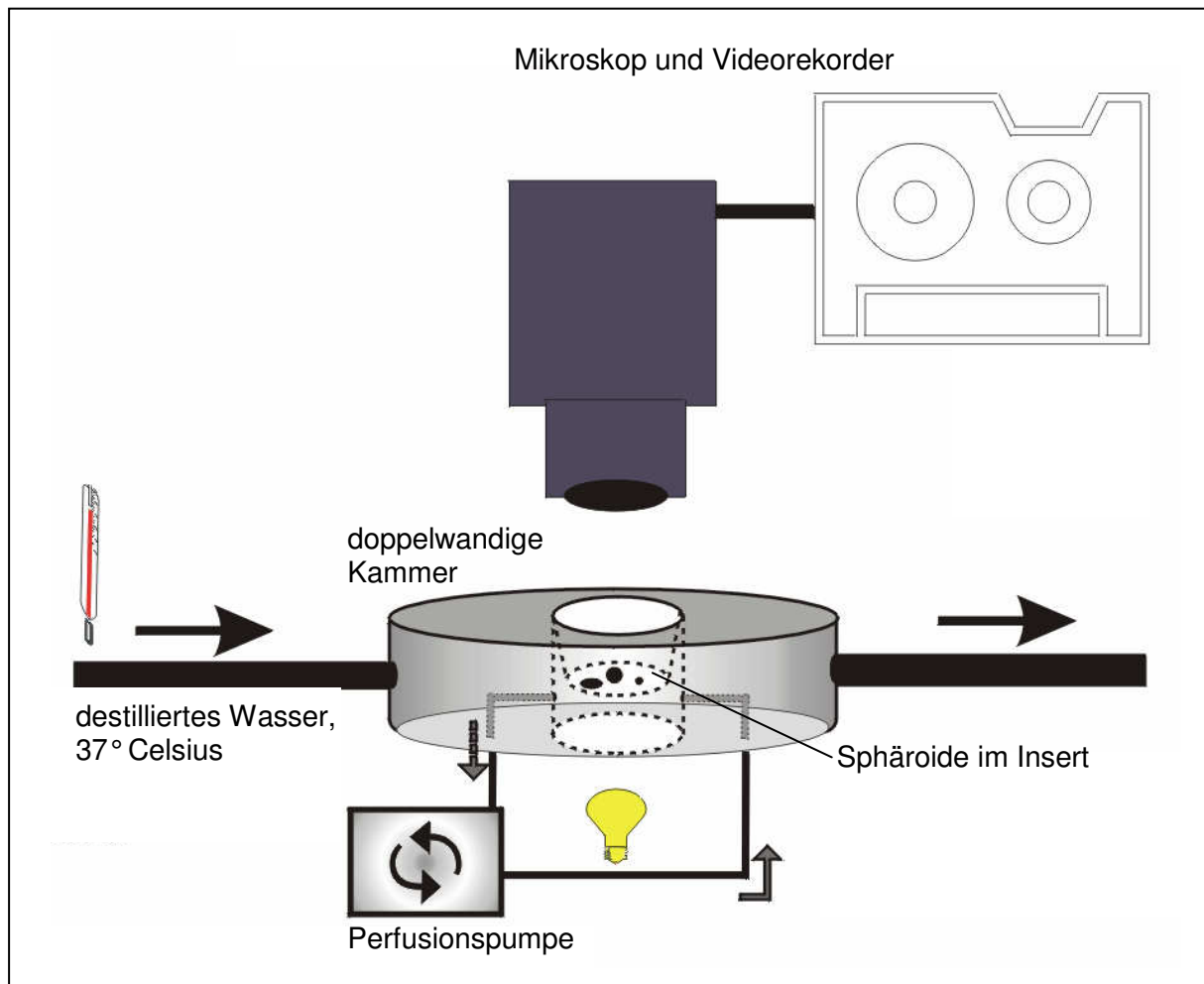


Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Messung der Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden.

2.2.2.2 Durchführung des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion

Vor der Versuchsdurchführung wurde das Kulturmedium im Zellkultur-Insert durch 50 μ l serumfreies HEPES-gepuffertes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) ersetzt. Die Versuchskammer wurde per Pumpe ebenfalls mit DMEM befüllt. Nach dem Einsetzen in die Versuchskammer wurde das Insert zum Schutz vor Verdunstung mit einem transparenten Kunststoffdeckel verschlossen.

Nach fünf Minuten Adaptionszeit begann die Messung. Dazu wurde mindestens ein Sphäroid im Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet. Zunächst wurde die basale Rotation der Sphäroide fünf Minuten lang auf Videoband aufgezeichnet.

Anschließend wurden durch die Pumpe 400 μl 0,5-millimolarer γ -ATP-Lösung (Adenosine-5'-[γ -thio] triphosphate Tetralithium salt, Fluka, Buchs, Schweiz, CAS Number: 93839-89-5, in HEPES-gepuffertem DMEM gelöst) in das untere Kompartiment zugeführt (400 μl entsprechen zirka dem doppelten Volumen der Kammer). Das γ -ATP erreichte das obere Kompartiment per Diffusion durch die permeable Membran im Boden des Inserts. Zusätzlich wurden ab dem vierten Probanden 50 μl 0,5-millimolarer γ -ATP-Lösung per Pipette in das obere Kompartiment gegeben, um das Zellmaterial besser vor Austrocknung zu schützen. Nach der Stimulation mit γ -ATP wurde die Rotation der Sphäroide für weitere zehn Minuten auf Videoband aufgezeichnet. Der zeitliche Ablauf des Versuchs ist in Abbildung 4 skizziert.

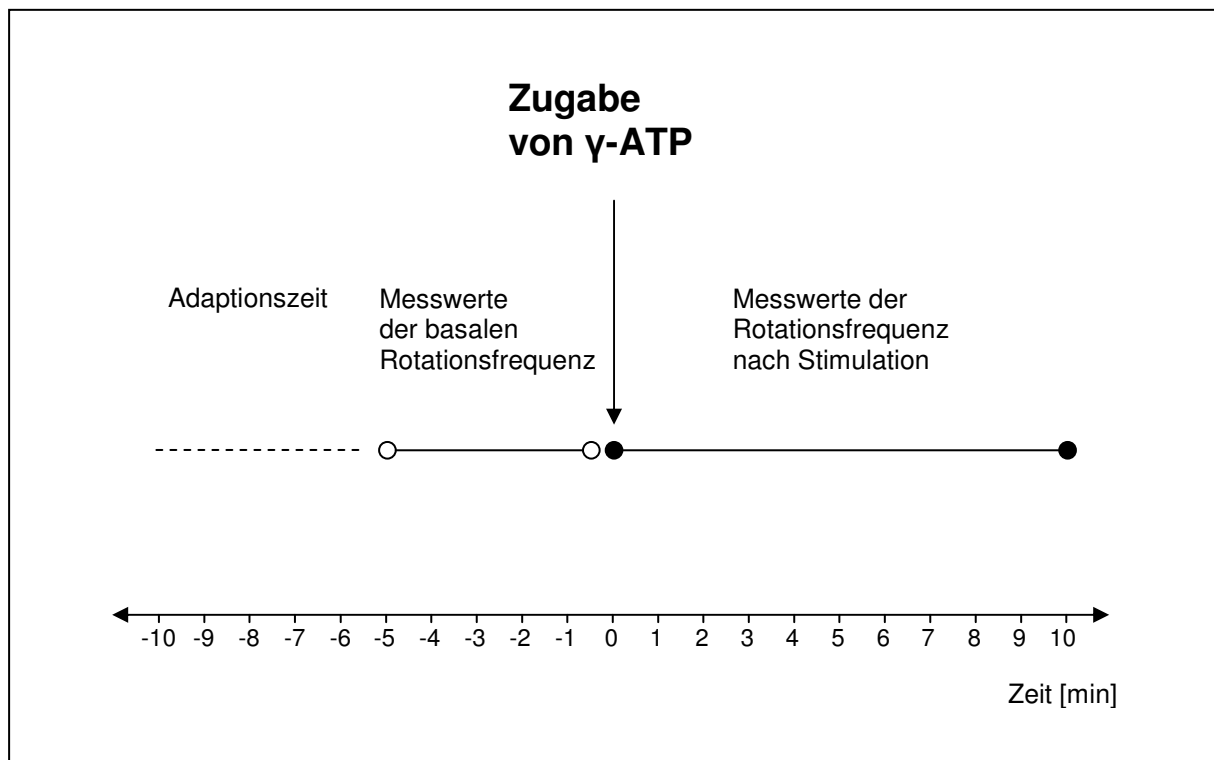


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion.

Nach der Messung wurde eine Neugebauer-Zählkammer in das Mikroskop eingelegt und deren Gitterraster mit der gleichen Vergrößerung, die zuvor für die Messung verwendet worden war, auf Videoband aufgezeichnet. Somit wurde durch den Größenvergleich der Sphäroide und dem Raster der Zählkammer auf dem Videoband eine Beurteilung der tatsächlichen Größe der Sphäroide möglich.

2.2.2.3 Messung der Rotationsfrequenz und der Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide

Für die Messung der Rotationsfrequenzen wurden Sphäroide auf dem Videoband ausgewählt, die es aufgrund ihrer asymmetrischen Form ermöglichten, den Anfang und das Ende einer Umdrehung klar zu bestimmen. Ferner musste der Sphäroid im Schleim so fixiert sein, dass er zwar rotierte, sich aber nicht von der Stelle bewegte. Ein Beispiel hierfür wird in Abbildung 5 gegeben.

