

Die Wirkung von Bronchospasmolytika auf die Ciliarfrequenz in vitro *

N. Konietzko, R. Kasperek, U. Kellner, J. Petro

Ruhrländklinik Essen-Heidhausen

In-Vitro Study of the Effect of Bronchospasmolytic Agents on the Ciliary Beat Frequency

The frequency of the ciliary beat (CF) and how it is affected by drugs can be studied in vitro in biopsy-derived nasal and bronchial mucosa by means of the phase contrast microscope. In a perfusion chamber the effects of increasing drug concentrations can be registered as dose-response curves. Tests made with bronchospasmolytic agents showed a dose-dependent increase in CF for isoprenaline and terbutaline after blocking of the α -adrenergic receptors. An increase in CF up to a maximum of 19 per cent was also demonstrable for the relatively selective β_2 -adrenergic agonists reproterol and clenbuterol when applied to the nasal mucosa of normal persons or to the bronchial mucosa of persons with chronic bronchitis. Theophyllin-ethylene-diamine and ipratropium bromide also slightly increased CF. The raised CF may be accompanied by more effective mucociliary clearance. In-vitro studies are a suitable means of pre-testing drugs, especially those intended for the treatment of respiratory disorders.

Zusammenfassung

Die Ciliarfrequenz (CF) bioptisch entnommener Schleimhaut des Respirationstraktes (Nasenschleimhaut/Bronchusmukosa) und ihre pharmakologische Beeinflussung läßt sich in vitro unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmen. In einer Perfusionskammer lassen sich unter steigender Pharmakonzentration Dosiswirkungskurven erstellen. Die Testung bronchospasmolytisch wirksamer Medikamente zeigt eine dosisabhängige Steigerung der CF für Isoprenalin und Terbutalin nach Blockade der α -adrenergen Rezeptoren. Eine Steigerung CF bis maximal 19% läßt sich auch für die relativ selektiven β_2 -adrenergen Agonisten Reproterol und Clenbuterol sowohl an Nasenschleimhaut von gesunden Probanden wie auch an Bronchusmukosa von Patienten mit chronischer Bronchitis nachweisen. Eine geringe Frequenzsteigerung findet sich auch bei Theophyllin-Ethylendiamin und Ipratropiumbromid. Die Steigerung der CF geht parallel mit einer effektiveren mukoziliären Klärrate, wie sie in der Literatur bei Normalpersonen und Bronchitikern berichtet wird. Sie stellt ein praktikables Instrument dar zur Vortestung von Medikamenten, insbesondere solcher, die bei der Behandlung von Atemwegserkrankungen zur Anwendung kommen.

* Mit Unterstützung der „Arbeitsgemeinschaft zur Förderung der Pneumologie an der Ruhrländklinik e. V.“

Einleitung und Fragestellung

Die mukoziliäre Klärfunktion ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels bestimmter zellulärer Elemente mit dem sie umgebenden Sekret (Tab. 1). Medikamente beeinflussen dieses System in mannigfacher Weise. Bronchospasmolytika führen, soweit untersucht, im allgemeinen zu einer Verbesserung des mukoziliären Transports (Wanner 1977, Melville und Iravani 1980). Allerdings ist die Bestimmung der mukoziliären Klärfunktion in vivo beim Menschen methodisch nicht unproblematisch – dies insbesondere bei Patienten mit chronischer Bronchitis. Gerade hier wäre es wünschenswert, mit einem einfachen in vitro-Test den Einfluß von Medikamenten auf das Selbstreinigungssystem der Lunge zu testen. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, inwieweit sich der Einfluß von Pharmaka auf die Ciliarfrequenz menschlicher Mukosa – „pars pro toto“ – bestimmen läßt und inwieweit ein Rückschluß auf die mukoziliäre Klärfunktion aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen möglich ist.

Tab. 1 Mukoziliäres Klärsystem – Einzelfaktoren

1. Cilie	
1.1 Kinetik	
-	– Frequenz
-	– Länge
-	– Inotropie
-	– Schlagmuster
1.2 Koordination	
2. Mukus	
2.1 Quantität	
2.2 Qualität	
-	– Viskosität
-	– Elastizität
-	– Schichtung
3. MC-Koppelung	

Methode

In Weiterentwicklung einer Methode, die von Yager et al. (Yager et al. 1978) beschrieben wurde, wird über eine Bronchusbürste Epithel entweder bronchoskopisch aus der Bronchialschleimhaut oder ohne Lokalanästhesie direkt

