

3. Material und Methode

3.1. Material

Die verwendeten Reagenzien wurden von den in Klammern aufgeführten Herstellern bezogen:

- RPMI 1640 Kulturmedium, HBSS, fetales Kälberserum, Penicillin und Streptomycin (SIGMA, Steinheim)
- Trypanblau (ICN, Eschwege)
- Türksche-Lösung (Standardrezeptur)
- 24-Well-Plates, 50 ml-Tubes (Falcon, Cambridge, USA)
- IL-10, GM-CSF, IFN γ , MIP-1 α ELISA Kits Quantikine (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)

Die Lungenfunktionsuntersuchungen wurden mit einem Bodyplethysmographen der Firma Jäger (Würzburg, Deutschland) durchgeführt.

3.2. Studiendesign

Die durchgeführte Studie war eine randomisierte placebokontrollierte Doppel-blind-cross over- Studie.

Nach der Rekrutierung folgte die erste 12 - wöchige Therapiephase mit Beclometason HFA - 134 oder Placebo, an deren Ende die erste Bronchoskopie mit BAL durchgeführt wurde. Die Dosis des Beclometason betrug 2 x 400 μ g pro Tag. An die 4-wöchige Auswaschphase schloss sich eine zweite 12-wöchige Therapiephase mit Wechsel von Verum auf Placebo oder umgekehrt an. Nach Abschluss der gesamten Therapie erfolgte eine zweite Bronchoskopie mit BAL.

Am Ende jeder Therapiephase wurde der Serumcortisolspiegel bestimmt sowie den Patienten Blut zur Gewinnung der peripheren Blutmonozyten entnommen.

Jeweils 2 Wochen nach Beginn jedes Therapiezyklus stellten sich die Patienten in einer Zwischenvisite vor.

Eine Lungenfunktionsuntersuchung und ein 6 – Minuten - Gehtest fand jeweils zu Beginn und am Ende jeder Therapiephase sowie bei den Zwischenvisiten stand. Zu Beginn und nach Abschluss jeder Therapiephase beantworteten die Patienten den St. George Respiratory Questionnaire (SGRQ).