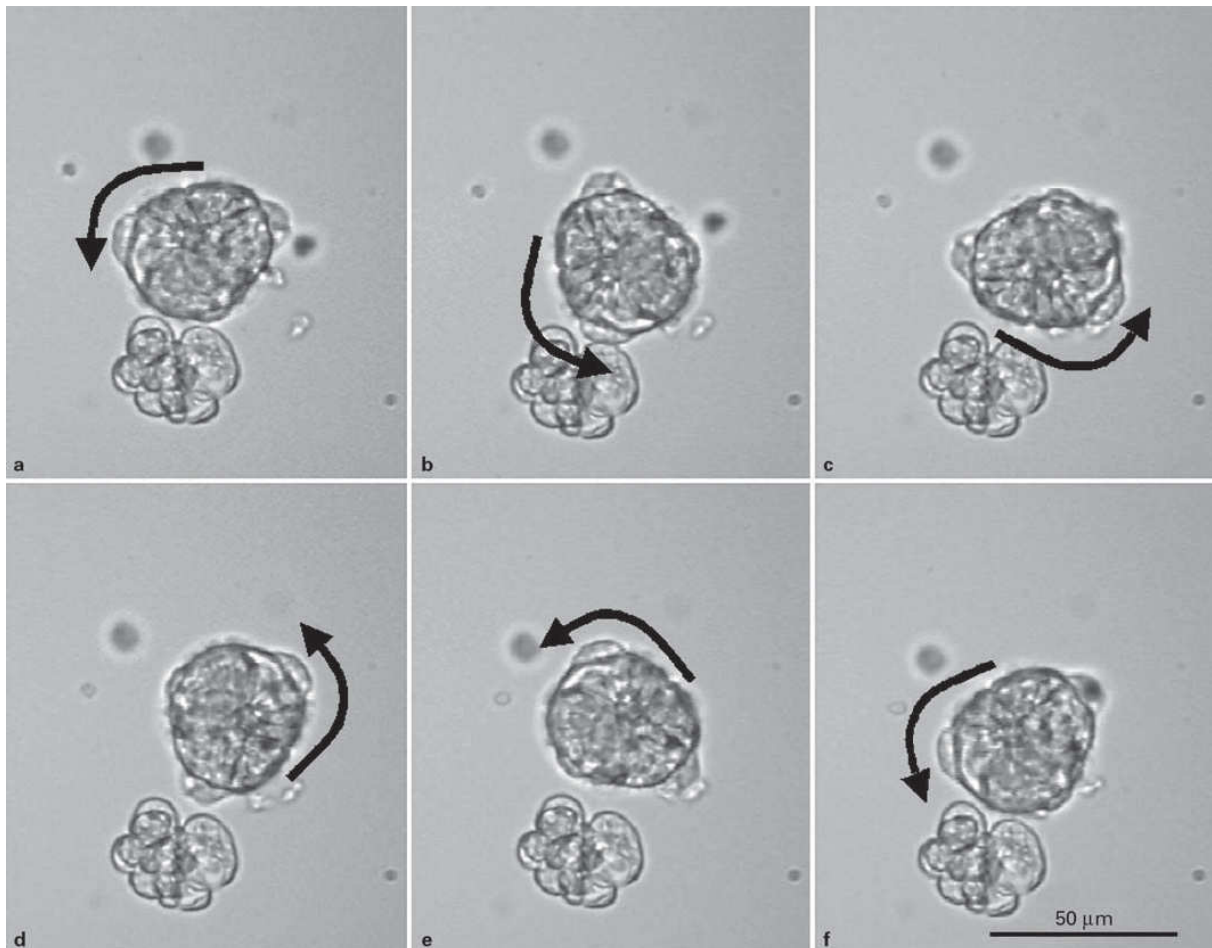


Abbildung 5: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen eines Sphäroids in verschiedenen Phasen einer Rotation.

Die Messung erfolgte, indem ein passender Sphäroid ausgewählt wurde und die Zeit für drei Umdrehungen gestoppt wurde. Die Rotationsfrequenz errechnet sich somit aus dem Quotient aus der Anzahl der Umdrehungen und der dafür benötigten Zeit in Sekunden. Die Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche des Sphäroids errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Geschwindigkeit [mm/min]} = \pi * \text{Sphäroid-Durchmesser [mm]} * \text{Rotationsfrequenz [s}^{-1}\text{]} * 60,$$

mit Sphäroid-Durchmesser [mm] = 0,05 mm (tatsächliche Kantenlänge eines Kleinstquadrates der Neugebauer-Zählkammer) * am Bildschirm gemessener durchschnittlicher Sphäroid-Durchmesser (lotrecht zur Rotationsachse) [mm] / am Bildschirm gemessene Kantenlänge eines Kleinstquadrates der Neugebauer-Zählkammer [mm]. Die Messung der Rotationsfrequenz wurde alle 30 Sekunden durchgeführt.

2.2.3 Vergleich der Transportgeschwindigkeit der Sphäroide mit der FEV₁ der Probanden

Von Interesse war, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lungenfunktion und der mukoziliären Funktion der Probanden gab. Hierfür wurden die basale Geschwindigkeit der Sphäroide und die FEV₁ (gemessen in Prozent des Sollwerts) des jeweiligen Probanden verglichen. Dazu wurde für alle Sphäroide eines Probanden der Mittelwert der basalen Geschwindigkeit, exemplarisch gemessen bei -0,5 Minuten, bestimmt. Dieser Wert wurde mit der FEV₁, welche am Tag der Probenentnahme bei dem jeweiligen Probanden bestimmt wurde, verglichen. Dies geschah durch Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Für einen Wert > ±0,5 war zur Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen Lungenfunktion und mukoziliärer Funktion eine Regression geplant.

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels „SPSS for Windows“, Release 10.0.1., Standard Version, Copyright © SPSS Inc., 1989-1999 und GNU R von Ross Ihaka und Robert Gentleman, Version 2.4.1., 2006.

Um den Einfluss von γ -ATP auf die Rotationsfrequenz und Geschwindigkeit der Sphäroide zu prüfen, wurde eine Varianzanalyse (ein Spezialfall der linearen Regression) mit einem gene-

ralized estimating equation (GEE)-Ansatz für abhängige Daten durchgeführt. Dieser Ansatz erlaubt es, die Korrelationen zwischen wiederholten Messungen bei der Schätzung der Koeffizienten zu berücksichtigen.

3 Ergebnisse

3.1 Kultur Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/ Tobramycin

Die Kulturen wurden in Hinblick auf Kontamination und Bildung von Sphäroiden verglichen. Die Ergebnisse hierfür wurden nach einer Kultivierungszeit von fünf Tagen erhoben.

Alle Proben, die mit Penicillin/Streptomycin antibiotisch behandelt wurden, waren trotz regelmäßigen Mediumwechsels kontaminiert. Nur in einem der 15 Inserts konnten überhaupt Sphäroide beobachtet werden. Diese eine Probe wurde mangels Aussagekraft für die Auswertung nicht herangezogen.

Bei den 15 Proben, die im Vergleich dazu mit Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin behandelt wurden, trat keinerlei Kontamination auf. Es bildeten sich in 93 % Sphäroide; rotierende Sphäroide wurden in 47 % der Proben beobachtet.

Dieser Zusammenhang zwischen der Antibiotika-Kombination und der Kontamination ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen Antibiotika-Kombination und Kontamination der Kulturen (jeweils Anzahl der Inserts).

		Kontamination		Gesamt
		ja	nein	
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin	15	0	15
	Ceftazidim/Gentamycin/Tobramycin	0	15	15
Gesamt		15	15	30

Der Zusammenhang zwischen Antibiotika-Kombination und Entstehung von Sphäroiden beziehungsweise rotierenden Sphäroiden ist in den Tabellen 2 und 3 dargestellt; die Zahlen geben die Anzahl der Zellkultur-Inserts, in denen Sphäroide entstanden waren, wieder.

Tabelle 2: Zusammenhang zwischen Antibiotika-Kombination und Entstehung von Sphäroiden in den Kulturen (jeweils Anzahl der Inserts).

		Sphäroide		Gesamt
		ja	nein	
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin	1	14	15
	Ceftazidim/Gentamycin/Tobramycin	14	1	15
Gesamt		15	15	30

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Antibiotika-Kombination und Entstehung rotierender Sphäroide in den Kulturen (jeweils Anzahl der Inserts).

		Rotierende Sphäroide		Gesamt
		ja	nein	
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin	1	14	15
	Ceftazidim/Gentamycin/Tobramycin	7	8	15
Gesamt		8	22	30

Die Sphäroide in den einzelnen Inserts wurden gezählt. Die Mittelwerte \pm Standardfehler für die Anzahl der Sphäroide beziehungsweise der rotierenden Sphäroide sind für beide Antibiotika-Kombinationen in Abbildung 6 wiedergegeben.

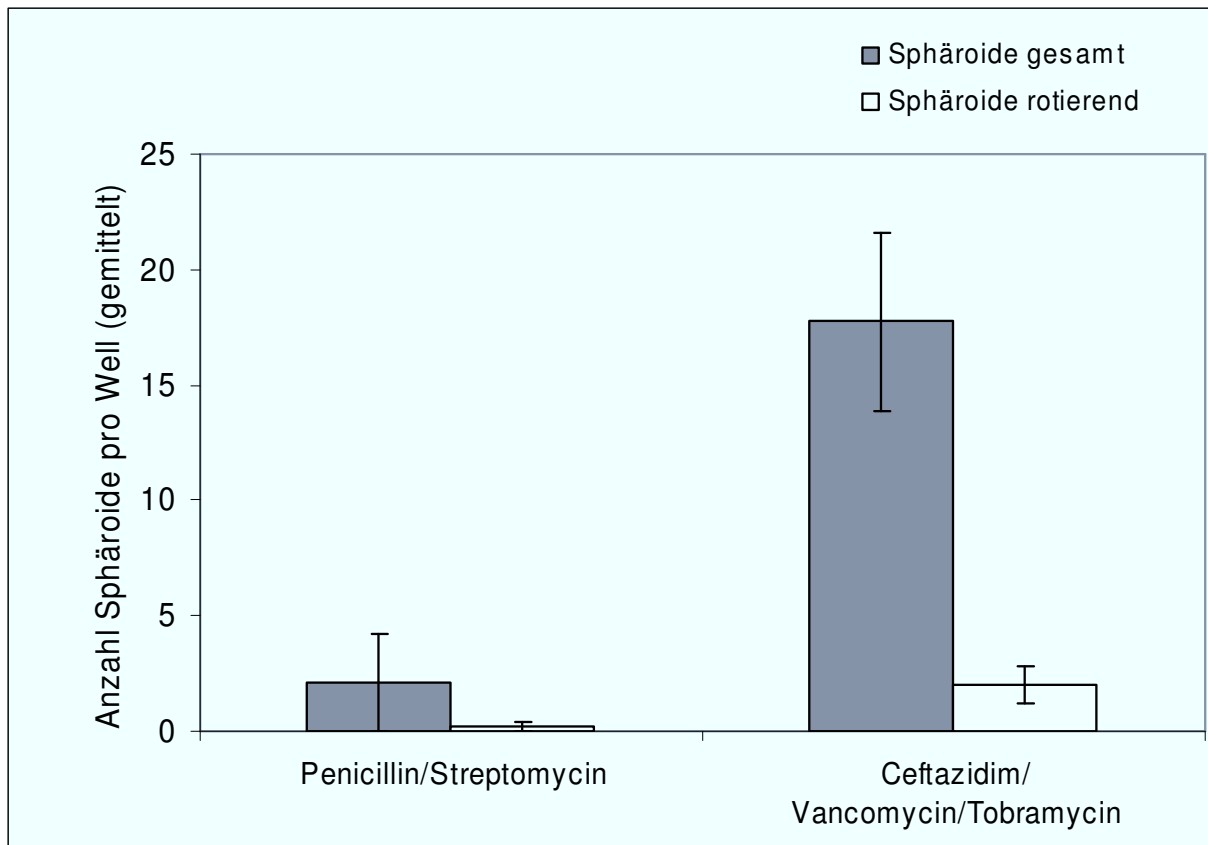


Abbildung 6: Anzahl der Sphäroide beziehungsweise der rotierenden Sphäroide für die Antibiotika-Kombinationen Penicillin/Streptomycin und Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin (Mittelwerte \pm Standardfehler).

Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse wurde zugunsten der wirksameren Antibiotika-Kombination bei den weiteren Probanden darauf verzichtet, Proben mit Penicillin/Streptomycin anzusetzen. Das Zellmaterial wurde nur noch mit der Antibiotika-Kombination Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin kultiviert, um Daten hinsichtlich der Stimulierbarkeit mit γ -ATP zu sammeln. Auch wurde die Kulturdauer auf durchschnittlich drei Tage verkürzt. Bei den weiteren 25 Proben bildeten sich in 96 % der Fälle Sphäroide und in 68 % sich drehende Sphäroide. Insgesamt bildeten sich somit bei dieser Antibiotika-Kombination in 95 % Sphäroide und in 60 % rotierende Sphäroide.

