Aus der

Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität in

Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum

Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Antimikrobielle Peptide im induzierten Sputum

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der

gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-

Universität Marburg vorgelegt

von

Anne Sabine Wellek

aus Mainz

Marburg 2006

angenommen vom Fachbereich für Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg

am: 06.04.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. Dr. R. Bals

Koreferent: Prof. Dr. M. Lohoff

2. Koreferent: Prof. Dr. N. Katz, Gießen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6

1.1 Allgemeines zur Pathogenese von Atemwegserkrankungen 6

1.2 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) 7

1.3 Induziertes Sputum (IS) 8

1.4 Bedeutung von Zytokinen für die Pathogenese der COPD 10

1.5 Antimikrobielle Peptide (AMPs) 11

2. Fragestellung 14

3. Material und Methoden 15

3.1 Geräte 15

3.2 Probanden, Ein-/Ausschlusskriterien 15

3.3 Induktion von Sputum 16

3.3.1 Geräte und Materialien 16

3.3.2 Prozedurablauf 16

3.4 Aufarbeitung von Sputum 17

3.4.1 Geräte und Materialien 17

3.4.2 Durchführung 18

3.5 Gesamtproteinbestimmung 19

3.5.1 Geräte und Materialien 19

3.5.2 Durchführung 19

3.6 Zytokin-ELISAs 20

3.6.1 Geräte und Materialien 20

3.6.2 Durchführung des ELISAs 21

3.7 LL-37 ELISA 21
3.7.1 Geräte und Materialien 21
3.7.2 Durchführung des ELISAs 22

3.8 Mucin ELLA (Enzym Linked Lectin Assay) 23
3.8.1 Geräte und Materialien 23
3.8.2 Durchführung des ELLAs 23

3.9 Immunhistochemie 25
3.9.1 Geräte und Materialien 25
3.9.2 Durchführung 25

3.10 Datenanalyse und statistische Auswertung 26
3.10.1 Datenbeschreibung 26
3.10.2 Signifikanztests auf Gruppenunterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern 27
3.10.3 Diagnostische Trennung von Rauchern und Nichtrauchern .. 27
3.10.4 Analyse von Beziehungen zwischen Sputum-Parametern und Rauchfrequenz 28

4. Ergebnisse 29

4.1 Demographische Daten 29

4.2 Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen 33
4.2.1 hBD-1 33
4.2.2 hBD-2 34
4.2.3 LL-37 34
4.2.4 Kontrolle 35

4.3 Univariate Vergleiche zwischen Rauchern und Nicht-/ Exrauchern bezüglich Zellzahlen und biochemischer Parameter 35

4.4 Untersuchung zur Diskrimination zwischen Rauchern und Nichtrauchern mittels der im induzierten Sputum bestimmten Parameter 50

4.5 Multivariate Untersuchung der Abhängigkeit zwischen Rauchfrequenz und den im induzierten Sputum bestimmten Parametern .. 53

5. Diskussion 56

5.1 Zelldifferenzierung 56

5.2 Antimikrobielle Peptide kommen in den Zellen des induzierten Sputums vor 58

5.3 Einfluss von Zigarettenrauch auf Zellzahlen sowie biochemische Parameter 59

6. Zusammenfassung 65

Anhang 67

Tabellarische Übersicht über das Probandenkolletiv 68

Literaturverzeichnis 69

Lebenslauf 74

Akademische Lehrer 76

Danksagung 77

Abkürzungen..... 78

Ehrenwörtliche Erklärung 79

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zur Pathogenese von Atemwegserkrankungen

Zigarettenrauch spielt in der Pathogenese einiger bedeutender pneumologischer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Hierzu gehört in erster Linie die Chronische Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) [Arruda et al. 2005], [Vineis et al. 2005]. Auch in der Pathogenese des Bronchialkarzinoms spielt Zigarettenrauch die wesentliche Rolle.

Obwohl es als gesichert gilt, *dass* Rauch einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese von chronischen Lungenerkrankungen ausübt, ist bisher sehr wenig darüber bekannt, *wie* diese Einflussnahme auf zellulärer Ebene genau vonstatten geht [Vonk-Noordergraf et al. 2005].

Insbesondere wird davon ausgegangen, dass durch die Einwirkung von Zigarettenrauch ein chronischer Entzündungsprozess in der Lunge unterhalten wird [Vernooy 2002], über dessen genauen Entstehungsmechanismus bisher nur wenig bekannt ist.

Allgemein wird angenommen, dass bei der Unterhaltung dieser pulmonalen Entzündung neben Zigarettenrauch proinflammatorische Zytokine eine nicht unwesentliche Rolle spielen [Hill et al. 1999].

Des weiteren existieren in der Lunge sogenannte antimikrobielle Peptide, von denen angenommen wird, dass sie als Entzündungsmediatoren fungieren können. Aus diesem Grund gilt es als wahrscheinlich, dass sie an der Pathogenese der COPD mit beteiligt sind.

Da postuliert werden muss, dass der beschriebene chronische pulmonale Entzündungsprozess nicht erst mit Auftreten von Krankheitssymtomen beginnt, sondern bereits viel früher, lag es nahe, zu untersuchen, inwieweit sich die Entzündungsparameter gesunder Raucher und Nichtraucher voneinander unterscheiden. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie von insgesamt ca 100 gesunden Probanden, 50 Raucher und 50 Nichtraucher, Sputum induziert und die im Überstand gemessenen Level von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden miteinander verglichen. Im Anschluss daran wurde noch eine immunhistochemische Darstellung zellulärer Verteilungsmuster des induzierten Sputums (IS) durchgeführt.

1.2 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Die COPD ist ein gravierendes, weltweit wachsendes Gesundheitsproblem. 1990 noch rangierte die Erkrankung auf Platz sechs der häufigsten globalen Todesursachen, 2004 belegte es bereits den vierten Platz [Barnes et al. 2004]. Es wird erwartet, dass die COPD im Jahr 2020 an dritter Stelle der weltweit häufigsten Todesursachen stehen wird [Ezzati et al. 2004].

Unter dem Begriff COPD werden zwei unterschiedliche Krankheitsbilder zusammengefasst. Dies sind die chronische Bronchitis und das pulmonale Emphysem [Navarro et al. 2004].

Pathophysiologisch wird die COPD definiert durch eine irreversible Behinderung des Luftstromes, besonders während einer forcierten Expiration [Pauwels et al. 2001]. Diese geht entweder auf einen Anstieg des Widerstandes der kleineren Atemwege, bedingt durch eine Kontraktion der Bronchialmuskulatur, oder vor allem auf eine Erhöhung der Compliance der Lunge aufgrund eines emphysematösen pulmonalen Umbauprozesses oder auf eine Kombination beider Vorgänge zurück [Brabandt et al. 1983]. COPD-Patienten verlieren durchschnittlich ca 50 ml ihrer FEV1 (forciertes expiratorisches Volumen) im Jahr, gesunde Nichtraucher hingegen lediglich ca 20 ml [Barnes 2004]. Dies erklärt unter anderem die im Verlauf des Krankheitsprozesses zunehmende Dyspnoesymptomatik.

Als Ursache einer COPD gilt das Einwirken toxischer Gase sowie verschiedenartiger Partikel, die über lange Zeiträume hinweg regelmäßig eingeatmet werden [Pauwels 2004]. Zu der Entstehung dieses Krankheitsbildes trägt Umweltverschmutzung weniger stark bei als Rauchen, das den Hauptrisikofaktor darstellt [Siafakas et al. 1995]. In den meisten Fällen ruft chronische Rauch-Exposition beim Menschen nachweislich ein Emphysem nach den Kriterien des National Heart, Lung and Blood Institute hervor [Snider 1985]. Die Mehrheit dieser Emphyseme sind vom zentroazinären Typ.