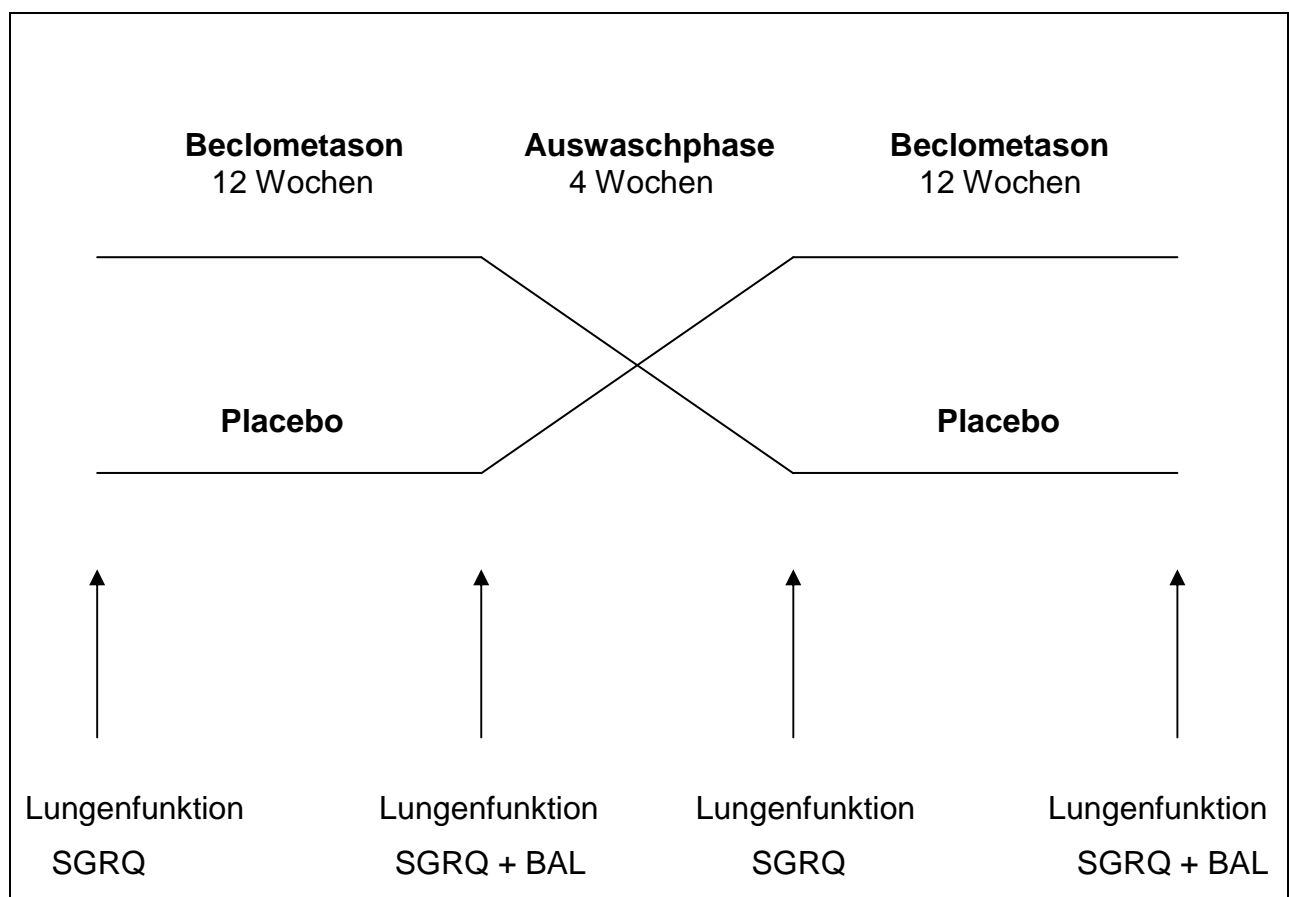


Abb. 1: Schematische Darstellung des Studiendesigns

3.3. Studienpopulation

In der Studie wurden 11 Patienten mit COPD eingeschlossen. Als Kontrollgruppe für die Lungenfunktions- und Blutmonozytenuntersuchung wurden 11 gesunde Probanden untersucht.

3.3.1. COPD- Patienten

In die vorliegende Studie wurden 11 Patienten im Alter von 40 bis 80 Jahren mit COPD eingeschlossen. Davon waren 5 Patienten aktive Raucher, 3 ehemalige Raucher und 3 Nichtraucher mit einer Abstinenz von mehr als 5 Jahren. Die COPD wurde anhand der Lungenfunktion sowie klinischer Kriterien diagnostiziert.

Alle Patienten gaben vor Einschluss in die Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme und waren in der Lage den Autohaler zur Applikation des Beclometason HFA - 134 sicher zu handhaben. Voraussetzung zum Einschluss war eine Steroidnaivität beziehungsweise eine stabile COPD. In den letzten 8 Wochen vor Studienbeginn durfte keine Notwendigkeit einer Antibiotika- und / oder Kortikosteroidbehandlung, zum Beispiel im Rahmen einer akuten Exazerbation, bestanden haben.

Als Bedarfsmedikation verwendeten alle Patienten ein kurzwirksames β 2-Sympathomimetikum. Eine bestehende Therapie mit inhalativen langwirksamen β 2-Sympathomimetika, oralen β 2-Agonisten, Anticholinergika, Cromonen, Leukotrienantagonisten oder Theophyllin (1000mg/d) war erlaubt, sofern sie während der gesamten Studie regelmäßig auf einer stabilen Dosis eingenommen wurde.

Voraussetzung war des Weiteren eine Reversibilität der FEV₁ von weniger als 12 % nach Inhalation von 200 μ g Salbutamol im Bronchospasmodolysetest. Patienten mit anderen pulmonalen Krankheiten bzw. anderen instabilen Begleiterkrankungen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

3.3.2. Kontrollgruppe

Zum Vergleich wurden 11 Kontrollpersonen untersucht. Davon waren 5 Raucher und 6 Nichtraucher. Bei keinem der Patienten wurde klinisch eine entzündliche oder maligne Lungenerkrankung festgestellt. Die Kontrollpatienten erhielten keine Therapie mit HFA - 134 Beclomethason. Es fand ein Lungenfunktionstest statt und den Patienten wurde Blut zur Gewinnung der peripheren Monozyten sowie zur Bestimmung des Serumkortisolspiegels entnommen.