3.2 Rotationsfrequenz und Geschwindigkeit von Nasalepithel-Sphäroiden

Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten wurde die basale Rotationsfrequenz von 27 Sphäroiden über fünf Minuten gemessen, alle 30 Sekunden wurde ein Messwert erhoben. Die basale Rotationsfrequenz (exemplarisch bei -0,5 Minuten, dies war der letzte Messwert

vor der Stimulation mit γ -ATP) lag bei $0,228 \pm 0,016 \text{ s}^{-1}$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Die daraus errechnete Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide lag bei $4,380 \pm 0,448 \text{ mm/min}$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Der Durchmesser der Sphäroide lag zwischen 50 und 200 μm , der Mittelwert lag bei $104 \pm 8 \mu\text{m}$ (Mittelwert \pm Standardfehler).

3.3 Einfluss von γ -ATP auf die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden und deren Transportgeschwindigkeit an ihrer Oberfläche

Nach der Messung der basalen Rotationsfrequenz über fünf Minuten wurden die Sphäroide mit 0,5-millimolarem γ -ATP stimuliert und die Rotationsfrequenz für weitere zehn Minuten gemessen, alle 30 Sekunden wurde ein Messwert erhoben.

Die Frequenz war zwei Minuten nach Stimulation maximal angestiegen ($0,260 \pm 0,020 \text{ s}^{-1}$, Mittelwert \pm Standardfehler) und sank danach wieder. Der Verlauf der Rotationsfrequenz ist in Abbildung 7 dargestellt; es ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler für alle 27 Sphäroide abgebildet. Die durchschnittliche Frequenz vor der Stimulation mit γ -ATP betrug $0,226 \text{ s}^{-1}$ und nach der Stimulation $0,242 \text{ s}^{-1}$. Dieser Anstieg der Rotationsfrequenz nach der Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,01$; Varianzanalyse mit GEE-Ansatz).

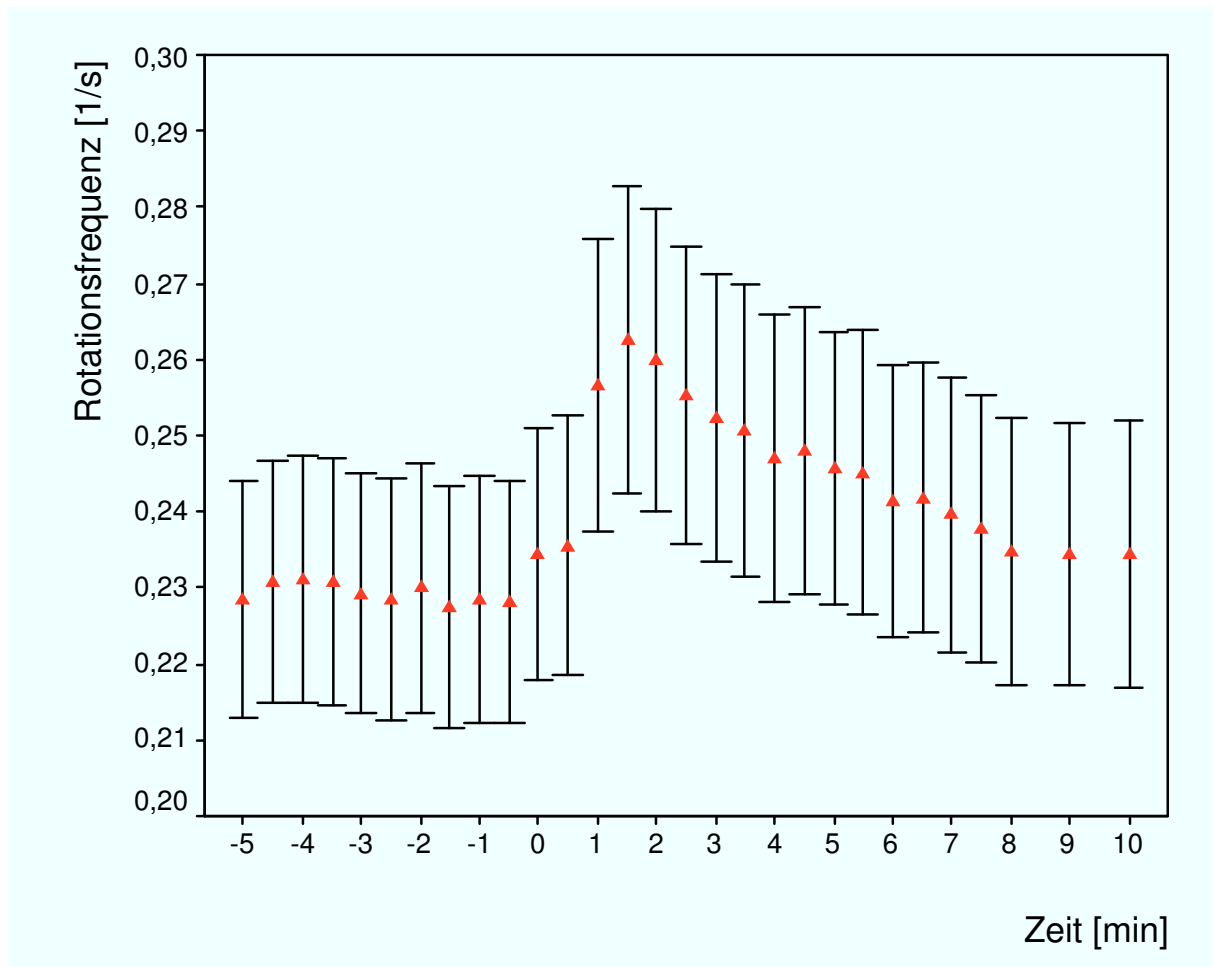


Abbildung 7: Verlauf der Rotationsfrequenz der Sphäroide (Mittelwert \pm Standardfehler) vor und nach Stimulation mit 0,5-millimolarem γ -ATP. Der Zeitpunkt der Stimulation lag bei null Minuten. Der Anstieg der Rotationsfrequenz nach der Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,01$; Varianzanalyse mit GEE-Ansatz).

Hieraus wurde die Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide berechnet. Deren Verlauf (Mittelwert \pm Standardfehler) ist in Abbildung 8 dargestellt. Die durchschnittliche Transportgeschwindigkeit vor der Stimulation mit γ -ATP betrug 4,407 mm/min und nach der Stimulation 4,663 mm/min, der Anstieg der Transportgeschwindigkeit nach der Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,001$; Varianzanalyse mit GEE-Ansatz).

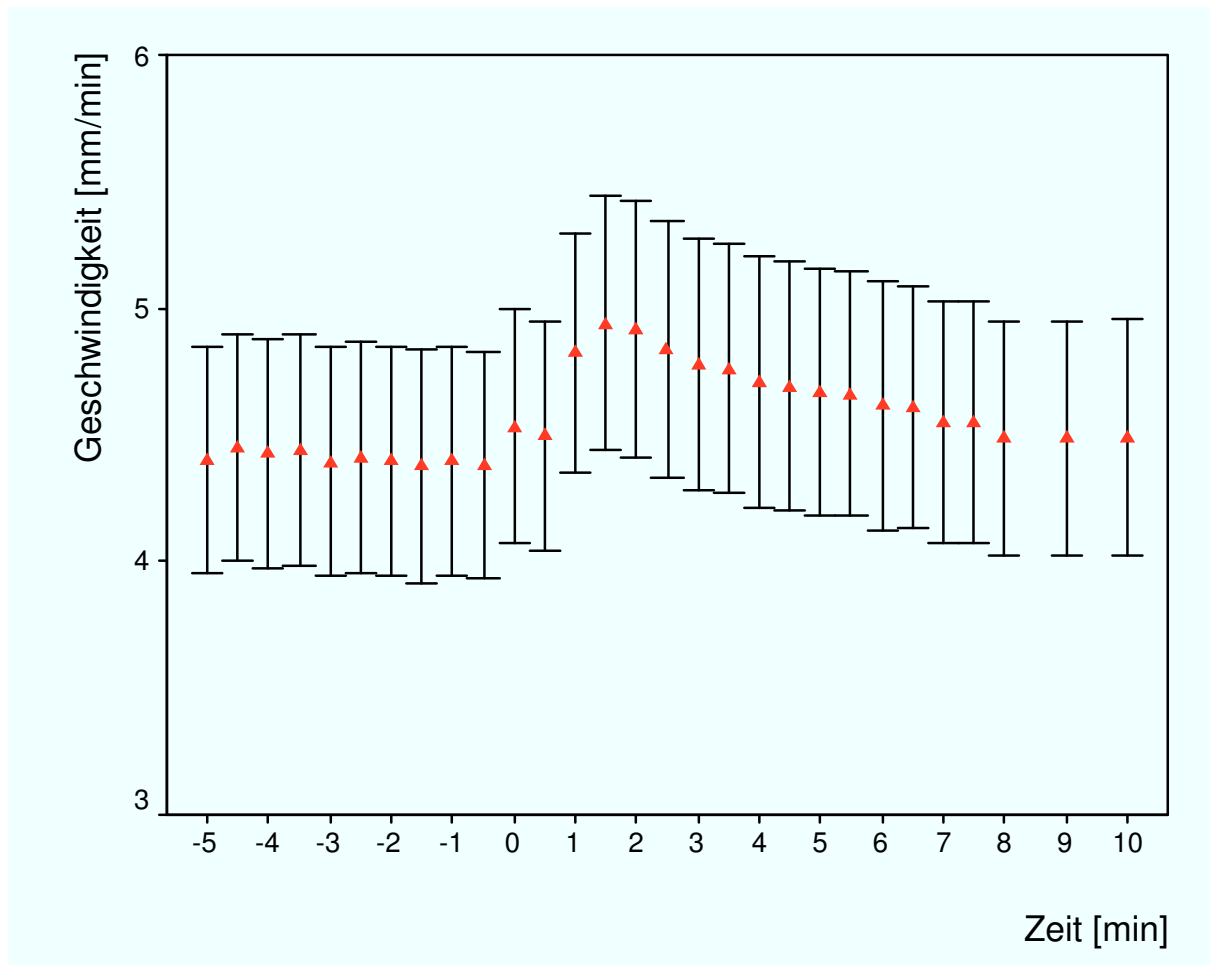


Abbildung 8: Verlauf der Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide (Mittelwert \pm Standardfehler) vor und nach Stimulation mit 0,5-millimolarem γ -ATP. Der Zeitpunkt der Stimulation lag bei null Minuten. Der Anstieg der Transportgeschwindigkeit nach der Stimulation war statistisch signifikant ($p < 0,001$; Varianzanalyse mit GEE-Ansatz).