Auch lassen sich Veränderungen in der Zusammensetzung des pulmonalen Zytokinprofils nachweisen. Der Nachweis gelang besonders eindrucksvoll in einer Studie, in der die bronchioalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL) von 61 asymptomatischen älteren Probanden, 16 Exraucher (seit mindestens 6 Monaten) und 45 mehr oder minder starken Rauchern mit oder ohne subklinischem Emphysem, untersucht wurde. Hierbei fanden sich statistisch signifikant erhöhte

Level von IL-8 in der Gruppe der Raucher mit subklinischem Emphysem im Vergleich zu den Exrauchern oder den gesunden Rauchern [Tanino et al. 2002].

Da es sich bei der BAL um eine invasive und dementsprechend mit potentiellen Risiken für den Probanden verbundene Methode zur Untersuchung der pulmonalen Entzündungsvorgänge handelt, deren Anwendung für reine Forschungszwecke schwierig praktisch umzusetzen ist, musste eine nichtinvasive und risikoärmere Methode gefunden werden, um die Entzündungsvorgänge innerhalb der Lunge weiter erforschen zu können.

1.3. Induziertes Sputum (IS)

Der Begriff „ induziertes Sputum“ ist definiert als Sekret der Atemwege, das nach Induktion mit hyptertoner Kochsalzlösung abgehustet wird. Sputum besteht überwiegend aus Schleim und Zellen [Magnussen et al. 1999]. In den letzten 10-15 Jahren hat die Methode des induzierten Sputums immer weiter an Bedeutung gewonnen, da eine Sputuminduktion eine nichtinvasive, sichere und kostengünstige Methode zur Untersuchung pulmonaler Entzündungsvorgänge darstellt [Lumière et al. 2001]. Es wurde auf diese Art und Weise Sekret der Atemwege gewonnen, das sich hinsichtlich der Auswertbarkeit und Aussagekraft möglicherweise nur wenig von einer BAL-Flüssigkeit unterscheidet [Brightling et al. 2003]. Im Vergleich zu einer BAL wird induziertes Sputum eher aus zentralen, BAL hingegen eher aus den peripheren Anteilen der Lunge gewonnen [Jayaram et al. 2000]. Außerdem wurde eine Sputum-Induktion dem Aufarbeiten von Spontansputum vorgezogen, da man auf diese Art und Weise eine größere Probenmenge zur Verfügung hatte. Des weiteren bietet induziertes Sputum den Vorteil der wesentlich höheren Zellvitatlität, die einen erheblichen Beitrag zu einer verbesserten Qualität der Zellpräparation und damit auch zu einer besseren Zelldifferenzierung führt [Ronchi et al. 2001].

Noch immer wird die Methode des induzierten Sputums nur ausnahmsweise in der Routinediagnostik verwendet, da bisher zwar gut begründete Empfehlungen, aber noch keine allgemein akzeptierten Guidelines für die Standardisierung des Induktions-Protokolls existieren. Dies bedeutet natürlich auch, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Einrichtungen und La-

bors nur sehr bedingt gegeben ist [Magnussen et al. 2000]. Eine wesentliche Quelle für die Nichtvergleichbarkeit der Messergebnisse liegt in der Tatsache, dass es Arbeitsgruppen gibt, die das ganze Sputum verwenden, und solche, die nur Teile der Sputumprobe entnehmen und weiteranalysieren. Eine weitere Quelle für die beträchtliche messmethodische Heterogenität bezieht sich auf die Konzentration der verwendeten Kochsalzlösung, die zwischen 0,7 – 7% schwankt [Paggiaro et al. 2002] . Trotz dieser Einschränkungen gibt die Methode der Sputuminduktion Aufschluss über eine Reihe von Entzündungsparametern, die unter anderem beim Asthma bronchiale und der COPD eine entscheidende Rolle spielen. Die Konzentration von Interleukinen und die Zellzusammensetzung des Sputums lassen wertvolle Rückschlüsse auf die Art der Entzündung der Atemwege zu [Belda et al. 2001].

Einen interessanten Überblick über die Unterschiede hinsichtlich der differentiellen Zellzählung bietet die Arbeit von Balzano et al. aus dem Jahre 1999, in der die induzierten Sputa von 10 Patienten mit stabiler COPD, 11 asymptomatischen Rauchern und 10 gesunden Nichtrauchern miteinander verglichen wurden. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen diesen Gruppen, insbesondere hinsichtlich des Anteils an Makrophagen und neutrophile Granulozyten: In den Sputa von Nichtrauchern und Rauchern fanden sich lediglich etwa 1/3 neutrophile Granulozyten und knapp 2/3 Makrophagen, während die entsprechenden Anteile bei den COPD-Patienten mit 1/5 Makrophagen und rund 4/5 neutrophilen Granulozyten ein wesentlich verändertes Muster aufwiesen [Balzano et al. 1999].

Die bisher veröffentlichten Daten zu den Entzündungsmediatoren sind aufgrund unterschiedlicher Arten der Sputum-Aufarbeitung sowie unterschiedlich starker Verdünnungsverhältnisse nur schwer vergleichbar. Dennoch ergibt sich hinsichtlich der Differenzierung zwischen Rauchern und Nichtrauchern ein einigermaßen klares Bild: Yamamoto et al. [1997] haben im Sputum von fünf gesunden Rauchern und sieben gesunden Nichtrauchern die IL-8-Aktivität gemessen und festgestellt, dass zwischen gesunden Nichtrauchern und Rauchern keine signifikanten Unterschiede bezüglich des IL-8 Levels vorlagen. Des weiteren bestimmten Vernooy et al. [2002] im Rahmen einer vergleichenden Studie im induzierten Sputum von 18 COPD-Patienten und 17 gesunden Rauchern die IL-8-Aktivität, mit dem Resultat, dass sich beide Gruppen signifikant von einander unterschieden. Darüber hinaus existieren noch eine Reihe weiterer Arbei-

ten, die die pulmonale Entzündungsreaktion in verschieden Stadien der COPD analysiert sowie Sputa von Patienten mit Asthma bronchiale und COPD miteinander verglichen haben.

1.4 Bedeutung von Zytokinen für die Pathogenese der COPD

Inflammatorische Zytokine spielen bei der Pathogenese von entzündlichen Lungenerkrankungen eine zentrale Rolle. Sie sind niedermolekulare Proteine, die von sehr unterschiedlichen Zelltypen gebildet werden. In der Lunge gilt der Makrophage als wichtigster Produzent von Zytokinen. Unter bestimmten Bedingungen jedoch können auch andere Zellarten, wie beispielsweise Epithelzellen oder Endothelzellen, Zytokine ausschütten und gleichzeitig als Effektorzellen fungieren. Diese können auf drei verschiedenen Wegen stimuliert werden: 1. endokrin, 2. parakrin und 3. autokrin. Da Zytokine die Eigenschaft besitzen, die Synthese weiterer Zytokine zu induzieren, entsteht eine Entzündungskaskade, wodurch die Entzündungsreaktion potenziert wird [Martin 1997].

Im Verlauf einer Entzündungsreaktion werden pro- und antiinflammatorische Zytokine gebildet und ausgeschüttet. Durch die Intensität und Geschwindigkeit, mit der dieser Prozess abläuft, wird häufig die Schwere des Krankheitsbildes bestimmt [Walz et al. 1991].