Eine Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) wurde bei diesen Kontrollpersonen nicht durchgeführt.

Tab. 2: Demographische Daten der Studienpopulation. Die Daten sind angegeben als Mittelwert und SEM.

	COPD- Patienten	Kontrollen
Alter	61,82 ± 3,50	51,36 ± 2,31
Geschlecht (m/w)	7 / 4	3 / 8
Raucher(R)/ Nichtraucher(NR)	5 R /6 NR	5 R /6 NR
Pack years	41,64 ± 6,42	11,91 ± 3,86
Allergiestatus	keine	keine

Tab 3: Lungenfunktionsbefunde der Studienpopulation vor Studienbeginn. Die Daten sind angegeben als Mittelwert und SEM.

	COPD - Patienten	Kontrollen
VC (l)	2,82 ± 0,25	3,56 ± 0,25 n=11
VC % Soll	75,15 ± 2,32	96,4 ± 3,94 n=11
FVC (l)	2,93 ± 0,26	3,57 ± 0,26 n=11
FVC % Soll	80,85 ± 2,62	99,91 ± 3,83 n=11
FEV₁ (l)	1,88 ± 0,19	3,08 ± 0,25 n=11
FEV₁ % Soll	64,97 ± 3,93	102,39 ± 4,46 n=11
FEV₁%VC	66,71 ± 2,99	86 ± 1,54 n=11
FEV₁%VC % Soll	86,96 ± 3,81	108,8 ± 2,26 n=11
PEF (l/s)	5,19 ± 0,62	7,88 ± 0,85 n=11
PEF % Soll	69,26 ± 5,79	107,18 ± 6,89 n=11
R tot (kPa*s/l)	0,42 ± 0,04	0,24 ± 0,042 n=10
R tot % Soll	139,66 ± 13,99	79,23 ± 14,19 n=10
RV (l)	3,32 ± 0,34	2,22 ± 0,11 n=10
RV % Soll	149,35 ± 12,20	119,7 ± 7,37 n=10
TLC (l)	6,25 ± 0,49	5,78 ± 0,33 n=10
TLC % Soll	101,55 ± 4,59	103,71 ± 4,5 n=10
RV% TLC	52,54 ± 2,77	39,35 ± 1,82 n=10
RV% TLC % Soll	137,14 ± 6,33	107,86 ± 4,75 n=10

3.4. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage wurde während einer transoralen fiberoptischen Bronchoskopie durchgeführt.

3.4.1. Untersuchungsvorbereitende Maßnahmen

In Vorbereitung auf die geplante BAL im Rahmen einer Bronchoskopie erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Patienten mit schriftlicher Einverständniserklärung.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen eine aktuelle Blutuntersuchung mit Blutbild und Gerinnungsparametern sowie ein aktueller Lungenfunktionsbefund vor. Die Bronchoskopie erfolgte am nüchternen Patienten, das heißt nach mindestens sechsstündiger Nahrungs- und Nikotinkarenz. Vor der Untersuchung erhielten alle Patienten intravenös 2-5 mg Midazolam zur Sedation.

Des Weiteren wurde zur Vermeidung vermehrten Speichelflusses 0,5 mg Atropin intravenös verabreicht. Zur Hustenstillung erhielt der Patient vor der Untersuchung 15 mg eines Antitussivums (Dicodid, Hydrocodon®). Der Mund - Rachenraum wurde mit 2x5 Hüben Gingicain®, einem Tetracainspray, lokal anästhesiert. Über den Arbeitskanal des Bronchoskops erfolgte eine Lokalanästhesie der Schleimhaut von Trachea, Carina und Bronchien mittels 2 ml 2%iger Prilocainlösung. Um einen negativen Einfluss des Lidocains auf die Zellaktivität und Zellvitalität zu verhindern, wurde vor Durchführung der Bronchoskopie beziehungsweise BAL überschüssiges Lokalanästhetikum abgesaugt (120). Während des gesamten Untersuchungsvorganges wurde Patienten Sauerstoff über eine Nasensonde (2-3 ml/min) appliziert. Die Untersuchung erfolgte unter kontinuierlichem Monitoring der Herzfrequenz, des Blutdrucks und der Sauerstoffsättigung.