3.4 Zusammenhang der Geschwindigkeit der Sphäroide mit der FEV₁

Zur Messung eines Zusammenhangs zwischen der Lungenfunktion und der ziliären Funktion der Probanden wurde die basale Geschwindigkeit der Sphäroide (exemplarisch gemessen bei -0,5 Minuten, es wurde der Mittelwert aus allen ausgewerteten Sphäroiden eines Probanden gebildet) mit der FEV₁ (in Prozent des Sollwerts, erhoben am Tag der Probenentnahme) des jeweiligen Probanden verglichen. Hierfür wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, dieser lag bei -0,071. Werte um null für den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman deuten darauf hin, dass kein monotoner Zusammenhang zwischen den Vari-

ablen besteht. Eine Regression konnte daher wegen mangelnder Aussagekraft nicht durchgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Materials und der Methodik

4.1.1 Antibiotika Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/Vancomycin/ Tobramycin

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich durch eine optimierte Antibiotika-Kombination bei Patienten mit Mukoviszidose das Resultat der Zellkultur verbessern ließe. Hintergrund war, dass Zellkulturen bei Probanden mit Mukoviszidose häufig Kontaminationen aufwiesen. Überschießendes Bakterienwachstum machte die Kulturen ungeeignet für Versuche oder ließ sie absterben.

Da Patienten mit Mukoviszidose häufig an chronischen Infektionen der Lunge – oft mit *Pseudomonas aeruginosa* – leiden, musste eine spezifischere Antibiotika-Kombination gefunden werden als die in der Zellkultur standardmäßig verwendete Mischung aus Penicillin und Streptomycin.

Fulcher et al. [15] sowie Randell et al. [51] beschäftigten sich mit der Kultur von Epithelzellen aus chronisch infizierten menschlichen Lungen. Sie verwendeten unter anderem eine Kombination aus Ceftazidim, Vancomycin und Tobramycin in hoher Dosierung, welche sich aber dennoch als nicht zytotoxisch erwies.

Daher wurde in dieser Arbeit der für Zellkultur üblichen Kombination aus Penicillin und Streptomycin eine Dreierkombination aus Ceftazidim, Vancomycin und Tobramycin gegenübergestellt, um den Einfluss einer optimierten Antibiose auf die Resultate der Zellkultur zu messen.

Penicillin [43] ist strukturell ein β -Lactam-Antibiotikum. Es interferiert mit der Zellwandsynthese von Bakterien. Dabei reagiert Penicillin mit einer Transpeptidase derart, dass die Verknüpfung zweier Peptide gestört wird. Streptomycin gehört zu den Aminoglykosiden. Diese hemmen die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 30 S-Untereinheit der 70 S-Ribosomen. Zusätzlich wird die Zellwand geschädigt. In der vorliegenden Arbeit wurden Penicillin und Streptomycin als fertige Mischung verwendet.

Ceftazidim [43] gehört zur Substanzklasse der Cephalosporine. Cephalosporine wirken ähnlich wie Penicilline durch eine Beeinträchtigung der Transpeptidaseaktivitäten beim Aufbau der Bakterienzellwand. Ceftazidim gehört zur Generation 3b der parenteralen Cephalosporine, weist hiervon das breiteste Spektrum auf und hat eine hohe Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa*. Vancomycin gehört zu den Glykopeptidantibiotika; diese wirken durch Hemmung der Zellwandsynthese bakterizid auf grampositive Bakterien, indem sie mit dem transmembranalen Auswärtstransport der Zellwandbausteine interferieren. Tobramycin zählt ebenfalls zu den Aminoglykosiden, allerdings mit guter Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa*. Um die Wirkung der zwei verschiedenen Antibiotika-Kombinationen im Kulturmedium unverfälscht beobachten zu können, wurden für den Vergleich der Wirksamkeit nur Probanden eingeschlossen, die in den zwei Wochen vor der Entnahme der Gewebeprobe nicht antibiotisch behandelt worden waren.

4.1.2 Adenosintriphosphat als Stimulans der Rotationsfrequenz der Sphäroide

Adenosintriphosphat, ein energiereiches Nukleotid, ist das Triphosphat des Nukleosids Adenosin [41]. Das Nukleotid besteht aus einem Adenin-Rest, dem Zucker Ribose und drei Phosphat-Resten in Ester- (alpha) beziehungsweise Anhydrid-Bindung (beta und gamma). Die Strukturformel ist in Abbildung 9 dargestellt.

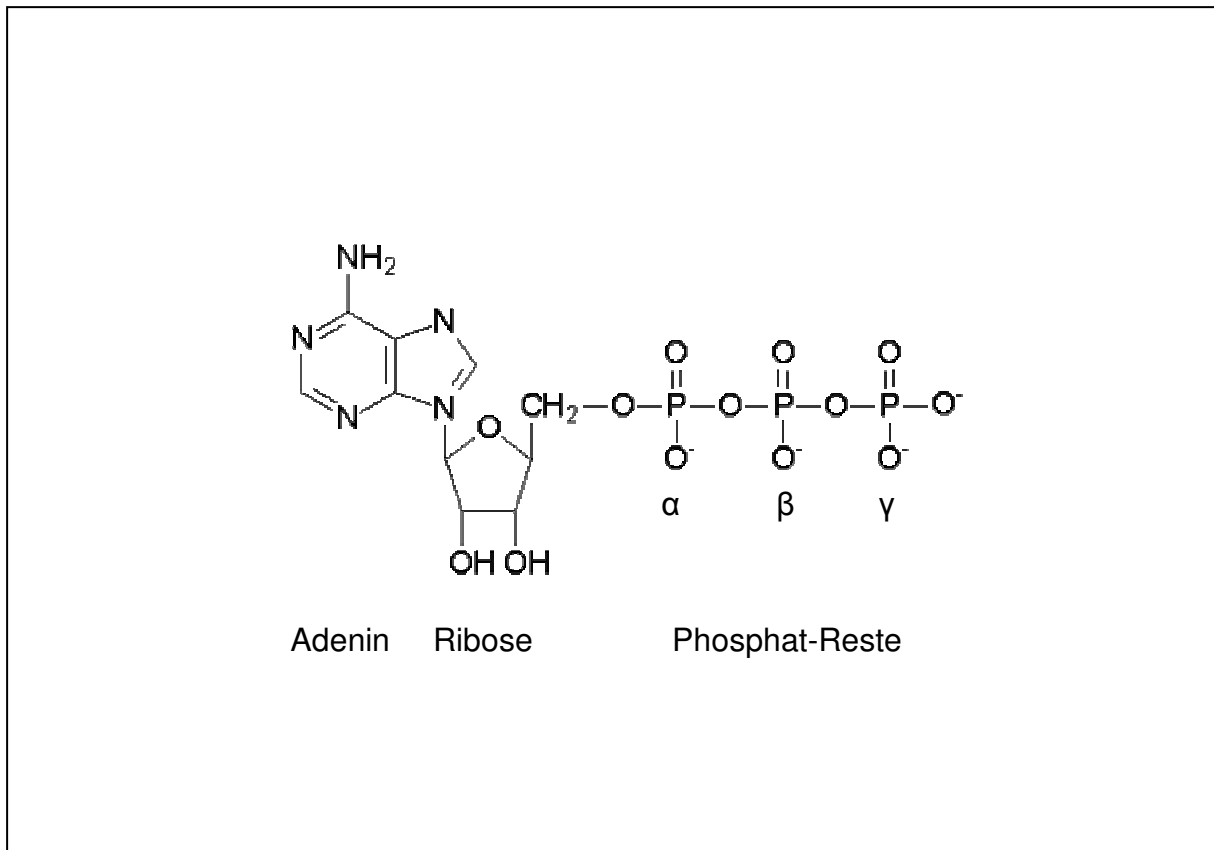


Abbildung 9: Das Molekül Adenosintriphosphat.

ATP ist Bestandteil der Nucleinsäuren Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS), den Träger des Erbguts. Darüber hinaus stellt ATP den wichtigsten Energielieferanten im Zellstoffwechsel dar. Die Energie ist in den Anhydrid-Bindungen der Phosphatreste gespeichert. So werden bei der Hydrolyse dieser Bindungen jeweils zirka 30 kJ/mol frei. ATP dient der Energiebereitstellung für grundlegende Prozesse im Organismus, wie zum Beispiel der Synthese organischer Moleküle, dem aktiven Stofftransport durch Biomembranen und der Muskelkontraktion.

Der Einfluss von ATP auf die ziliäre Schlagfrequenz von bronchialem [22, 37, 39, 67, 72], nasalem [46, 71] sowie oviduktalem [3] Epithel wurde in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen. In allen Arbeiten wurde ein rezeptorvermittelter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und eine daraus resultierende Beschleunigung der ziliären Schlagfrequenz als Folge der ATP-Gabe beschrieben.

Wir verwendeten für die vorliegende Arbeit zur Messung der Stimulierbarkeit von Sphäroiden γ -ATP (Adenosine-5'-[γ -thio] triphosphate Tetralithium salt, siehe Abbildung 10). Bei diesem ATP-Analogon ist am Phosphat in γ -Position ein Sauerstoffatom durch Schwefel ersetzt. Dieses Molekül kann in Kinase-Reaktionen als Ersatz für ATP verwendet werden und

führt dabei zu thiophosphorylierten Proteinen, welche nicht spontan durch Proteinphosphatasen hydrolysiert werden können [26]. Dadurch sollte eine vorzeitige Hydrolyisierung und damit Inaktivierung vermieden werden.

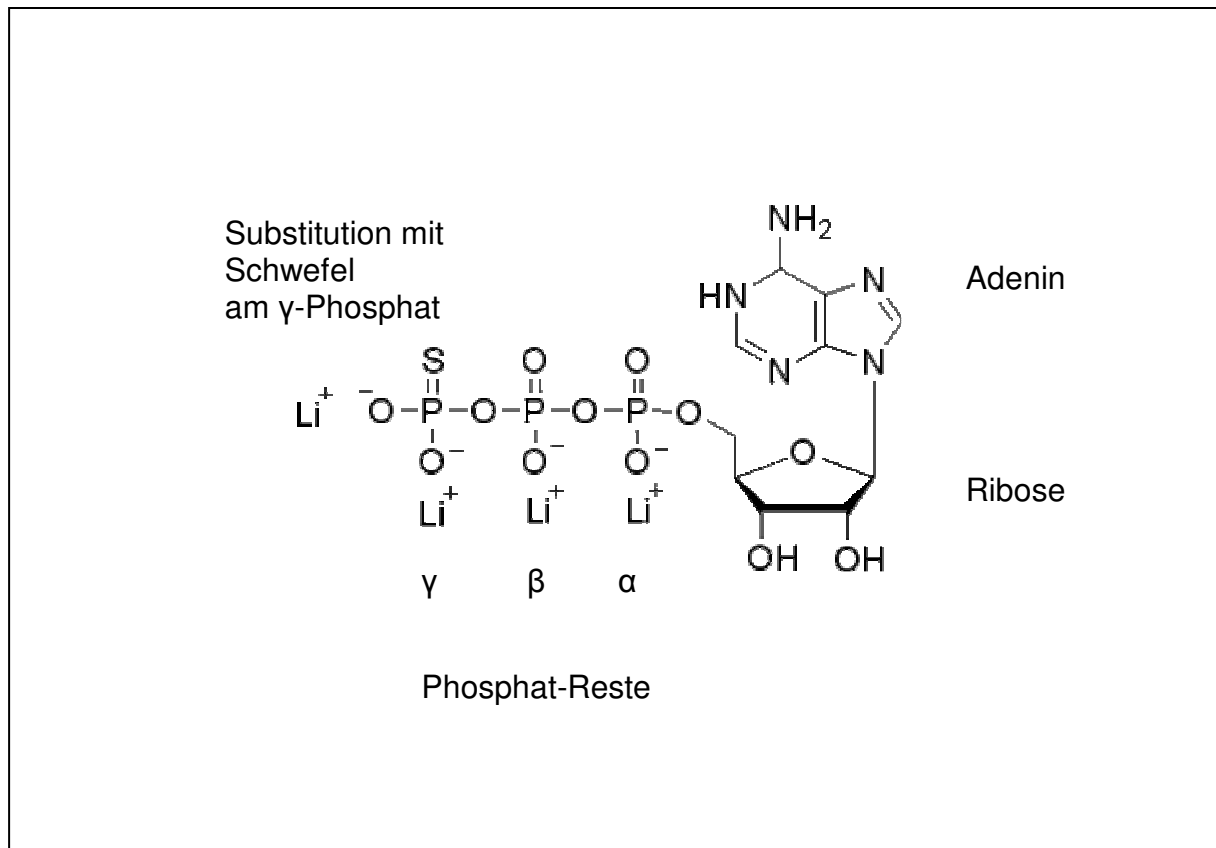


Abbildung 10: Das Molekül Adenosine-5'-[γ -thio] triphosphate Tetralithium salt.