Die Entzündungskaskade läuft im einzelnen folgendermaßen ab: Bakterielle Produkte, wie beispielsweise LPS oder Bakterien, aktivieren Makrophagen. Diese wiederum produzieren und sezernieren daraufhin eine ganze Reihe von Zytokinen, wie z.B. TNF-α und IL-1ß. Letztere stehen am Anfang der Entzündungskaskade und werden deswegen häufig auch „early response cytokines“ genannt. Diese Zytokine aktivieren sowohl weitere Makrophagen als auch Epithelzellen und Endothelzellen, die ihrerseits wiederum Zytokine ausschütten. Diese produzieren weitere inflammatorische Zytokine, wobei unter anderem auch Chemokine freigesetzt werden, die zur Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut an den Ort der Entzündung führen. Ein wichtiger Vertreter der Chemokine ist das Interleukin-8, welches hauptsächlich neutrophile Granulozyten aktiviert [Baggiolini et al. 1997].

Als antiinflammatorische Zytokine bezeichnet man im Gegensatz dazu natürliche Inhibitoren der oben beschriebenen „early response cytokines“. Die Balan-

ce zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen wird einerseits durch Binden der „early response cytokines“ TNF-α und IL-1ß an soluble TNF-α / IL-1ß Rezeptoren bzw. durch Kompetition von IL-1ß mit dem IL-1ß Rezeptor-Antagonisten (IL-1 RA), andererseits durch Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen reguliert. Ein Beispiel hierfür sind die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13, welche die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1ß und IL-6 inhibieren [Geiser 1999].

Es wird davon ausgegangen, dass bei der COPD ein chronischer Entzündungsprozess unterhalten wird, in dessen Rahmen sich auch die Zusammensetzung der inflammatorischen Zytokine im induzierten Sputum verändert. Dies wurde in einigen Studien gezeigt, in deren Rahmen das induzierte Sputum von COPD-Patienten mit dem von gesunden Rauchern oder auch Asthma-Patienten bezüglich Veränderungen der Zytokin-Zusammensetzung verglichen worden ist. Da bisher noch keine Daten vorliegen, die die Zytokin-Zusammensetzung im induzierten Sputum von gesunden Nichtrauchern und Rauchern miteinander vergleichen, wurden Nichtraucher im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Kontrollen rekrutiert.

1.5 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Im weiteren Sinne versteht man unter antimikrobiellen Peptiden (AMPs) alle Oligo- und Polypeptide, die die Fähigkeit aufweisen, Mikroorganismen abzutöten oder deren Wachstum zu behindern. Das erste menschliche α-Defensin konnte erstmals im Jahre 1985 nachgewiesen werden [Ganz et al. 1985].
Im engeren Sinne handelt es sich bei AMPs um körpereigene Abwehrstoffe, die hauptsächlich auf mukösen Oberflächen nachzuweisen sind und von Epithelzellen produziert werden [Hiratsuka et al. 1998]. AMPs besitzen nicht nur direkte antimikrobielle Wirkung, sondern erfüllen auch vielfältige Funktionen als Entzündungsmediatoren [Tossi et al. 2000]. Im Verlauf einer Entzündung spielen sie im frühen Stadium eine entscheidende Rolle bei der körpereigenen Abwehrreaktion gegen Makrophagen. Außerdem beeinflussen sie Prozesse, wie beispielsweise die Chemotaxis, die Wundheilung, die Zellproliferation sowie Immunreaktionen [Beisswenger et al. 2005]. Im Prinzip erscheint es möglich, neue

Medikamente mit antimikrobiellen Peptiden als Wirkstoffe zu entwickeln, die sich insbesondere als Antibiotika oder antiinflammatorische Modulatoren einsetzen ließen [Koczulla und Bals 2004].

Wichtige Gruppen von AMPs sind die ß-Defensine (hBD-1 und –2) und die Cathelecidine (LL-37/hCAP-18). hBD-1, -2 und -4 werden allgemein von Oberflächenepithelien und von serösen schleimproduzierenden Drüsen in der Wand von Atemwegen produziert. Des weiteren wurden sie in Atemwegssekreten im Bereich von µl/ml nachgewiesen [Singh et al., 1998]. Beide ß-Defensine werden von den Epithelzellen der menschlichen Atemwege produziert [Goldman et al. 1997; Bals et al. 1998].

Als einziges menschliches Cathelicidin wurde LL-37/hCAP-18 aus menschlichem Knochenmark isoliert [Gudmundsson et al. 1996]. In den menschlichen Atemwegen wird es ebenfalls von Eptithelzellen produziert und an die Atemwegs-Oberfläche abgegeben. Dort haben sie eine breite antimikrobielle Aktivität inne [Bals et al. 1998].

Es konnte gezeigt werden, dass einige Peptide permanent neu gebildet werden. Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise hBD-1 sowie murines ß-Defensin 1 (mBD) [Bals et al. 1999]. Andere AMPs werden nur nach Kontakt mit Mikroorganismen bzw. proinflammatorischen Mediatoren hochreguliert. Unter experimentellen Bedingungen wurde dies nachgewiesen für hBD-2, hBD-3, hBD-4 und LL-37 [O´Neil et al. 1999; Oguhsi et al. 2001]. Darüber hinaus fanden sich bei mehreren Krankheitsbildern in diversen Körpersekreten erhöhte Konzentrationen antimikrobieller Peptide. Dies gilt insbesondere für Infektionskrankheiten, wie z.B. die Pneumonie sowie die Cystische Fibrose [Hiratsuka et al. 1998; Bals et al. 1999].

AMPs haben ein breites antimikrobielles Spektrum (sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien) und zerstören Zellen durch eine Interaktion mit Biomembranen. Neben dieser direkten antimikrobiellen Funktion haben sie verschiedene Rollen als Entzündungsmediatoren inne. Sie beeinflussen unterschiedliche Prozesse, wie zum Beispiel Zellproliferation, Wundheilung, Zytokin-Ausschüttung, Chemotaxis und Protease-Antiprotease-Gleichgewicht [Koczulla et al. 2003].

AMPs verfügen des weiteren über eine konzentrationsabhängige Toxität gegenüber eukaryoten Zellen. Es wurden hohe Konzentrationen von α-Defensinen

bei Patienten mit Zystischer Fibrose und Chronischer Bronchitis beschrieben [Soong et al. 1997 und Panyutich et al. 1993]. Bei diesen Krankheitsbildern trugen sie unter anderem zu einer Entzündungsreaktion bei. Weiterhin induzieren α-Defensine bei Lungenepithelzellen eine IL-8-Ausschüttung [Wetering et al. 1997]. Die Zerstörung der Zellen durch α-Defensine steigt wahrscheinlich durch eine Defensin-induzierte Lyse der Epithelzellen oder ein Binden der α-Defensine an Protease-Inhibitoren, wie z.B. α1-Antitrypsin [Panyutich et al. 1995].

Aufgrund der Eigenschaft als Entzündungsmediator ist es möglich, dass AMPs an der Pathogenese entzündlicher Atemwegserkrankungen beteiligt sind.

Im Sinne der gleichen Grundvorstellung ist auch zu erwarten, dass sich nach langjährigem Nikotinabusus bei subjektiv gesunden Rauchern im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern Unterschiede in der Verteilung und Konzentration von AMPs ergeben. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand von Sputumproben untersucht, die mit Hilfe zweier verschiedener Methoden der Sputuminduktion gewonnen, immunhistochemisch aufgearbeitet und mittels eines Protein-Assay sowie verschiedenen ELISAs und einem ELLA (enzyme linked lectin assay) analysiert wurden.

2. Fragestellung

In der Pathogenese der COPD geht man davon aus, dass die rezidivierende Einwirkung eines potentiell toxischen Rauchgemisches einen ständigen Entzündungsprozess in der Lunge unterhält. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen über Jahrzehnte dauernden, schleichenden, chronischen inflammatorischen Prozess handelt.