3.4.2. Bronchoskopische Untersuchung und BAL

Die Bronchoskopie wurde transoral durchgeführt. Um eine eventuelle Verunreinigung der Lavageflüssigkeit mit Blut zu vermeiden, erfolgte als erster Untersuchungsschritt die bronchoalveoläre Lavage.

Diese wurde in einem Segment des Mittellappens durchgeführt. Die Bronchoskopspitze ist bis zum Erreichen einer lumenabdichtenden Position im Subsegmentbronchus vorgeschoben worden.

Die anschließende Lavage erfolgte mit 150 ml steriler Raumtemperatur betragener isotoner Kochsalzlösung. In Portionen von 20 ml wurde die Flüssigkeit über den Arbeitskanal des Bronchoskops injiziert und wieder aspiriert. Um Mucus aus der Lavageflüssigkeit zu entfernen, ist diese durch ein zweilagiges Mull filtriert worden. Die Rückflussrate wurde bestimmt und eine Differentialzellbild im Labor angefertigt. Bei der Verarbeitung der Lavageflüssigkeit wurden Kunststoffbehälter verwendet. Im Anschluss an die BAL sind weitere geplante Untersuchungen, zum Beispiel Biopsien, oder Bürstenzytologien durchgeführt worden.

3.5. Blutentnahme und Separation der Monozyten

3.5.1. Blutentnahme am Patienten

Jeweils zum Ende der 12-wöchigen Therapiephasen wurde den Patienten beziehungsweise einmalig den Kontrollpersonen 50 ml Nativblut peripher venös entnommen. Um eine vorzeitige Gerinnung zu verhindern, ist das Blut mit 10 ml ACD, bestehend aus Zitronensäure, Natriumcitrat, Glucose und Wasser versetzt worden. Der Transport ins Labor erfolgte unter Kühlung.

3.5.2. Aufbereitung des Blutes im Labor

3.5.2.1. Zytologische Aufarbeitung

Zur weiteren Aufarbeitung wurde das mit ACD versetzte Vollblut zur Trennung der zellulären Bestandteile mit 6 ml HAES 6% gemischt. Nach 60 bis 90 Minuten war eine Sedimentation der Erythrozyten zu verzeichnen. Der Überstand wurde abpipettiert und für 10 Minuten bei 18°C und 1700 rpm zentrifugiert. Der erneut entstandene Überstand ist größtenteils verworfen worden.

Eine geringe Menge wurde zur Resuspension des Zellpellets, welches sich am Boden des verwendeten Falcon Tubes gebildet hatte, verwendet. Das resuspendierte Zellpellet ist auf 7,5 ml Ficoll aufgetragen worden. Es erfolgte ein Dichtegradientenzentrifugation für 30 Minuten bei 18°C und 1600 rpm.

Die entstandene Zellansammlung in der Mitte des Falcon Tubes wurde abpipettiert. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit HBSS gewaschen, indem sie mit jeweils 50 ml HBSS resuspendiert und für 10 Minuten bei 18°C und 1600 rpm zentrifugiert wurden. Nach den Waschschrritten erfolgte die Auflösung des Zellpellets in 2 ml Kulturmedium. In einem Test mit Trypanblau wurde die Zellvitalität ermittelt. Die Differentialzellzählung ist an einem mittels Türkscher Lösung angefertigten Zellausstrich durchgeführt worden.

3.5.2.2. Kultur und Zytokinstimulation der Blutmonozyten

Nach Ermittlung der Monozytenzellzahl wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium auf eine Konzentration von 1×10^6 Monozyten /ml verdünnt. Das verwendete Medium setzte sich zusammen aus 450 ml RPMI 1640, 50 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, L-Glutamin sowie Penicillin (100U/ml) - Streptomycin (100µg/ml). Die Kultur der Monozyten erfolgte in Plastikkulturplatten mit 24 Vertiefungen. Je 1 ml der Zellsuspension (1×10^6 Monozyten/ml) wurde pro Vertiefung ausplattiert.

Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem nicht adhärente Zellen entfernt wurden. Es resultierte eine reine Monozytenkultur. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema. Um die spontane Zytokinfreisetzung bestimmen zu können, wurden Monozyten unstimuliert in reinem Kulturmedium belassen oder mit Lipopolysaccharid LPS (1µg/ml) oder IL-1β (10ng/ml) stimuliert.

Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank unter den oben genannten Bedingungen wurde der Kulturüberstand abpipettiert und bei -70°C zur geplanten Zytokinbestimmung eingefroren.

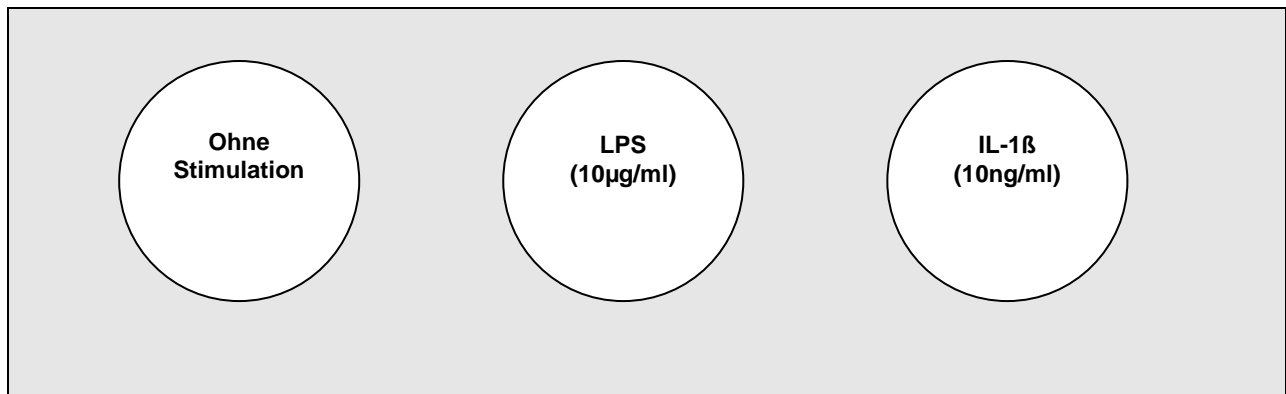


Abb.2.: Schema zur Stimulierung der Monozyten mit LPS und IL-1 β . Pro Vertiefung wurde eine Zellzahl von 1×10^6 Monozyten ausplattiert.

3.6. Zytokinbestimmung mit dem Enzym- Linked Immunsorbent Assay (ELISA)

Die Zytokinkonzentrationen von GM-CSF, MIP-1 α , IFN- γ und IL-10 wurden mittels handelsübliche ELISA Kits gemessen.

Die zuvor aus der Kultur von Monozyten und Alveolarmakrophagen gewonnenen Überstände der einzelnen Stimulationsreihen wurden vorsichtig aufgetaut.

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte in ELISA - Assays quantitativ nach einem Sandwich-Prinzip. Verwendet wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte. Der Boden der Mikrotiterplatte ist mit einem für das jeweilige Zytokin spezifischen Antikörper beschichtet worden. Gemeinsam mit den zu messenden Proben wurden hergestellte Standardverdünnungsreihen mit bekannten Zytokinkonzentrationen nach einem zuvor festgelegten Schema auf die Testplatte aufgetragen. Es folgte eine Inkubationszeit, in der das in der Probe beziehungsweise im Standard enthaltene Zytokin an den Antikörper gebunden hat. Danach ist ein Waschschrift erfolgt, in dem ungebundenes Substrat entfernt wurde. Nachfolgend wurde ein zweiter enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper zugegeben. Dieser hat das Zytokin erneut gebunden. In einem erneuten Waschschrift wurde ungebundener Antikörper entfernt. Die Zugabe einer Lösung, bestehend aus Hydrogenperoxid und Chromogen, löste eine enzymatische Farbreaktion mit dem sekundär fixierten Antikörper aus.