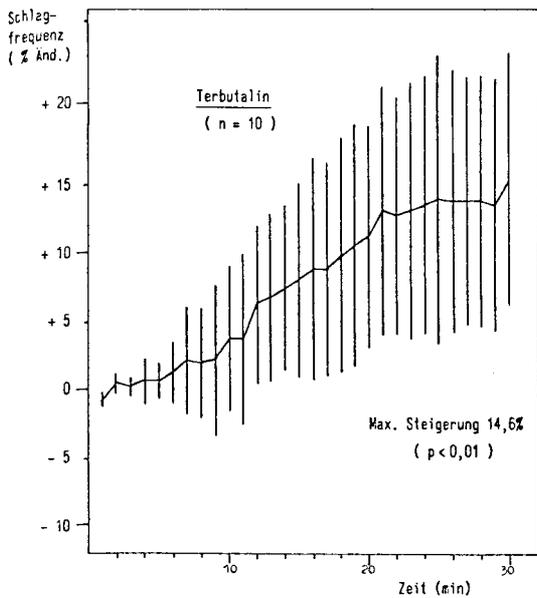


Abb. 1a

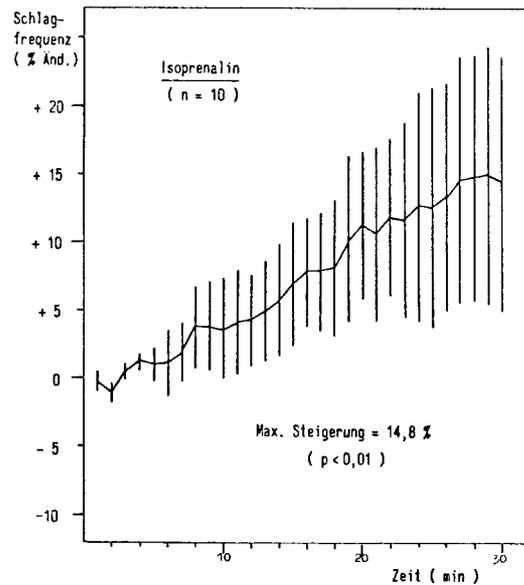


Abb. 1b

Abb. 1a und b Schlagfrequenzänderung unter steigenden Konzentrationen von Isoprenalin und Terbutalin nach vorheriger Blockade der α -adrenergen Rezeptoren durch Phentolamin.

aus der Nasenschleimhaut entnommen. Die Bürste wird in einem Nähmedium durch Schütteln von Zellen befreit und in Form einer „hängenden Tropfenpräparation“ mit einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Sobald schlagende Zilien gesehen werden – dies ist bei Normalpersonen immer der Fall – wird ein winziger Lichtstrahl in den Bereich der schlagenden Zelle oder einer Zellgruppe manipuliert und die durch den Zilienschlag bedingten Unterbrechungen des Lichtstrahls über eine Photozelle gemessen. Die Schlagfrequenz kann dann direkt über ein Speicheroszilloskop oder einen schnellen Schreiber registriert und ausgezählt werden (Konietzko et al. 1981). Für pharmakologische Testungen wird unter konstanter Einhaltung von Temperatur und pH, welche beide einen großen Einfluß auf die Ciliarfrequenz ausüben (Hesse et al. 1980), auf zweierlei Weise vorgegangen: Entweder wird bei der punktförmigen Messung Schleimhaut in die zu testende Lösung mit dem Pharmakon gegeben und ein zweiter Teil in eine Vergleichslösung ohne Medikament und in beiden Proben die Frequenz über die Zeit – gewöhnlich 30 Minuten – verfolgt (Hesse et al. 1981). Oder es wird das zu untersuchende Biopsiesample in eine Perfusionskammer eingebracht, welche sich über einen kapillaren Zu- und Abfluß konstant durchströmen läßt. Man wählt die Druckflußverhältnisse so, daß die markierte Zelle nicht davongeschwemmt wird, das Strömungsprofil sich gleichmäßig über die Kammer verteilt und die Strömung groß genug ist, um Unschärfen in der Front der Pharmakonzentration infolge Diffusion zu vermeiden; so läßt sich ein kontinuierlicher Konzentrationsgradient als Funktion der Zeit annehmen. Die zur Erzielung einer steigenden Konzentration erforderliche Mischeinrichtung besteht aus einem Vorratsgefäß mit der pharmakonhaltigen Lösung und einem Mischgefäß, welches die wirkstofffreie Nährlösung enthält. Aus diesem Mischgefäß wird die Lösung mit konstanter Geschwindigkeit in eine

Tab. 2 Einfluß von Bronchospasmolytika auf Mucociliartransport (MCT) und Ciliarfrequenz (CF) † = Steigerung, = = keine Änderung, (†) = geringe Steigerung, †/↓ = dosisabhängige Zu- und Abnahme

Bronchospasmolytikum	Normalpersonen MCT/CF		Bronchitiker MCT/CF	
Isoprenalin	†	†	†	/= †
Terbutalin	†	†	†	/= †
Theophyllin	†	†	†	†
Ipratropiumbromid	=	(†)	†/↓	(†)

Kammer gepumpt; durch entsprechende Wahl der Volumina und der Flußgeschwindigkeit erreicht man ein zeitlineares Ansteigen der Konzentration des Pharmakons in der Perfusionskammer. Der Vorteil der Methode liegt darin, daß man ein und dieselbe Zilie, bzw. ein und denselben Zilienkomplex unter kontinuierlich steigender Pharmakonkonzentration beobachten kann. Der Nachteil ist darin zu sehen, daß infolge unbekannter Ansprechzeit des Ziliarapparates auf unterschiedliche Konzentrationen des Pharmakons eine Parallelverschiebung der Dosiswirkungskurve auftreten kann. Dies läßt sich jedoch durch zusätzliche punktförmige Messung mit einer konstanten Pharmakonkonzentration „nachkalibrieren“.