Deshalb war es das Ziel, folgende Fragen zu beantworten:

1. Existiert ein signifikanter Unterschied zwischen den Sputa von Rauchern und Nichtrauchern bezüglich der Konzentrationen von Zytokinen, i.e. IL-1ß, IL-6 und IL-8, antimikrobiellen Peptiden (i.e. LL-37) und Mucin?
2. Inwieweit unterscheidet sich das differentiale Zellbild von Rauchern und Nichtrauchern?
3. Welche Zellen exprimieren antimikrobielle Peptide?
4. Ist es möglich, in den Zellen des induzierten Sputums antimikrobielle Peptide immunhistochemisch nachzuweisen?

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet:

- Ultraschallvernebler LS-290 (Schill Medizintechnik)
- Handspirometer (SpiroPro, Jaeger)
- Wasserbad 37°C schüttelnd (GFL)
- Kühlzentrifuge (Varifuge 3.2RS, Haeraeus, München)
- Pipetus (Pipetus-Akku, Hirschmann-Laborgeräte)
- Neubauer-Zählkammer (improved Neubauer, Neubauer)
- Zytozentrifuge (Cytospin 2, Shandon)
- Verstellbarer Vortexer (MS 1 Minishaker, IKA)
- Reader (ELX800, Biotek Instruments)
- Washer für Multiwellplatten (Nunc-Immuno Wash 8, Nunc)

3.2 Probanden, Ein- / Ausschlusskriterien

In die Studie wurden als Probanden gesunde Personen eingeschlossen, die keine akute Infektion der Atemwege aufwiesen, nicht schwanger, kardiopulmonal instabil oder jünger als 18 Jahre alt waren.
Als wichtigster (potentieller) Einflussfaktor wurde der Status bezüglich des Zigarettenrauchens angesehen.
In die Gruppe der Nichtraucher wurden auch ehemalige Raucher klassifiziert, die angegeben hatten, seit mindestens 2 Jahren nikotinabstinent gewesen zu sein.
Die Studie lag der Ethikkommission der Universität Marburg vor und wurde mit einem positiven Votum versehen. Alle Probanden wurden über den genauen Ablauf und die Risiken der Sputuminduktion aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Eine detaillierte Auflistung demographischer Daten sowie Angaben zur Anamnese der Probanden findet sich im Anhang, S. 67.

3.3 Induktion von Sputum

3.3.1 Geräte und Materialien

- Ultraschallvernebler LS-290 (Schill Medizintechnik)
- Salbutamol
- Spirometer (SpiroPro, Jaeger)
- 4,5 %ige Kochsalzlösung (Braun)
- Nasenklammer
- Mikroskop (Leitz)
- Becher für die Sputumproduktion
- Stoppuhr
- Einmal-Becher, Petri-Schalen, Trinkwasser, Papiertaschentücher
- Materialien zum Reinigen, Desinfektionslösung
- Notfallkoffer

3.3.2. Prozedurablauf

Zuerst wurde dreimal direkt hintereinander eine Spirometrie durchgeführt. Falls ein Proband unter 70% seines Sollwerts lag, musste der Induktionsvorgang abgebrochen werden. Anschließend wurde der jeweilige Proband aufgefordert, 2 Hub-entsprechend 200 µg- Sultanol (Salbutamol) mit einer Dosierungshilfe zu applizieren.

Dann wurde 10 Minuten gewartet und wiederum dreimal eine Spirometrie durchgeführt, um die postdilatatorischen Werte erheben zu können. Diese Werte dienten als Basis für die Berechnung von Abweichungen des FEV1/VC-Quotientens während der Induktion. Nun inhalierte der jeweilige Proband insgesamt 20 Minuten lang Kochsalzlösung, wobei Nichtraucher und Raucher konstant 4,5 %iges Kochsalz inhalierten. Die 20-minütige Inhalationsphase wurde

in 4 Intervalle von je 5 Minuten Dauer unterteilt. Zwischendurch wurde immer wieder eine Spirometrie durchgeführt, um gegebenenfalls die Induktion abbrechen zu können. Der Proband wurde aufgefordert, jederzeit den Induktionsvorgang selbst zu unterbrechen, falls er Sputum abgeben könne oder er sich in irgendeiner Art und Weise unwohl fühle.
Das BAL-Material stammte aus Routine-Untersuchungen am Klinikum der Philipps-Universität Marburg. Alle Untersuchungen wurden vor dem 1.1.2004 dort durchgeführt.

3.4 Aufarbeitung von Sputum

3.4.1 Geräte und Materialien

Für die Aufarbeitung der Sputumproben wurden folgende Materialien und Geräte verwendet:

- Destilliertes Wasser (Braun)
- Wasserbad 37°C schüttelnd (GFL)
- DTT (Sigma)
- Zentrifuge (Varifuge 3.2RS, Haeraeus)
- Isotone Kochsalzlösung (0,9%, Braun)
- Verstellbare Pipetten
- Trypanblau (0,4%, Gibco)
- Zählkammer (Neubauer Improved, Neubauer)
- Pipetus (Pipetus-Akku, Hirschmann-Laborgeräte)
- May-Grünwald-Färbelösung (Merck)
- Giemsa-Färbelösung (Merck)
- Zytospin (Zytospin 2, Shandon)
- Glasküvetten und Färbekörbchen
- verstellbarer Vortexer (MS 1 Minishaker, IKA)
- Objektträger (auch supergefrostet, Menzel)
- Wecker
- Filterkarten (Shandon, Pittsburgh, USA)

- Aceton (zur Analyse, Merck)
- Methanol (zur Analyse, Riedel de Haen)
- Petri-Schalen

3.4.2 Durchführung

Zunächst wurde die Sputummenge [in ml] bestimmt und die gleiche Menge an 0,1%iger DTT/NaCl-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde das Sputum für 15 Minuten in ein schüttelndes Wasserbad bei 37°C gestellt. Falls sich der Schleim als sehr schlecht löslich erwies, wurde die Inkubationszeit entsprechend verlängert. Das mit DTT versetzte Sputum wurde nochmals 1:10 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und bei 600 g, bei 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgenommen, die Zellen resuspendiert. Dann wurden Zytopräparate mit Zellsuspensionen in verschiedenen Verdünnungen sowie Präparate für die immunhistochemische Bearbeitung hergestellt. Der Überstand wurde in 1-2 ml-Portionen bei -80 °C eingefroren.

Mit der restlichen resuspendierten Zelllösung wurde eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Daraus ließen sich schließlich die Zellzahl pro ml Nativsputum und die Zellzahl pro ml verdünnten Sputums berechnen.

Die Präparate wurden nach May-Grünwald gefärbt und eine differentiale Zellzählung durchgeführt, wobei 400 Nicht-Epithelzellen nach Zelltypen getrennt ausgezählt werden. Eingeschlossen in die Studie wurden Präparate, welche nicht mehr als 25% Epithelzellen enthielten. Auch mussten die Zellen intakt und klar abgrenzbar sein.

3.5 Gesamtproteinbestimmung

3.5.1 Geräte und Materialien

- BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)
- 96-Well-Platte
- isotone Kochsalzlösung (Baxter)
- Verstellbarer Vortexer (MS 1 Minishaker, IKA)
- Reader (ELX800, Biotek Instruments)

3.5.2 Durchführung

Es wurde eine BSA-Stocklösung (2 mg/ml) verwendet, um Standards verschiedener Konzentrationen herzustellen. Dazu wurde folgendes Schema benutzt:

BSA	*Diluent*	*Konzentration*
300 µl Stock-BSA	0 µl isotone Kochsalzlösung	2000 µg/ml (P)
375 µl Stock-BSA	125 µl isotone Kochsalzlösung	1500 µg/ml (A)
325 µl Stock-BSA	325 µl isotone Kochsalzlösung	1000 µg/ml (B)
175 µl Lösung A	175 µl isotone Kochsalzlösung	750 µg/ml (C)
325 µl Lösung B	325 µl isotone Kochsalzlösung	500 µg/ml (D)
325 µl Lösung D	325 µl isotone Kochsalzlöung	250 µg/ml (E)
325 µl Lösung E	325 µl isotone Kochsalzlösung	125 µg/ml (F)
100 µl Lösung F	400 µl isotone Kochsalzlösung	25 µg/ml (G)

Als Diluent wurde stets das selbe Medium benutzt, das auch beim Aufarbeiten der Sputumproben eingesetzt worden ist. Nun folgte das Auftragen von 10 µl eines jeden Standards, des Leerwerts und allen Proben jeweils in Doppelbestimmung. Im nächsten Arbeitsschritt wurden 200 µl Arbeitslösung, die aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B hergestellt worden ist, in jedes Well pipettiert. Dann wurde die Platte vorsichtig 30 Sekunden lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Die abschließende Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37 °C. Nach Ablauf dieser Inkubation wurde die 96-Well-Platte wieder vorsichtig auf Raumtemperatur abgekühlt. Jetzt konnte die Proteinkonzentration der Proben durch Messen der Absorption bei 562 nm ermittelt werden.