Nach der vorgeschriebenen Zeit wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Dadurch trat eine pH - Wertänderung ein, die sich in einem Farbumschlag äußerte. Es lag nun eine photometrisch messbare Wellenlänge (450nm) vor. Es bestand eine Proportionalität der Intensität der Farbentwicklung zur Menge des zu messenden Zytokins. Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgte die Erstellung einer Standardkurve und die Umrechnung der photometrischen Messwerte. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt. Die untere Sensitivitätsgrenze der ELISA- Kits lag für die verschiedenen Zytokine jeweils bei: GM-CSF 3,0 pg/ml, MIP-1 α 10,0 pg/ml, IFN- γ 8,0 pg/ml, IL-10 3,9 pg/ml.

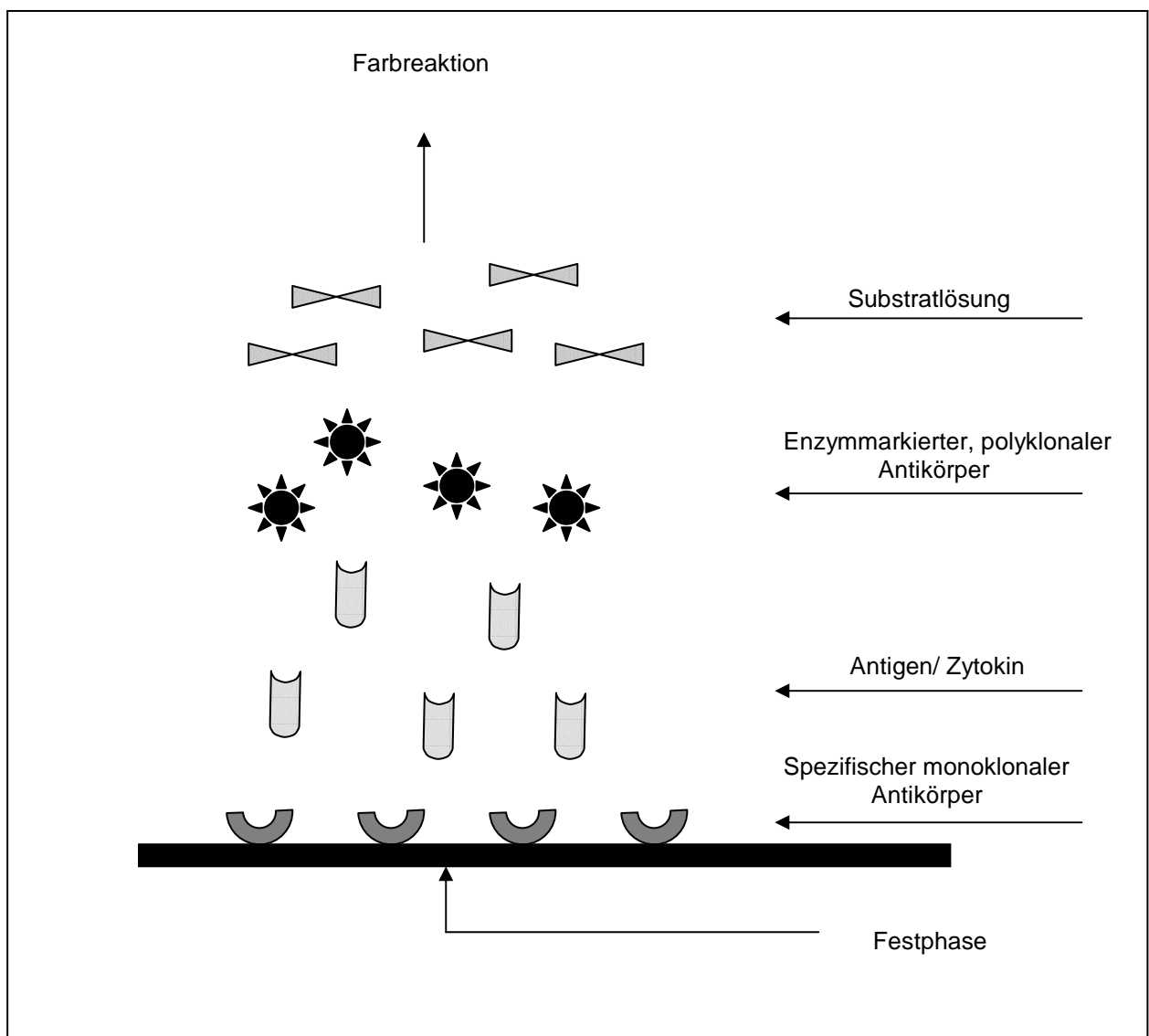


Abb. 3.: Schematische Darstellung des ELISA - Testprinzips

3.7. Bestimmung des Serumcortisolspiegels

Jeweils am Ende jeder der 12- wöchigen Therapiephasen wurde der Patientengruppe und der Kontrollgruppe zur Bestimmung des Serumcortisols peripher venös Blut entnommen worden. Die Entnahme erfolgte bei allen COPD - Patienten vor der Bronchoskopie. Mittels EIA erfolgte die Bestimmung des Serumcortisolspiegels im Labor.

3.8. 6 – Minuten - Gehstest

Ein 6 – Minuten - Gehstest erfolgte zu Beginn und am Ende jeder Therapiephase sowie bei den Zwischenvisiten. Auf einer ausgemessenen ebenen Strecke gingen die Patienten sechs Minuten unter Aufsicht. Sie wurden aufgefordert, die Geschwindigkeit konstant zu halten und mit einer gerade noch möglichen Schnelligkeit zu laufen.

3.9. Der St. George Respiratory Questionnaire (SGRQ)

Der St. George Respiratory Questionnaire ist ein standardisierter Fragebogen zur Erfassung der Lebensqualität von Patienten mit Erkrankungen der Atemwege, insbesondere COPD (121, 122). Der Fragebogen ist entwickelt worden, um vergleichbare Messungen des Ausmaßes der Beeinträchtigung des