4.1.3 Kultivierungsmethode

Der Boden der für die Zellkultur verwendeten Inserts bestand aus einer geätzten PET-Membran mit permeablen Poren. So konnte das Medium, das basal in das jeweilige Well gegeben wurde, durch die Poren diffundieren und stellte zusätzlich zum Medium im Insert ein weiteres Flüssigkeits-Reservoir dar. Durch die geringe Menge an Flüssigkeit, die sich direkt im Insert über den Sphäroiden befand, entstand eine air-liquid interface Kultur, d. h. an der apikalen Seite der Zellkultur entstand eine Berührungsfläche zur Luft. Die physiologische Umgebung der respiratorischen Epithelzellen mit einem geringen Spiegel an periziliärer Flüssigkeit, Schleim und angrenzender Berührungsfläche zur Atemluft sollte somit in vitro simuliert werden [28].

Außerdem war der transparente Boden des Inserts für Lichtmikroskopie geeignet [24]. Daher mussten die Sphäroide weder für den Mediumwechsel noch für den Versuch umgesetzt werden, sondern konnten im Zellkultur-Insert belassen werden. Die Verwendung der Zellkultur-Inserts stellte somit ein sehr schonendes Verfahren dar.

AECGM ist ein serumfreies, wässriges Kulturmedium [25]. Die Wässrigkeit des Mediums schloss einen unerwünschten Effekt auf die ziliäre Aktivität im Sinne einer Viskositätssteigerung aus. Vorversuche hatten gezeigt, dass eine Kultur nur mit AECGM zu einer starken Proliferation der Zellen führte und sich die Sphäroidformationen dadurch auflösten. In den Versuchen mit Sphäroiden von Bridges et al. [5] wurde hingegen serumhaltiges Medium verwendet. Daher wurde dem Medium NCS zugegeben, um die Kontakthemmung zu erhalten; dies verhinderte das Einsetzen übermäßiger Zellteilung und eine Auflösung des Epithelverbandes.

Als Antibiotika wurden entweder Penicillin/Streptomycin oder Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin zugesetzt, als Antimykotikum Amphotericin B.

Täglich erfolgte eine Zugabe von 100 µl frischen Mediums in die Inserts, an Tag 2 und 4 wurden die Inserts zusätzlich in neue Wells umgesetzt und mit 400 µl frischem Medium basal versehen. So sollte eine Beeinflussung der Sphäroide durch Veränderungen der Osmolarität, des pH-Wertes sowie durch Nährstoffmangel verhindert werden.

AECGM ist ein mit Bikarbonat gepuffertes Medium und konnte deswegen nicht außerhalb des Inkubators verwendet werden. Daher wurde vor der Versuchsdurchführung zur Messung der Rotationsfrequenz das Kulturmedium im Insert durch 50 µl serumfreies HEPES-gepuffertes DMEM ersetzt.

4.1.4 Sphäroid-Modell

Die Kultivierung von Sphäroiden aus nasalem Epithel stellt eine nicht adhärente, dreidimensionale Form der Zellkultur respiratorischer Epithelien dar. Corssen und Allen [9] berichteten 1958 erstmals über die Tendenz respiratorischer Gewebsbiopsien – bei Operationen gewonnen und in Kulturmedium verbracht, sich zu kleinen Kugeln zusammenzuballen, die um die eigene Achse rotierten. Nach sechs bis acht Stunden konnte die zunächst erloschene ziliäre Aktivität erneut beobachtet werden, sie erreichte nach zwei bis drei Tagen ihr Maximum und erhielt sich über zehn bis zwölf Tage. Aus der Rotation der Sphäroide wurde auf die ziliäre Aktivität des Epithels geschlossen. Corssen und Allen führten auf diese Weise Versuche zur Toxizität von Anästhetika durch. Hierfür gaben sie die rotierenden kugelartigen Gebilde in

eine abgeschlossene Perfusionskammer mit Zu- und Ablauf für die zu testenden Anästhetika. Aus der sich verändernden Rotationsfrequenz, die phasenkontrastmikroskopisch beobachtet wurde, schlossen sie indirekt auf die ziliäre Aktivität und somit die Zytotoxizität der Versuchsstoffe.

Jorissen et al. [32] generierten Sphäroide aus nasalen Polypen, unter anderem von Probanden mit Mukoviszidose. Dazu wurde das Probenmaterial einer Pronasebehandlung unterzogen, die dissoziierten Zellen anschließend auf Kollagengel kultiviert, bis sie konfluieren und die Zilien verschwanden. Als die Zellen anschließend in Suspension gebracht wurden, formten sich Aggregate und Vesikel. Die Zilien bildeten sich nach einer Woche erneut. Hinsichtlich der Ultrastruktur unterschieden sich die neu generierten Zilien von Probanden mit Mukoviszidose nicht von denen gesunder Probanden. Diese Vorgehensweise diente dazu, genetische Veränderungen bei der Mukoviszidose von der Schädigung ziliärer Strukturen durch bakterielle Endotoxine zu differenzieren.

Bridges et al. [5] kultivierten multizelluläre Sphäroide aus humanem Nasalepithel, gewonnen aus Bürstenabstrichen. Sie zentrifugierten die Zellcluster und resuspendierten die so gewonnenen Zellpellets in Kulturmedium. Als Vorteil schilderten sie besonders die Nichtinvasivität der Methode, die keine Anästhesie erforderte und von den Probanden gut toleriert wurde. Weiterhin wiesen Bridges et al. auf eine Anwendungsmöglichkeit des Sphäroid-Modells zur Beobachtung pathologischer Zustände des Respirationstraktes, zum Beispiel der Mukoviszidose, hin.

Im Unterschied zu Jorissen et al. und Bridges et al. wurden in den hier dokumentierten Versuchsreihen die Gewebeproben zwar vorsichtig gewaschen, blieben aber ansonsten unbehandelt. Es wurde darauf geachtet, dass der Mucus als das Zellmaterial umgebende Element erhalten blieb. Gamarra et al. [16] beschrieben bereits, dass dadurch möglicherweise rheologische Eigenschaften des Schleims und eventuelle Interaktionen zwischen Zilien und Mucus in die Messung der ziliären Funktion eingehen könnten. Dies ist besonders bei der Mukoviszidose von Interesse, da hierbei die Viskosität des Mucus verändert ist. Allerdings ist bisher nicht geklärt, in welchem Umfang und Zustand der Schleim in den Sphäroid-Kulturen zur Zeit der Messung der Rotationsfrequenz noch vorhanden ist. Die Zusammensetzung des Schleims könnte sich durch die beschriebenen Waschvorgänge des Zellmaterials sowie durch die Kultur in Flüssigmedium verändert haben. Außerdem weisen Button et al. [6] darauf hin, dass die bei der zystischen Fibrose defekten Ionenkanäle in der Zellkultur zu einer zusätzlichen Höhenverringerung der airway surface liquid führten; dies habe einen ineffektiven

Zilienschlag zur Folge. Menge und Zusammensetzung des Schleims vor, während oder nach der Kultivierung wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert.

Da bisher nicht geklärt ist, ob sich durch die Kultur in Flüssigmedium die Viskosität des Schleimes, der die Sphäroide umgibt, ändert, könnte in weiteren Versuchen die Menge des Flüssigmediums reduziert werden oder die Kultur in verschiedenen Mengen von Medium miteinander verglichen werden. Außerdem würde es sich anbieten, die Kulturdauer zu verkürzen, um die Eigenschaften des umgebenden Schleimes möglichst originär zu erhalten.

4.1.5 Aufbau und Durchführung des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion

Gamarra et al. [16] konnten nachweisen, dass die Rotationsfrequenz von Sphäroiden bei konstanten Bedingungen über einen längeren Zeitraum (300 Minuten) unverändert blieb. Dies war eine Voraussetzung für die Testung von Stimulanzen, welche die mukoziliäre Funktion beeinflussen könnten. In Versuchen mit Isoproterenol in unterschiedlichen Konzentrationen bei verschiedenen Temperaturen, in denen das oben beschriebene Zwei-Kammer-System bereits eingesetzt wurde, konnte die Tauglichkeit des Sphäroid-Modells zur Beurteilung der mukoziliären Funktion gezeigt werden.

Der Versuchsaufbau sollte sicherstellen, die Rotation der Sphäroide von außen möglichst wenig zu beeinflussen, da eine mechanische Irritation respiratorischen Epithels möglicherweise eine parakrine ATP-Sekretion bewirkt [19]. Daher standen die Geräte zur Versuchsdurchführung auf einer festen Arbeitsfläche. Nachdem das Zellkultur-Insert mit den Sphäroiden in die Versuchskammer eingesetzt wurde, wurden zunächst fünf Minuten Adaptionszeit eingehalten, um Beeinflussungen durch mechanische Erschütterung auszuschließen. Da man aus den in 4.1.4 beschriebenen Versuchsreihen von Gamarra et al. wusste, dass Sphäroide temperaturabhängig reagieren, wurde die Temperatur in der Versuchskammer konstant auf $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ Celsius gehalten. Dies geschah, indem der Hohlraum zwischen der doppelten Wand der Versuchskammer mit Wasser entsprechender Temperatur durchspült wurde. Die nach fünfminütiger Messung der basalen Rotationsfrequenz zugeleitete γ -ATP-Lösung wurde zwar auf 37° Celsius angewärmt, da jedoch die Temperatur im Zuleitungssystem nicht kontinuierlich kontrolliert wurde, ist davon auszugehen, dass die Temperatur beim Einstrom der γ -ATP-Lösung kurzzeitig etwas fiel. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Rotationsfre-

quenz erst etwa eine Minute nach Stimulation mit γ -ATP anzusteigen begann. In weiteren Versuchen könnte man Menge und Konzentration von γ -ATP variieren und mögliche Unterschiede im Ausmaß der Stimulation messen.