3.6 Zytokin-ELISAs

3.6.1 Geräte und Materialien

- Beschichtungspuffer
- Waschpuffer
- Diluent
- Blocking Reagent
- Streptavidin-POD-Konjugat
- Stopplösung - 3N Schwefelsäure
- Human IL-1ß, IL-6 und IL-8 capture: R&D Systems, polyklonal
- Human IL-1ß, IL-6 und IL-8 detection: R&D Systems, polyklonal
- Human IL-1ß, IL-6 und IL-8 protein; R&D Systems, polyklonal
- Reader (ELX800, Biotek Instruments)
- Verstellbarer Vortexer (MS 1 Minishaker, IKA)
- Washer für Multiwellplatten (Nunc-Immuno Wash 8, Nunc)

3.6.2 Durchführung des ELISAs

Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach Anleitung und unter Verwendung des R&D Systems ELISA Kits. Nachfolgend eine kurze Zusammenfassung des Arbeitsablaufes:

Am ersten Tag wird eine Capture-Antibody-Lösung hergestellt und mit dieser eine 96-Well-Platte (Nunc-Immuno-Platten Maxi Sorp F96) bestückt, indem in jedes Well 100 µl pipettiert werden. Anschließend erfolgt eine Inkubation dieser Multiwell-Platte bei 4°C über Nacht.

Am zweiten Tag erfolgt eine Nachbeschichtung der Platte mit Blocking Reagent, nachdem die Capture-Antibody-Lösung nach der Über-Nacht-Inkubation wieder abgegossen worden ist. Nun wird die Platte für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ende dieser Inkubationszeit erfolgt das Auftragen des Standards und der Proben jeweils in Doppelbestimmung. Im Anschluss erfolgt die Inkubation der Platte über Nacht bei 4°C.
Am dritten Tag wird zunächst Detection-Antibody aufgetragen. Die Multiwellplatte muss nun bei Raumtemperatur zwei Stunden lang geschüttelt werden. Hiernach erfolgt das Auftragen von Streptavidin-POD-Konjugat, TMB-Substrat und Stopp-Lösung (3-N-Schwefelsäure), bevor die Multiwellplatte zunächst bei 450 nm, ggf. später bei 492 nm, im Reader gemessen werden kann.

3.7 LL-37-ELISA

3.7.1 Geräte und Materialien

- Blocking Reagent (R&D Systems ELISA Kit, s.o.)
- Detection Antibody (Clone 1-1 C12)
- Waschpuffer (Standard R&D ELISA Kit)
- Diluent (s.Zytokin-ELISAS)
- Streptavidin-POD-Konjugat (Standard R&D ELISA Kit)
- Stopplösung - 3N Schwefelsäure
- LL-37-Standard (Sanbio)

- 1. Antikörper: anti-human LL-37/Cap18 von Sanbio
- 2. Antikörper: anti-mouse-HRP von Amersham
- Reader (ELX800, Biotek Instruments)
- Verstellbarer Vortexer (MS 1 Minishaker, IKA)
- Washer für Multiwellplatten (Nunc-Immuno Wash 8, Nunc)

3.7.2. Durchführung des ELISAs

Dieser ELISA erfordert eine Bearbeitungszeit von 2 Tagen.

1.Tag

Vor Auftragen der Proben sollten diese in der Regel 1:5 oder 1:10 mit Diluent verdünnt werden und dann entsprechend in die Wells C1-H12 einer Standard-Multiwellplatte einpipettiert werden. Das Diluent besteht aus 1g bovinem Serumalbumin auf 100 ml PBS (pH 7,4). Eine Verdünnungsreihe mit LL-37-Standard wird folgendermaßen hergestellt: In Well A-G Nummer 1 und 2 wir jeweils 100 µl Diluent einpipettiert. Danach werden die Wells G1 und G2 sowie H1 und H2 jeweils 100 µl LL-37 Standard bestückt, wobei die Wells A1 und A2 nur Diluent, die Wells H1 und H2 hingegen nur Standard enthalten. Nun wird eine Standardreihe hergestellt, in dem aus den Wells G1 und G2 100 µl herausgenommen werden und in die Wells F1 und F2 eingefüllt werden. Aus diesen Wells werden dann wieder jeweils 100 µl entnommen und in die Wells E1 und E2 pipettiert. Dies wird bis B1 und B2 fortgesetzt, und die letzten 100 µl werden verworfen. Man erhält hierdurch eine Konzentration von 15,625 bis 1000 ng/ml LL-37. Die aufgetragenen Proben und Standardreihen werden nun bei offener Multiwellplatte über Nacht bei 37°C im Inkubator angetrocknet.

2. Tag

Zunächst wird Waschpuffer aus 1 Liter PBS, 1ml Tween 20 und 1g flüssiger Gelatine hergestellt. Dann wird die Multiwellplatte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wird 300 µl Blocking Reagent Gelantine Hydrolysat (3 ml Hydrolysat auf 30 ml Wasser) pro Well einpipettiert und 2h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin erfolgt ein erneuter dreimaliger Waschvorgang. Im darauf folgenden Arbeitsschritt werden 100 µl pro Well einer Detection Antibody-Lösung aufgetragen, die aus 100 µl Antikörper pro 12 ml Diluent hergestellt werden. Die Multiwellplatte wird nun für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss daran wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es erfolgt dann das Auftragen einer HRP (Peroxidase) Lösung, die aus 2 µl Antikörper pro 12ml Diluent hergestellt worden ist. Die Proben werden erneut auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert, worauf wieder ein dreimaliger Waschvorgang folgt. Im daran anschließenden Arbeitsschritt werden 100 µl pro Well TMB aufgetragen und 8-10 Minuten auf dem Schüttler im Dunkeln (mit Alufolie bedeckt) inkubiert. Als letztes werden in jedes Well 100 µl H2SO4 pipettiert und die Proben bei 450 oder 490 nm gemessen.

3.8 Mucin-ELLA (=Enzym Linked Lectin Assay)

3.8.1 Geräte und Materialien

- Lectin von Ulex europaeus (UEA-1)
- Standard : dialysiertes Schweinemucin (Typ II, aus dem Magen)
- Blocking Reagent (Proteinverdau aus Gelatine)
- Detection Antibody: biotinyliertes WGA (Lectin aus Triticum vulgaris)
- Streptavidin-POD Konjugat (s.o.)
- Reader (ELX800, Biotek Instruments)
- Verstellbarer Vortexer (MS 1 Minishaker, IKA)
- Washer für Multiwellplatten (Nunc-Immuno Wash 8, Nunc)

3.8.2 Durchführung des ELLAs

Die Durchführung des Mucin-ELLA erfolgt innerhalb von 3 Tagen.