Wohlbefindens und der Tätigkeiten des täglichen Lebens beziehungsweise eines möglichen Therapieerfolges zu erhalten. Dazu ist der St. George Respiratory Questionnaire in drei Sektionen eingeteilt: Symptome (Frequenz, Schweregrad), Aktivitäten (die durch die Atemnot limitiert werden) und Einflüsse (Beeinträchtigung des Sozialverhaltens, psychische Störungen, die durch die Atemwegserkrankung verursacht worden sind). Für jede der drei Sektionen wird ein Einzelpunktwert ermittelt, hinzu kommt ein Gesamtpunktwert.

Zur Auswertung wird ein spezieller Kalkulator benutzt. Dieser Software liegt eine Excel-Tabelle zugrunde, in die, den Antworten des Patienten entsprechende, vorgegebene Punkte eingetragen werden. Das Ergebnis kann zwischen den Werten 0 und 100 liegen, ein höherer Punktwert korreliert mit einem schlechteren Gesundheitszustand des Patienten.

Zur Bewertung eines möglichen Therapieerfolges wird eine Verbesserung des Gesamtpunktwertes um 4.3 Einheiten als signifikant angesehen. Alle COPD - Patienten beantworteten den SGRQ zu Beginn und nach Abschluss jeder Therapiephase. Die Kontrollgruppe beantwortete ihn einmalig.

3.10. Statistische Methoden

Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Zur Analyse der Studienergebnisse wurden die Parameter der Lungenfunktionsbefunde, die Serumcortisolspiegel, der 6 – Minuten - Gehstest und die Messwerte der Zytokinkonzentrationen verglichen. Der Vergleich innerhalb einer Patientengruppe, sprich zwischen den beiden Therapiephasen, erfolgte mit dem Wilcoxon Test. Um die Ergebnisse zwischen den Gruppen, zum Beispiel COPD - Patienten und Kontrollgruppe, vergleichen zu können, wurde der nicht - parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten angenommen. Die statistische Analyse ist mit dem Programm StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley CA, USA) durchgeführt worden.