Ergebnisse

Untersucht wurden die folgenden Bronchospasmolytika:

1. β -Sympathomimetika
2. Theophyllin-Äthylendiamin
3. Ipratropiumbromid.

Die Dosiswirkungskurven wurden generell an Nasenmukosa von Gesunden erstellt, die punktförmigen Pharmakatestungen erfolgten an Bronchialschleimhaut von Patienten mit bronchopulmonalen Erkrankungen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 und Tab. 2 zusammengefaßt.

Diskussion

Übereinstimmend mit allen Voruntersuchungen — sowohl bei verschiedenen Tierspezies wie auch bei Menschen, in vivo wie in vitro — fand sich auch mit der hier angewandten Methodik eine signifikante Steigerung der Ciliarfrequenz unter β -adrenerger Stimulation (Foster et al. 1975, Konietzko et al. 1975). Nach alpha-adrenerger Blockade durch Phentolamin findet sich praktisch die gleiche Steigerungsrate für Isoprenalol und Terbutalin, was den Rückschluß auf eine spezifische β_2 -adrenerge Stimulation der Ciliarfrequenz zuläßt (Kellner 1982). Auch an der Bronchusmukosa von Kranken läßt sich in vitro eine Stimulation mit sämtlichen getesteten β -Adrenergika nachweisen. Dies gelingt in vivo bei der Bestimmung der mukocilaren Klärfunktion nicht immer. Diese Diskrepanz erklärt sich jedoch zwanglos aus der Tatsache, daß bei Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden der chronischen Bronchitis die Schleimhaut unterschiedlich starken morphologischen Umbau zeigt. Es ist verständlich, daß bei ausgedehnten Epithelmetaplasien und Epitheldysplasien eine β -Stimulation auf das „mukocilare Rollband“ nicht mehr wirken kann.

Für die Xanthinderivate gilt Analoges (Köhler et al. 1981).

Ipratropiumbromid stimuliert, zumindest in niedriger Konzentration, die Ciliarfrequenz signifikant. In vivo wird bei Bestimmung der mukocilaren Klärfunktion unter Ipratropiumbromid bei Patienten mit chronischer Bronchitis sowohl eine Verlangsamung als auch eine Beschleunigung beobachtet. Die Erklärung für das unterschiedliche

Ansprechen in vivo könnte in einer unterschiedlichen Schichtung des Schleimgels (Sol-Gel-Phase) liegen (Pavia et al. 1979).

Literatur

- 1 Foster, W.M., R.E. Albert, M. Lippmann, D. Bohning, E.H. Bergofsky: Effect of adrenergic agents and their mode of action on clearance of mucus from human airways. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 111 (1975) 909
- 2 Hesse, H., R. Kasperek, W. Mizera, Ch. Unterholzner, N. Konietzko: Influence of Reproterol on Ciliary beat Frequency of Human Bronchial Epithelium in vitro. *Arzneim. Forsch./Drug-Res.* 31 (1981) 716
- 3 Köhler, D., J. Fischer, K.H. Rühle, H. Wokalek, J. Holzer, H. Matthys: Einfluß von Aminophyllin auf die mucociliare Clearance der Lunge bei Patienten mit Asthenospermie. In *Druck*
- 4 Konietzko, N., M. Klopfer, W.E. Adam, H. Matthys: Die mukoziliare Klärfunktion der Lunge unter betaadrenerger Stimulation. *Pneumologie* 152 (1975) 302
- 5 Konietzko, N., J.A. Nakhosteen, W. Mizera, R. Kasperek, H. Hesse: Ciliary beat frequency of biopsy samples taken from normal persons and patients with various lung diseases. *Chest* 80 S (1980) 855
- 6 Konietzko, N., J. Steffen, U. Keller, R. Kasperek: Methodik zur in vitro Bestimmung der pharmakologischen Beeinflussung menschlicher Zilien. Vortrag beim Arbeitsgespr. „Lunge + Atmung“, 26.1. bis 1.3.82 in Rovaniemi, Finnland
- 7 Müller, M., N. Konietzko, W.E. Adam, H. Matthys: Die mukoziliare Clearance der Lunge: Untersucht mit radioaktiv markiertem Schwefelkolloid. *Klin. Wschr.* 53 (1975) 815
- 8 Pavia, D., J. Roderick, M. Bateman, N.F. Sheahan, St. W. Clarke: Effect of ipratropium bromide on mucociliary clearance and pulmonary function in reversible airways obstruction. *Thorax* 34 (1979) 501–507
- 9 Wanner, A.: Clinical aspects of mucociliary transport. *Am. Rev. Resp. Dis.* 116 (1977) 73–125
- 10 Yager, J., T.M. Chen, M.J. Sulano: Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium. *Chest* 73 (1978) 627–633