1.Tag

Zunächst wird eine Multiwellplatte mit 100 µl pro Well einer UEA-1-Bicarbonat-Carbonat-Puffer Lösung beschichtet. Diese Lösung wird aus 1,25 µg/ml UEA-1 in Bicarbonat-Carbonat Puffer (pH 9,6) hergestellt. Es erfolgt eine Inkubation der ELLA-Platte bei 4°C über Nacht.

2.Tag

Am Anfang steht ein dreimaliger Waschvorgang mit einem Waschpuffer bestehend aus 0,1% Tween in PBS. Im Anschluss daran werden 300 µl Blocking Reagent pro Well aufgetragen und für 2 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Ein erneuter dreimaliger Waschvorgang wird angeschlossen. Als nächstes wird eine Standardreihe mit Schweinemucin Typ II nach bereits oben beschriebenen Schema pipettiert (s.LL-37 ELISA). Die so erzeugte Standardreihe verfügt über einen messbaren Bereich von 0,3 und 750 ng/ml Mucin. Die Proben werden von C1-H12 aufgetragen wie beim IL 1ß ELISA beschrieben. Anzumerken ist, dass die Proben häufig sehr stark verdünnt werden müssen, um Messergebnisse, die innerhalb der Standardkurve liegen, zu erhalten. Nun wird die Multiwellplatte über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.Tag

Nach Ende dieser Inkubationszeit schließt sich ein erneuter dreimaliger Waschvorgang an. In einem nächsten Arbeitsschritt wird eine Detection Antibody-Lösung, bestehend aus 0,6 µg/ml biotinyliertem WGA (Lectin von Triticum Vulgaris) in PBS mit 1% BSA (Diluent) aufgetragen (100 µl/Well). Es erfolgt eine erneute Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 2 Stunden, woran sich wieder ein dreimaliger Waschvorgang anschließt. Es folgt ein Bestücken der Multiwellplatte mit 100 µl/Well des Streptavidin-POD-Konjugats sowie eine sich daran anschließende Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Wiederum wird

die Multiwellplatte dreimal mit Waschpuffer gereinigt. Im darauffolgenden Arbeitsschritt werden 100 µl/Well TMB Substrat Chromogen aufgetragen. Die Multiwellplatte wird nun für 10-15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran werden 100 µl/Well Schwefelsäure aufgetragen, die als Stopplösung dient. Zuletzt wird die Absorption im Reader bei 450 bzw. 490 nm gemessen.

3.9 Immunhistochemie

3.9.1 Geräte und Materialien

Histostain Plus Kit Rabbit Primary (Zytomed, Berlin)
hBD-1 (monoklonaler AK, s.Koczulla und Bals, 2003)
hBD-2 (monoklonaler AK, s. Koczulla und Bals, 2003)
LL-37 (monoklonaler AK, s. Koczulla und Bals, 2003)
PBST (PBS mit 0,5% Tween)
Hämalaun (Merck, Deutschland)
Aquatex (Merck, Deutschland**)**
Eindeckgläschen (Zeiss, Deutschland)

3.9.2 Durchführung

Die Durchführung dieser immunhistochemischen Untersuchung erfolgte mit Hilfe des Histostain Plus Kit Rabbit Primary der Firma Zytomed, Berlin. Die entsprechenden primären Antikörper wurden anhand der Beschreibung von Koczulla und Bals (2003) hergestellt.

Zunächst wurden die zuvor fixierten Präparate aus dem -20°C Tiefkühlschrank genommen. Nach kurzer Wartezeit wurde Blocking Solution auf das Präparat getropft und 10 Minuten lang auf dem Objektträger belassen. Dann wurde die Lösung abgekippt und der primäre Antikörper für eine Einwirkzeit von einer Stunde aufgetragen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zytopräparate mit PBST 2 Minuten lang gewaschen. Als nächstes wurde Biotinyated Secondary

Antibody des Kits (sekundärer Antikörper) aufgetragen und wiederum 10 Minuten abgewartet. Am Ende dieses Zeitintervalls wurde ein weiterer Waschschritt von 2 Minuten Dauer durchgeführt. Anschließend wurde Enzyme Conjugate aufgetragen und wiederum 10 Minuten gewartet. Es folgte ein weiterer 2 minütiger Auswaschschritt . Als letztes wurde Substrate Solution aufgetragen. Nach einer abermaligen Wartezeit von 10 Minuten wurde 30 Sekunden lang mit Hämalaun gegengefärbt und 5 Minuten mit Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden an der Luft getrocknet und schließlich mit Deckgläschen (Eindeckmittel Aquatex) versehen.

3.10 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die primäre Rohdatenerfassung erfolgte durch Übertragen der demographischen und klinischen Basisdaten sowie aller Messergebnisse in eine Excel-Tabelle. Diese wurde über die vordefinierte Importschnittstelle in eine SAS-Datenmenge umgewandelt. Alle weitergehenden Auswer-tungsschritte wurden dann innerhalb von SAS for Windows, Release 8.2 auf einem Standard-PC durchgeführt.

3.10.1 Datenbeschreibung

Die deskriptive Analyse der einzelnen Messgrößen erfolgte in erster Linie unter dem Aspekt des Vergleichs zwischen Rauchern und Nicht- bzw. Exrauchern. Um die Gruppenunterschiede in möglichst differenzierter und zugleich anschaulicher Weise herauszuarbeiten, wurden für die graphische Darstellung Treppenfunktionen geplottet, die zu jedem möglichen Wert der Variablen den (prozentualen) Anteil von Probanden angeben, deren Meßwert mindestens so groß war wie der jeweilige Punkt auf der X-Achse. Diese Funktionen sind sehr nahe verwandt mit sogenannten kumulativen Verteilungsfunktionen. Gegenüber den letzteren haben sie den Vorteil leichterer Interpretierbarkeit (je langsamer die Kurve abfällt, desto stärker die Tendenz zu hohen Meßwerten). Die Berechnung der Kurven erfolgte mittels der Prozedur LIFETEST aus dem SAS-

System (Version 8.2). Diese ist eigentlich für die Berechnung von "Überlebensfunktionen" nach Kaplan und Meier bestimmt. Für vollständige Daten (ohne Zensierung) reduziert sich eine Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier auf eine Treppenfunktion der hier betrachteten Art, für die im folgenden die Bezeichnung Überschreitungsfunktion verwendet wird. Zur Ergänzung dieser Darstellungen wurden bei einigen Variablen fernerhin Box-Whiskers-Plots erstellt. Die Berechnung der hierzu benötigten statistischen Maßzahlen (Arithmetisches Mittel, Median, Q_1 und Q_3) erfolgte mittels der SAS-Prozedur UNIVARIATE.

3.10.2 Signfikanztests auf Gruppenunterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern

Beim Testen auf Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern wurde genauso wie bei der graphischen Darstellung im deskriptiven Teil ein nichtparametrisches Verfahren eingesetzt. Zur Anwendung kam der Mann-Whitney-Wilcoxon Test, der die Nullhypothese prüft, dass die in den Graphiken dargestellten Verteilungsfunktionen in den Grundgesamtheiten, denen die Stichproben entstammen, identisch sind. Dabei wurde jeweils vorausgesetzt, dass nur Abweichungen in einer im vorhinein feststehenden Richtung interessierten. Die angegebenen p-Werte gelten dementsprechend für die einseitige Form des Tests. Für die Berechnung der p-Werte wurde die SAS-Prozedur NPAR1WAY verwendet. Diese berücksichtigt auch sogenannte Bindungen zwischen den Meßwerten verschiedener Probanden, d.h. das Vorkommen identischer Messergebnisse bei zwei oder mehr Probanden.