Der Bereich der Kammer, in den das Zellkultur-Insert eingesetzt wurde, war mit einem Glasboden versehen, um eine mikroskopische Beobachtung zu ermöglichen, ohne die Versuchskammer zu bewegen. Das in die Kammer eingesetzte Insert wurde mit einem transparenten Kunststoffdeckel abgedeckt, um die Probe gegen Verdunstung und eine damit einhergehende Änderung der Osmolarität zu schützen; die Osmolarität wurde jedoch nicht gemessen.

In diesem Zusammenhang wäre von Interesse, ob und wie Sphäroide auf Flüssigkeitsentzug während der Messung der Rotation reagieren und ob sich hierbei Unterschiede zwischen Patienten mit Mukoviszidose und einer Kontrollgruppe ergeben. Dies könnte man durch Versuche, in denen man das Medium gezielt verdunsten lässt, messen.

Zur Messung der Rotationsfrequenz wurden die Videoaufnahmen herangezogen, die während des Stimulationssversuchs mitgeschnitten wurden. Nach Auswahl eines geeigneten Sphäroids wurde die Zeit bestimmt, die er für drei komplette Umdrehungen benötigte, um die Messung nicht durch kurzfristige Schwankungen der Rotationsfrequenz zu beeinflussen.

Im Vergleich zu anderen Messmethoden – etwa der photometrischen Methode oder der High-Speed-Video-Aufzeichnung – können bei der verwendeten Messmethode Aussagen über die Koordination und Effektivität des Zilienschlages gemacht werden, da man hierbei nicht den isolierten Zilienschlag ermittelt, sondern durch die Messung der sphäroidalen Rotationsfrequenz die Transportgeschwindigkeit errechnet, mit welcher der umgebende Schleim transportiert wird.

Bei der photometrischen Methode [3, 13, 27, 33, 54, 56, 57, 60, 66, 68] hingegen wird die in ein Phasenkontrast-Mikroskop eingelegte Epithelprobe von einer Lichtquelle durchstrahlt. Der Zilienschlag verursacht Änderungen der Lichtintensität, welche vom einem Photodetektor gemessen und durch Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgerechnet werden; daraus wird die ziliäre Schlagfrequenz errechnet. Die Schlagfrequenz erlaubt allerdings noch keine Aussage über die Effizienz eines gerichteten Transports, da der Zilienschlag auch unkoordiniert erfolgen kann.

Auch bei der High-Speed-Video-Aufzeichnung [21], die den Ablauf des Zilienschlages eines kleinen Areals respiratorischen Epithels misst, kann keine Aussage über die gerichtete ziliäre Transportfunktion, sondern nur über die Schlagfrequenz weniger Zilien getroffen werden.

Jedoch ist zu beachten, dass die Messungen zur ziliären Funktion, wie sie in der vorliegenden Arbeit gemacht wurden, nicht repräsentativ für den gesamten Respirationstrakt sind, da nur

nasales Epithel verwendet wurde. Vergleiche mit Bronchialepithel wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Vergleich der Kultur Penicillin/Streptomycin versus Ceftazidim/ Vancomycin/Tobramycin

Der Vergleich der Antibiotika-Kombinationen bei der Kultur von Nasalepithel-Sphäroiden lieferte eine klare Aussage. Die Kulturen mit Penicillin/Streptomycin wiesen alle Kontaminationen auf, sodass bis auf eine Ausnahme keine Sphäroide beobachtet werden konnten. Die Kulturen mit Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin hingegen wiesen keinerlei Kontamination auf, es bildeten sich beim größten Teil der Proben (93 %) Sphäroide. Als Kriterium für Kontamination wurde die makro- und mikroskopisch sichtbare Verunreinigung durch Bakterien verwendet, es erfolgte keine mikrobiologische Untersuchung. Penicillin/Streptomycin als Antibiotikum erwies sich somit für die Kultivierung nasalen Epithels von Probanden mit Mukoviszidose als ungeeignet, die Kombination Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin hingegen erwies sich als sehr gut geeignet. Daher wurde das Versuchsdesign nach den ersten 30 Zellkultur-Inserts dahingehend geändert, nur noch mit Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin zu kultivieren, um Daten für den Stimulationsversuch zu sammeln.

4.2.2 Rotationsfrequenz und Geschwindigkeit von Nasalepithel-Sphäroiden

Die Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide wird im verwendeten Modell als Äquivalent zur Transportgeschwindigkeit, mit der die Zilien in vivo den Schleim befördern, aufgefasst. Die Schleim-Transportgeschwindigkeit in der Nase von gesunden Menschen wird in der Literatur mit circa 8 mm/min angegeben, die Geschwindigkeit bei Patienten mit Mukoviszidose hingegen mit 4,5 mm/min (szintigraphisch unter Verwendung von mit Technetium markiertem, makroaggregiertem Humanalbumin) [2]. Mit wenigen Ausnahmen [52,

58] wird bei der Mukoviszidose eine Minderung der mukoziliären Clearance beschrieben [2, 70].

Die basale Rotationsfrequenz der Sphäroide lag bei $0,23 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Dies entsprach den in der Literatur zu findenden Werten für gesunde Probanden. Hierfür wurden Rotationsfrequenzen von $0,17 \text{ s}^{-1}$ [5] und $0,21 \text{ s}^{-1}$ [16] für Nasalepithel-Sphäroide angegeben. Die errechnete Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide ergab $4,38 \pm 0,45 \text{ mm/min}$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Dies lag in der Größenordnung des von Gamarra et al. [16] berechneten Werts für Nasalepithel-Sphäroide gesunder Probanden (Median $2,96 \text{ mm/min}$). Gamarra et al. weisen darauf hin, dass die Transportgeschwindigkeit im Sphäroidmodell womöglich nicht direkt mit Geschwindigkeitswerten in vivo verglichen werden kann, da die für die in vivo Messung verwendeten radioaktiv markierten Partikel eventuell selbst als Stimulus auf die Mukosa wirken. Andererseits könnten das für die Kultur der Sphäroide verwendete Medium und damit verbundene Viskositätsänderungen im die Sphäroide umhüllenden Schleim dazu führen, dass die im Sphäroidversuch bei Mukoviszidose gemessene Transportgeschwindigkeit höher als in vivo ausfällt. Auch ist die Temperatur in der Nase in vivo womöglich geringer als die in vitro verwendeten $37 \text{ }^\circ\text{C}$, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit in vitro führen könnte. Im Sphäroidmodell konnte somit im Vergleich mit Sphäroiden gesunder Probanden aus früheren Versuchen, aber auch im Vergleich mit in vivo Messungen, keine eindeutige Minderung des mukoziliären Transports bei Mukoviszidose nachgewiesen werden. Es ist aber zu betonen, dass nur eine vergleichende Messung von Proben von Probanden mit Mukoviszidose mit Proben gesunder Probanden im selben Versuchsansatz diese Frage definitiv beantworten kann.

4.2.3 Einfluss von γ -ATP auf die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden

Die Sphäroide wurden mit 0,5-millimolarem γ -ATP stimuliert, dabei resultierte ein statistisch signifikanter Anstieg der Rotationsfrequenz und der Transportgeschwindigkeit an der Sphäroid-Oberfläche. Etwa eine Minute nach der Stimulation kam es zu einem sprunghaften Anstieg von zirka $0,23 \text{ s}^{-1}$ auf $0,26 \text{ s}^{-1}$; dieser Effekt nahm kontinuierlich wieder ab, um nach zehn Minuten die Ausgangsfrequenz annähernd wieder zu erreichen.

Ein Anstieg der ziliären Schlagfrequenz bei gesunden Probanden nach Stimulation mit ATP ist aus der Literatur bekannt, allerdings wurden dort erheblich stärkere Anstiege geschildert. So berichteten Morse et al. [46] über einen Anstieg der ziliären Schlagfrequenz von 50 bis 100 % bei humanen nasalen Epithelzellen nach Stimulation mit ATP, Lieb et al. [39] über einen Anstieg von 37 % bei humanem trachealen Epithel. Korngreen und Priel [37] beschrieben einen Anstieg der ziliären Schlagfrequenz von zirka 140 % bei trachealen Zellen von Hasen nach Stimulation, Hayashi et al. [22] schilderten einen Anstieg von 40 % bei trachealem Epithel von Ratten. Dass diese Anstiege der ziliären Schlagfrequenz weitaus höher waren als der von uns bestimmte Anstieg der Transportgeschwindigkeit, könnte darin begründet sein, dass in der beschriebenen Literatur jeweils die Schlagfrequenzen der Zilien gemessen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Transportgeschwindigkeit der Sphäroide an ihrer Oberfläche, also die Transportfunktion des respiratorischen Epithels gemessen. Die isoliert betrachtete ziliäre Schlagfrequenz – ohne Berücksichtigung der Koordination und Effektivität des Zilienschlages – und die Transportfunktion des Epithels müssen jedoch nicht korreliert sein [34, 62], da mukoziliärer Transport einer koordinierten Zilienaktion bedarf.

Allerdings wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits früher Versuche mit Sphäroiden gesunder Probanden sowie Allergikern durchgeführt, hierbei wurde der Einfluss von Interleukin 13 auf die mukoziliäre Funktion nach Stimulation mit ATP untersucht. Bei Allergikern konnte kein wesentlicher Einfluss von ATP auf die mukoziliäre Funktion nachgewiesen werden, jedoch bewirkte eine Stimulation mit ATP bei den Sphäroiden gesunder Probanden eine Beschleunigung der Rotationsfrequenz um circa 80 %. Da die Beschleunigung der Sphäroide von Probanden mit Mukoviszidose – obgleich statistisch signifikant – im Vergleich hierzu sehr viel geringer ausfiel, würde dies eine verminderte Stimulierbarkeit des nasalen Epithels von Probanden mit Mukoviszidose nahe legen. Eine direkte Vergleichbarkeit besteht jedoch nicht, da in den beschriebenen früheren Versuchen kein γ -ATP, sondern freies Disodium-ATP verwendet wurde.

Eine Aussage, ob nasales Epithel von Probanden mit Mukoviszidose eine mukoziliäre Dysfunktion aufweist, kann in dieser Arbeit aber nicht getroffen werden. Zwar zeigten sich die Sphäroide als stimulierbar – und der Anstieg von Rotationsfrequenz und Transportgeschwindigkeit war statistisch signifikant – jedoch müsste dies mit dem Verhalten von Sphäroiden gesunder Probanden unter hinsichtlich der verwendeten Antibiotika und des ATP gleichen Bedingungen verglichen werden, um Unterschiede im Grad der Stimulierbarkeit zu untersuchen.

4.2.4 Zusammenhang der Geschwindigkeit der Sphäroide mit der FEV₁

Es sollte ein möglicher Zusammenhang der Geschwindigkeit der Sphäroide als Maßstab für die ziliäre Funktion mit der FEV₁ als Maßstab für die Lungenfunktion der Probanden untersucht werden. Wir erwarteten einen positiven Zusammenhang, dass also ein Proband mit besserer Lungenfunktion auch eine bessere ziliäre Funktion aufweisen würde.