Alle Aussagen über die Signifikanz von Gruppenunterschieden beziehen sich nur auf den jeweiligen Einzeltest, obwohl im Rahmen der gesamten konfirmatorischen Auswertungsprozedur rund 20 p-Werte zu beurteilen waren. Eine Kontrolle des multiplen Signifikanzniveaus für die Gesamtheit der durchgeführten Einzeltests wurde nicht angestrebt.

3.10.3 Diagnostische Trennung von Rauchern und Nichtrauchern

Entsprechend der Hauptfragestellung dieser Arbeit wurden die verschiedenen, im induzierten Sputum bestimmten Parameter zuerst bezüglich ihres Beitrags zur Trennung zwischen Rauchern und Nicht- bzw. Ex-Rauchern evaluiert. Da nicht von einer multivariaten Normalverteilung der Messparameter ausgegangen werden konnte, wurde hierzu eine multivariate logistische Regression verwendet. Die Schätzung der Regressionskoeffizienten erfolgte mittels der SAS-Prozedur LOGISTIC.

3.10.4 Analyse von Beziehungen zwischen Sputum-Parametern und Rauchfrequenz

Bei dem in 3.10.3 dargestellten Auswertungsansatz geht man von der Vorstellung aus, dass die Raucher genauso wie die Nicht- bzw. Ex-Raucher eine in sich homogene Gruppe sind. Demgegenüber erscheint es biologisch plausibel anzunehmen, dass die Effekte des Zigarettenrauchens vom Ausmaß der Exposition abhängen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden als quantitatives Maß für die Exposition bei jedem einzelnen Probanden die Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses der einzelnen Messparameter auf dieses Maß für die Rauchexposition wurden multiple lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Die Berechnung der Regressionskoeffezienten erfolgte mittels einer weiteren, als PROC REG bezeichneten Prozedur im SAS-System. Zur Veranschaulichung der Regressionsergebnisse wurden die zugehörigen linearen Funktionen in Scatter Plots dargestellt. Bei multiplen Regressionen mit mehr als einer unabhängigen Variablen wurde mittels der Regressionskoeffizienten deren gewichtete Summe berechnet und gegen die Zigarettenzahl pro Tag als abhängige Variable geplottet.

4. Ergebnisse

4.1 Demographische Daten

Obwohl die Ausgangszahl von Probanden, bei denen die Sputum-Induktion durchgeführt wurde, bei rund 100 lag, konnte aufgrund von Nichtansprechen auf die Methode bzw. Nichtauswertbarkeit der abgegebenen Sputumproben nur ca 50% der induzierten Probanden in die Studie eingeschlossen werden. Zwischen den Probanden mit und ohne verwertbaren Sputumproben bestanden hinsichtlich der Verteilung der Baseline-Variablen Alter, Geschlecht und Raucher-Status/Rauchfrequenz keine wesentlichen Unterschiede.

Die insgesamt n=47 Probanden mit gemäß den Einschlusskriterien auswertbarem induziertem Sputum waren bezüglich des Geschlechts annähernd gleichmäßig verteilt. Wie sich aus Abb. 1 ablesen lässt, beliefen sich die genauen prozentualen Anteile auf 53% Frauen versus 47% Männer. Die Alterverteilung war, wie sich aus der in Abb. 2 gezeigten Histogrammdarstellung ergibt, leicht rechtsschief, mit deutlich nach links verschobenem Gipfel, welcher auf die Klasse der 25- bis 30-jährigen entfällt.

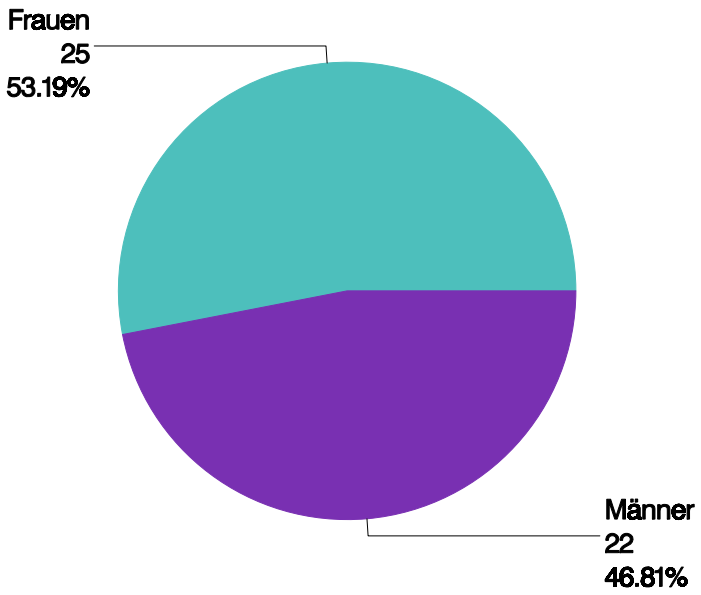

Abb.1: Geschlechtsverteilung im Gesamtkollektiv.

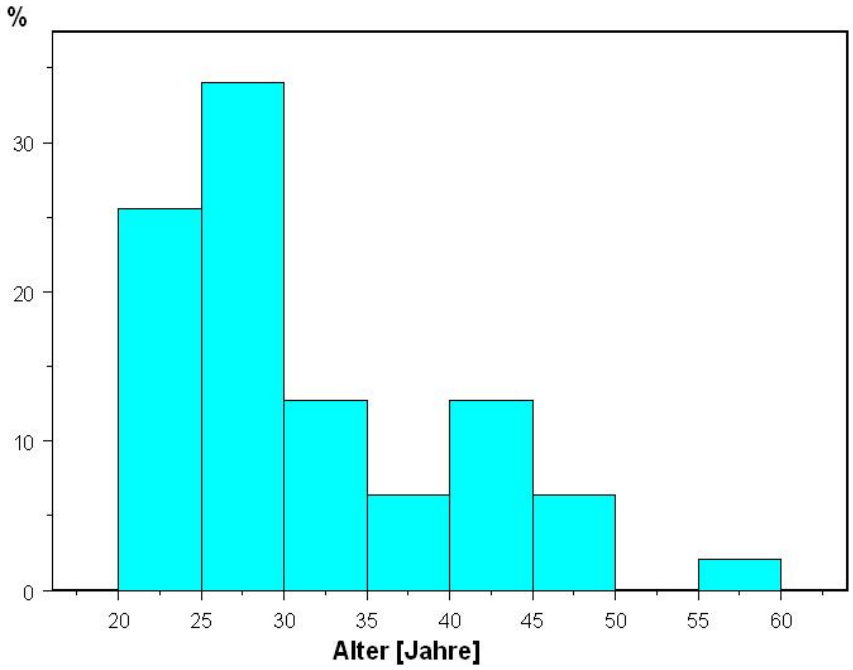

Abb. 2: Altersverteilung im Gesamtkollektiv (n=47)

Bei der Gegenüberstellung zwischen Rauchern (n=17) und Probanden, die niemals geraucht bzw. das Rauchen schon vor längerer Zeit (mindestens aber vor 5 Jahren) aufgegeben hatten (n=25+5 =30) , fand sich (vgl. die Box-Whiskers-Plots in Abb. 3 bei praktisch übereinstimmenden Medianen (27.0 versus 27.5 Jahre) in der ersteren Untergruppe neben deutlich ausgeprägterer Unsymmetrie (wiederum im Sinne von Rechtsschiefe) eine wesentlich größere Streuung (entsprechend der Höhe der Boxen).