Zur Messung des Zusammenhangs zwischen der Lungenfunktion und der ziliären Funktion der Probanden wurde zwischen der basalen Geschwindigkeit der Sphäroide (exemplarisch gemessen bei -0,5 Minuten, es wurde der Mittelwert aus allen ausgewerteten Sphäroiden eines Probanden gebildet) und der FEV₁ der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Dieser Korrelationskoeffizient wurde gewählt, weil er weniger ausreißerempfindlich ist. Mit einem Wert von -0,071 lag er nahe bei null und deutete somit darauf hin, dass kein monotoner Zusammenhang zwischen mukoziliärer Funktion und Lungenfunktion bestand. Problematisch hierbei war allerdings, dass die Anzahl der Beobachtungen sehr gering war, da hierbei nicht die Werte für die einzelnen Sphäroide herangezogen werden konnten, sondern die Mittelwerte für die jeweiligen Probanden verwendet werden mussten. Einer der Probanden wies bei geringer Geschwindigkeit der Sphäroide eine sehr hohe FEV₁ auf. Dieser Ausreißer wäre bei einer höheren Anzahl der Probanden weniger stark ins Gewicht gefallen beziehungsweise hätte für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten vernachlässigt werden können. Dann wäre für die restlichen Werte ein eindeutig positiver Zusammenhang zu verzeichnen gewesen. In Anbetracht der geringen Fallzahl trug jedoch dieser eine Proband einen nicht unerheblichen Teil zur Gesamtinformation bei und konnte somit nicht – wie bei einer größeren Anzahl an Probanden üblich – weggelassen werden. Somit müsste, um eine bessere Aussage hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Lungenfunktion und ziliärer Funktion treffen zu können, eine größere Anzahl an Probanden einbezogen werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, durch eine optimierte Antibiotika-Kombination das Resultat der Sphäroidkultur aus nasalem Epithel bei Patienten mit Mukoviszidose zu verbessern. Dazu wurde die herkömmliche Mischung aus Penicillin und Streptomycin mit einer Kombination aus Ceftazidim, Vancomycin und Tobramycin bezüglich der Kontamination und der Bildung rotierender Sphäroide verglichen. Außerdem wurden anhand der Nasalepithel-Sphäroide die mukoziliäre Funktion und ihre Stimulierbarkeit durch ATP untersucht.

Nasalepithel-Sphäroide sind kugelförmige Konglomerate mit einem zystischen Lumen, die sich in Kultur nach zirka einem Tag aus Nasalepithel zusammenlagern. Für die Kultur der Sphäroide wurde nasales Epithel von Probanden mit Mukoviszidose per Bürstenabstrich entnommen und in Flüssigmedium kultiviert. Die Hülle der Sphäroide besteht aus respiratorischem Epithel, die apikale Seite der Zellen weist nach außen, die basale zur Mitte. Das hohle Innere füllt sich mit Flüssigkeit. Aufgrund der koordiniert schlagenden Zilien am apikalen Pol der Nasalepithelzellen kommt es zu einer Rotation der Nasalepithel-Sphäroide um ihre eigene Achse. Aus der Rotationsfrequenz wurde die Transportgeschwindigkeit an der Sphäroid-Oberfläche berechnet; diese wurde als Parameter für die mukoziliäre Funktion genommen.

Zum Vergleich der Wirksamkeit der Antibiotika-Kombinationen wurde das Zellmaterial aus dem Nasalepithel jedes Probanden aufgeteilt. Der eine Teil wurde mit Penicillin/Streptomycin, der andere mit Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin kultiviert. Letztere Kombination wurde gewählt, da sie eine gute Wirksamkeit bei chronisch infiziertem Respirationstrakt aufweist. Die Zellkulturen wurden hinsichtlich der Kontamination und der Bildung von Sphäroiden verglichen. Dann wurde die basale Rotationsfrequenz der Sphäroide gemessen, daraus die Transportgeschwindigkeit errechnet sowie die Stimulierbarkeit mit γ -ATP untersucht. ATP wurde verwendet, da es als Stimulus auf die mukoziliäre Funktion wirkt.

5.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Kulturen mit Penicillin/Streptomycin waren alle kontaminiert, sodass bis auf eine Ausnahme keine Sphäroide beobachtet werden konnten. Die Kulturen mit Ceftazidim/Vancomycin/Tobramycin waren nie sichtbar kontaminiert, es bildete sich in 93 % der Proben Sphäroide, in 47 % rotierende Sphäroide.

Die Rotationsfrequenz (unstimuliert) und daraus errechnete Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide lag in den Größenordnungen der Werte, die in unserer Arbeitsgruppe in früheren Versuchen für Nasalepithel-Sphäroide gesunder Probanden gemessen wurden.

Nach Stimulation der Sphäroide mit 0,5-millimolarem γ -ATP kam es zu einem signifikanten Anstieg von Rotationsfrequenz und Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide.

Ein vermuteter Zusammenhang zwischen Rotationsfrequenz der Sphäroide und FEV₁ der entsprechenden Patienten konnte bei mutmaßlich zu geringer auswertbarer Probenzahl nicht nachgewiesen werden.

5.3 Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse zeigen, dass – unter der Verwendung entsprechend wirksamer Antibiotika – Sphäroidkulturen von Patienten mit Mukoviszidose mit guten Resultaten gewonnen werden können. Die Nasalepithel-Sphäroid-Methode scheint grundsätzlich geeignet, die mukoziliäre Funktion bei Mukoviszidose und ihre Beeinflussbarkeit durch Stimulanzen zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Al-Batran, S. E., Astner, S. T., Supthut, M., Gamarra, F., Brueckner, K., Welsch, U., Knuechel, R., Huber, R. M.: Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma, *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, 21(2):200-208.
2. Armengot, M., Escribano, A., Carda, C., Sánchez, C., Romero, C., Basterra, J.: Nasal mucociliary transport and ciliary ultrastructure in cystic fibrosis. A comparative study with healthy volunteers, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1997, 40:27-34.
3. Barrera, N. P., Morales, B., Villalón, M.: Plasma and intracellular membrane inositol 1,4,5-triphosphate receptors mediate the Ca²⁺ increase associated with the ATP-induced increase in ciliary beat frequency, *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2004, 287:1114-1124.
4. Boucher, R. C.: New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease, *Eur Respir J* 2004, 23:146-158.
5. Bridges, M. A., Walker, D. C., Harris, R. A., Wilson, B. R., Davidson, A. G. F.: Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues, *Biochem Cell Biol* 1991 Feb-Mar, 69 (2-3):102-108.
6. Button, B., Picher, M., Boucher, R. C.: Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia, *J Physiol* 2007, 580(Pt. 2):577-592. Epub 2007 Feb 22.
7. Chmiel, J. F., Davis, P. B.: State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?, *Respir Res* 2003; 4:8. Epub 2003 Aug 27.
8. Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K., Berdel, W. E., Böhm, M., Schmiegel, W. (Hrsg.): *Innere Medizin*, 5. Aufl., 2006.

9. Corssen, G., Allen, C.: Comparison of toxic effects of various local anesthetic drugs on human ciliated epithelium in vitro. *Tex Rep Biol & Med* 1958, 16:194.
10. Corssen, G., Allen, C.: Cultured human respiratory epithelium: its use in the comparison of the cytotoxic properties of local anesthetics. *Anesthesiology* 1960, 21:237-243.
11. Cowley, E. A., Wang, C-G., Gosselin, D., Radzioch, D., Eidelman, D. H.: Mucociliary clearance in cystic fibrosis knockout mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur Respir J* 1997, 10:2312-2318.
12. Devalia, J. L., Sapsford, R. J., Rusznak, C., Toumbis, M. J., Davies, R. J.: The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro, *Pulm Pharmacol* 1992, 5(4):257-263.
13. Di Benedetto, G., Manara-Shediac, F. S., Metha, A.: Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium, *Eur Respir J* 1991, 4:789-795.
14. Donaldson, S. H., Corcoran, T. E., Laube, B. L., Bennett, W. D.: Mucociliary Clearance as an Outcome Measure for Cystic Fibrosis Clinical Research, *Proc Am Thorac Soc* 2007, Vol 4. pp 399–405.
15. Fulcher, M. L., Gabriel, S., Burns, K. A., Yankaskas, J. R., Randell, S. H.: Well-differentiated human airway epithelial cell cultures, *Methods Mol Med* 2005, 107:183-206.
16. Gamarra, F., Bergner, A., Stauss, E., Stocker, I., Grundler, S., Huber, R. M.: Rotation frequency of human bronchial and nasal epithelial spheroids as an indicator of mucociliary function, *Respiration* 2006, 73(5):664-672.
17. Gilain, L., Zahm, J. M., Pierrot, D., Fuchey, C., Peynegre, R., Puchelle, E.: Nasal epithelial cell culture as a tool in evaluating ciliary dysfunction, *Acta Otolaryngol* 1993, 113:772-776.

18. Grubb, B. R., Jones, J. H, Boucher, R. C.: Mucociliary transport determined by in vivo microdialysis in the airways of normal and CF mice, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286:L588-L595.
19. Grygorczyk, R., Hanrahan, J. W.: CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli. *Am J Physiol* 1997, 272(3 Pt 1):C1058-C1066.
20. Hanamure, Y., Deguchi, K., Ohya, M.: Ciliogenesis and mucus synthesis in cultured human respiratory epithelial cells, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994, 103(11):889-895.
21. Haxel, B. R., Schäfer, D., Klimek, L., Mann, W. J.: Prostaglandin E2 activates the ciliary beat frequency of cultured human nasal mucosa via the second messenger cyclic adenosine monophosphate, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001, 258:230-235.
22. Hayashi, T., Kawakami, M., Sasaki, S., Katsuma, T., Mori, H., Yoshida, H., Nakahari, T.: ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium, *Experimental Physiology* 2005, 90:535-544.
23. Helleday, R., Huberman, D., Blomberg, A., Stjernberg, N., Sandström, T.: Nitrogen dioxide exposure impairs the frequency of the mucociliary activity in healthy subjects, *Eur Respir J* 1995, 8 (10):1664-1668.
24. http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/products/display_product.php?keyID=194 [Stand: 1.10.2007].
25. <http://www.promocell.com/en/Navigate/product0.php3?target1=56&lang=US> [Stand: 1.10.2007].
26. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/A1388> [Stand 26.07.2008].
27. Ingels, K. J. A. O., Kortmann, M. J. W., Nijziel, M. R., Graamans, K., Huizing, E. H.: Factors influencing ciliary beat measurements, *Rhinology* 1991, 29(1):17-26.

28. Jackson, A. D., Rayner, C. F., Dewar, A., Cole, P. J., Wilson, R.: A human respiratory-tissue organ culture incorporating an air interface, *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153(3):1130-1135.
29. Jorissen, M., Van der Schueren, B., Tyberghein, J., Van den Berghe, H., Cassiman, J. J.: Ciliogenesis and coordinated ciliary beating in human nasal epithelial cells cultured in vitro, *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1989, 43(1):67-73.
30. Jorissen, M., Van der Schueren, B., Van den Berghe, H., Cassiman, J. J.: The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro, *Arch Otorhinolaryngol* 1989, 246(5):308-314.
31. Jorissen, M., Van der Schueren, B., Van den Berghe, H., Cassiman, J. J.: Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract, *Eur Respir J* 1991 Feb; 4(2):210-207.
32. Jorissen, M., Van der Schueren, B., Van den Berghe, H., Cassiman, J. J.: In vitro ciliogenesis in respiratory epithelium of cystic fibrosis patients, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991, 100:366-371.
33. Jorissen, M., Bessems, A.: Influence of culture duration and ciliogenesis on the relationship between ciliary beat frequency and temperature in nasal epithelial cells, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995, 252:451-454.
34. Jorissen, M.: Correlations among mucociliary transport, ciliary function, and ciliary structure, *Am J Rhinol* 1998, 12:53-58.
35. Kellerman, D. J.: P2Y₂ receptor agonists. A new class of medication targeted at improved mucociliary clearance, *Chrst* 2002; 121:201S-205S.
36. Kienast, K., Riechelmann, H., Knorst, M., Haffner, B., Muller-Quernheim, J., Schellenberg, J., Ferlinz, R.: Combined exposures of human ciliated cells to different concentrations of sulfur dioxide and nitrogen dioxide, *Eur J Med Res* 1996, 20;1(11):533-536.

37. Korngreen, A., Priel, Z.: Purinergic stimulation of rabbit ciliated airway epithelia: control by multiple calcium sources, *Journal of Physiology* 1996, 497.1:53-66.
38. Lansley, A. B., Sanderson, M. J.: Regulation of airway ciliary activity by Ca^{2+} : simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca^{2+} , *Biophysical Journal* 1999, 77:629-638.
39. Lieb, T., Wijkstrom Frei, C., Frohock, J. I., Bookman, R. J., Salathe, M.: Prolonged increase in ciliary beat frequency after short-term purinergic stimulation in human airway epithelial cells, *Journal of Physiology* 2002, 538.2:633-646.
40. Lindberg, S., Runer, T.: Method for in vivo measurement of mucociliary activity in the human nose, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994, 103:558-566.
41. Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C.: *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Aufl., 2002.
42. Lopez-Vidriero, M. T., Jacobs, M., Clarke, S. W.: The effect of isoprenaline on the ciliary activity of an in vitro preparation of rat trachea, *Eur J Pharmacol.* 1985, 19;112(3):429-32.
43. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Pharmakologie und Toxikologie*, 16. Aufl., 2006.
44. Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J. T., Davis C. W., Boucher, R. C.: Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease, *Cell* 1998, 95:1005–1015.
45. McShane, D., Davies, J. C., Wodehouse, T., Bush, A., Geddes, D., Alton, E. W. F. W.: Normal nasal mucociliary clearance in CF children: evidence against a CFTR-related defect, *Eur Respir J* 2004, 24:95-100.
46. Morse, D. M., Smullen, J. L., Davis, C. W.: Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells, *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2001, 280: C1485-C1497.

47. Neugebauer, P., Endepols, H., Mickenhagen, A., Walger, M.: Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003, 260:325-330.
48. Olseni, L., Wollmer, P.: Immediate effects of ethanol on mucociliary clearance in healthy men, *Respiration* 1992, 59 (3):151-154.
49. Pedersen, P. S., Frederiksen, O., Holstein-Rathlou, N., Larsen, P., Qvortrup, K.: Ion transport in epithelial spheroids derived from human airway cells, *Am J Physiol* 1999, 276(1 Pt 1):L75-80.
50. Pedersen, P. S., Holstein-Rathlou, N., Larsen, P., Qvortrup, K., Frederiksen, O.: Fluid absorption related to ion transport in human airway epithelial Spheroids, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999, 277:1096-1103.
51. Randell, S. H., Walstad, D. L., Schwab, U. E., Grubb, B. R., Yankaskas, J. R.: Isolation and culture of airway epithelial cells from chronically infected lungs, *In Vitro Cell Dev Biol – Animal* 2001, 37:480-489.
52. Rautiainen, M., Matsune, S., Yoshitsugu, M., Ohyama, M.: Degeneration of human respiratory cell ciliary beat in monolayer cell cultures, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993, 250(2):97-100.
53. Rayner, C. F. J., Rutman, A., Dewar, A., Cole, P. J., Silson, R.: Ciliary disorientation in patients with chronic upper respiratory tract inflammation, *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:800-804.
54. Reimer, A., Hakansson, C. H., Mercke, U., Toremalm, N. G.: The mucociliary activity of the upper respiratory tract. I. A method for use in experimental studies on human material, *Acta Otolaryngol* 1977 May-Jun, 83(5-6):491-497.
55. Riechelmann, H., Kienast, K., Schellenberg, J., Mann W. J.: An in vitro model to study effects of airborne pollutants on human ciliary activity, *Rhinology* 1994, 32:105-108.

56. Robson, A. M., Smallman, L. A., Drake-Lee A. B.: Factors affecting ciliary function in vitro: a preliminary study, *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1992, 17(2):125-129.
57. Roth, Y., Aharonson, E. F., Teichtahl, H., Baum, G. L., Priel, Z., Modan, M.: Human in vitro nasal and tracheal ciliary beat frequencies: comparison of sampling sites, combined effect of medication, and demographic relationships, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991, 100:378-384.
58. Sanchis, J., Dolovich, M., Rossman, C. Wilson, W., Newhouse, M.: Pulmonary mucociliary clearance in cystic fibrosis, *N Engl J Med* 1973, 288:651-654.
59. Schuil, P. J., Rosmalen, J. G., Graamans, K., Huizing, E. H.: Calcitonin gene-related peptide in vitro stimulation of ciliary beat in human upper respiratory cilia, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995, 252(8):462-464.
60. Schuil, P. J., Ten Berge, M., Van Gelder, J.M., Graamans, K., Huizing, E. H.: Effects of prostaglandins D2 and E2 on ciliary beat frequency of human upper respiratory cilia in vitro, *Acta Otolaryngol* 1995 May, 115(3):438-442.
61. Schuil, P. J., Ten Berge, M., Van Gelder, J. M., Graamans, K., Huizing, E. H.: Substance P and ciliary beat of human upper respiratory cilia in vitro, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995 Oct 104(10 Pt 1):798-802.
62. Seybold, Z. V., Mariassy, A. T., Stroh, D., Kim, C. S., Gazeroglu, H., Wanner, A.: Mucociliary interaction in vitro: effects of physiological and inflammatory stimuli, *J Appl Physiol* 1990 Apr, 68(4):1421-1426.
63. Simon, H., Drettner, B., Jung, B.: Messung des Schleimhauttransportes in menschlichen Nase mit ⁵¹Cr markierten Harzkügelchen, *Acta Otolaryngol* 1977, 83:378-390.
64. Stannard, W., O'Callaghan, C.: Ciliary function and the role of cilia in clearance, *Journal of Aerosol Medicine* 2006, 19(1):110-115.

65. Tamaoki, J., Chiyotani, A., Sakai, N., Konno, K.: Stimulation of ciliary motility mediated by atypical β -adrenoceptor in canine bronchial epithelium, *Life Sci* 1993, 53(20):1509-15.
66. Tamaoki, J., Chiyotani, A., Takemura, H., Konno, K., Matsumoto, T., Ashida, Y.: Stimulation of airway mucociliary transport and epithelial ciliary motility by the triazolopyridazin derivate TAK-225, *J Pharmacol Exp Ther* 1997 Jun, 281(3):1186-90.
67. Tarasiuk, A., Bar-Shimon, M., Gheber, L., Korngreen, A., Grosman, Y., Priel, Z.: Extracellular ATP induces hyperpolarization and motility stimulation of ciliary cells, *Biophysical Journal* 1995 March, 68(3):1163-1169.
68. Thomas, A., Petro, W., Konietzko, N.: Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmik der Schlagfrequenz menschlicher Nasenzilien bei Lungengesunden und Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Einschließlich der adrenergen Stimulation durch Terbutalin, *Pneumologie*, 1993 Sep, 47(9):526-30.
69. Welsch, U.: *Lehrbuch Histologie*, 1. Aufl., 2003.
70. Wood, R. E.; Wanner, A., Hirsch, J., Farrell, P. M.: Tracheal mucociliary transport in patients with cystic fibrosis and its stimulation with terbutaline, *Am Rev Res Dis* 1975, 111:733-738.
71. Yoshitsugu, M., Rautiainen, M., Matsune, S., Nuutinen, J., Ohyama, M.: Effect of exogenous ATP on ciliary beat of human ciliated cells studied with differential interference microscope equipped with high speed video, *Acta Otolaryngol* 1993 Sep, 113(5):655-9.
72. Zhang, L., Sanderson, M. J.: Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP, *The Journal of Physiology* 2003, 546:733-749.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. R. M. Huber, Leiter der Abteilung Pneumologie, Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt der LMU München, für das interessante Thema und seine freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. F. Gamarra für die Betreuung dieser Arbeit und seine Unterstützung bei Fragen und Problemen bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich an die Mitarbeiter des Labors und die anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe richten. Besonders bedanke ich mich bei Isabel Danzer für die schöne und intensive Zusammenarbeit.

Ebenfalls danken möchte ich allen Patienten, die mir Proben ihrer Nasenschleimhaut für diese Arbeit zur Verfügung stellten.

Zuletzt möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, für ihre stetige Unterstützung und Hilfe nicht nur bei dieser Arbeit.

Lebenslauf

Christoph Kellermann

geboren am 30. August 1978 in Waldkirchen
römisch-katholisch
ledig

Ausbildung

- 04/2005 – 05/2009 **Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt)**
an der Technischen Universität München;
Abschluss: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Praktisches Jahr 02/2008 – 01/2009:
Innere Medizin im Krankenhaus Barmherzige Brüder, München
Diagnostische Radiologie im Klinikum Rechts der Isar, München
Chirurgie im Rotkreuzklinikum, München
- Famulaturen:
Orthopädie, Praxis Dr. Alexander Schmitt, München (09/2007)
Radiologie, Klinikum Augsburg (03/2007)
Dermatologie, Klinikum Rechts der Isar, München (02/2006)
Innere Medizin, Klinikum Bogenhausen, München (09/2005)
- 03/2003 – 03/2005 **Studium der Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt)**
an der Ludwig-Maximilians-Universität München;
Abschluss: Ärztliche Vorprüfung
- Krankenpflegepraktika:
Chirurgie, Krankenhaus Waldkirchen (03/2004)
Augenheilkunde, Klinikum Rechts der Isar, München (03/2003)
- 11/1998 – 02/2003 **Studium der Betriebswirtschaftslehre**
an der Ludwig-Maximilians-Universität München;
Abschluss: Diplom-Kaufmann
- Auslandsaufenthalt 2001/2002 für zwei Trimester an der École de Management Lyon, Frankreich
- 06/1997 **Stipendium für besonders Begabte des Bundeslandes Bayern**
- 09/1984 – 06/1997 **Schulische Ausbildung**
Grundschule und Johannes-Gutenberg-Gymnasium in Waldkirchen;
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufspraxis

Seit 01/2010	Assistenzarzt im Städtischen Klinikum München Neuperlach, Abteilung für Radiologie und Nuklearmedizin
10/2009 – 12/2009	Assistenzarzt im Deutschen Herzzentrum München, Abteilung für Radiologie und Nuklearmedizin
08/2003 – 06/2008	Freier Mitarbeiter und Werkstudent bei der Siemens AG/Bereich Corporate Technology, München und Erlangen
04/2003 – 12/2003	Studentischer Mitarbeiter in der Schmerzambulanz am Klinikum Großhadern, München
08/1997 – 08/1998	Zivildienst im Caritas-Altenheim St. Nikolaus, München