Die Rauchexposition wurde sowohl bei den Rauchern als auch bei den Exrauchern eruiert. Die folgenden beiden Box-Whiskers-Plots beziehen sich nur auf die aktuellen Raucher im engeren Sinne, so dass ein Stichprobenumfang von n=17 zugrunde liegt. Die mediane Anzahl von Package Years (definiert als Produkt aus der Anzahl von Zigarettenpäckchen pro Tag und dem Zeitabstand zwischen Beginn des Rauchens und Durchführung der Sputuminduktion) belief sich auf 6.8. Die Zahl von täglich konsumierten Zigaretten wurde im Median mit 17.5 angegeben, entsprechend knapp 1 Päckchen pro Tag. Dieser Median

wurde von einigen Probanden um ein Vielfaches überschritten, mit einem Maximum von 50 Zigaretten pro Tag.

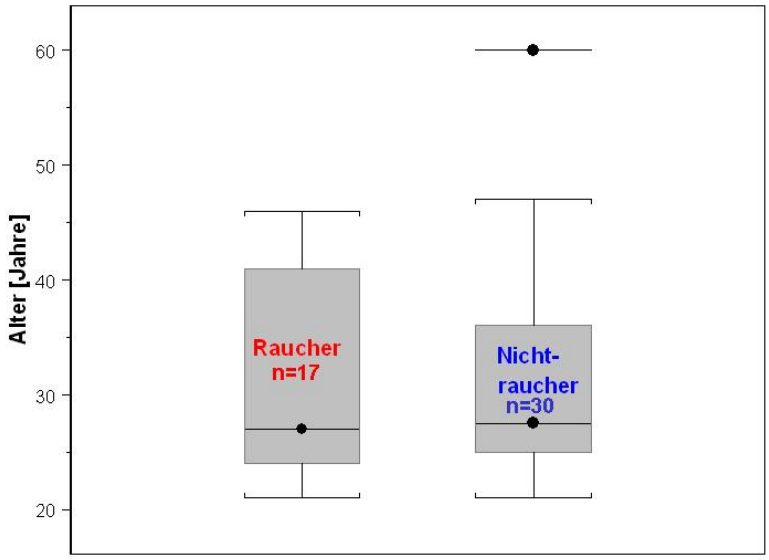

Abb. 3: Altersverteiltung nach Raucher-Status

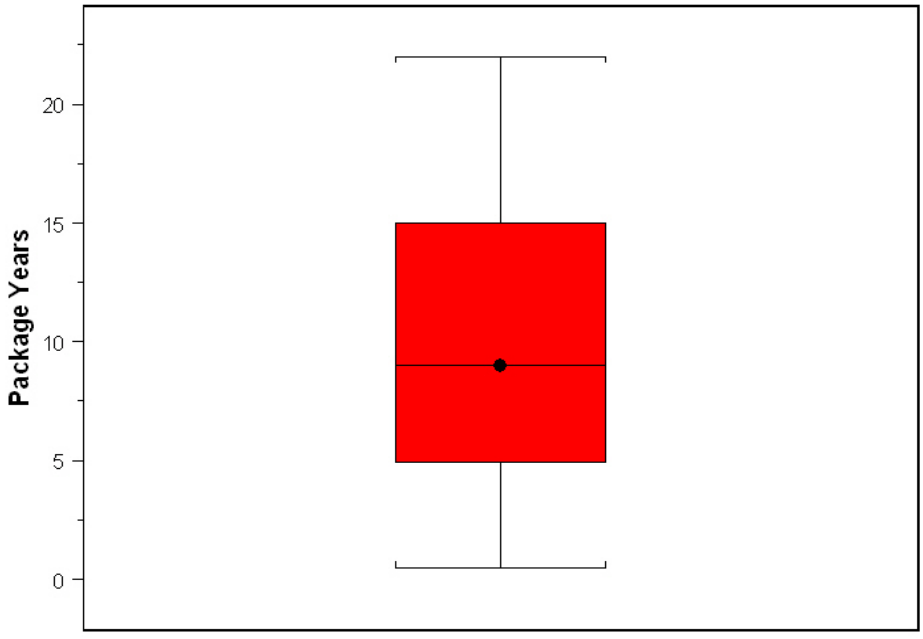

Abb. 4: Verteilung der Anzahl von Package Years bei den Rauchern (n=17).

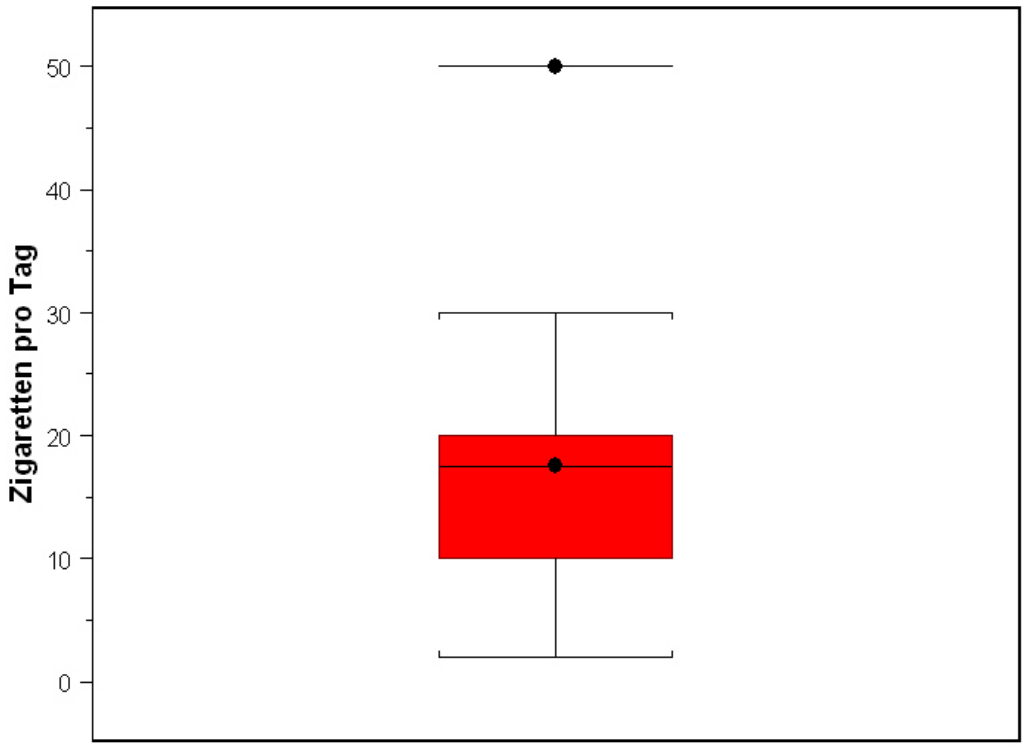

Abb. 5: Verteilung des täglichen Zigarettenkonsums bei den Rauchern (n=17).

Weitere Angaben zur Verteilung wichtiger demographischer Variablen sowie der zu Versuchsbeginn gemessenen Lungenfunktionsparameter enthält die nachfolgende Tabelle:

Tab. 1: Kennwerte zur Verteilung wichtiger Baseline-Variablen bei Rauchern und Nichtrauchern.

	Raucher		Nichtraucher
n	17		30
Alter ($\bar{y}$ ± s)	30.4 ± 8.8		31.1 ± 8.8
Geschlecht [m/w]	9/8		13/17
Anteil [%] Allergiker	30		40
FEV ($\bar{y}$ [l] ± s)	3.92 ± 0.81		4.01 ± 0.97
Package Years ($\bar{y}$ ± s)	10.2 ± 7.4		--

4.2 Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen

Bei der Auswertung der im Rahmen der immunhistochemischen Aufarbeitung erhobenen Daten handelt es sich lediglich um qualitative Ergebnisse.
Hierbei zeigten sich verschiedene Muster der Anfärbung, in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Antikörper.

4.2.1 hBD-1

Die Farbreaktion war in den meisten Fällen gut sichtbar. Es wurden hauptsächlich Makrophagen und neutrophile Granulozyten durch eine rote Anfärbung dargestellt. Hierzu ein entsprechendes Abbildungsbeispiel:

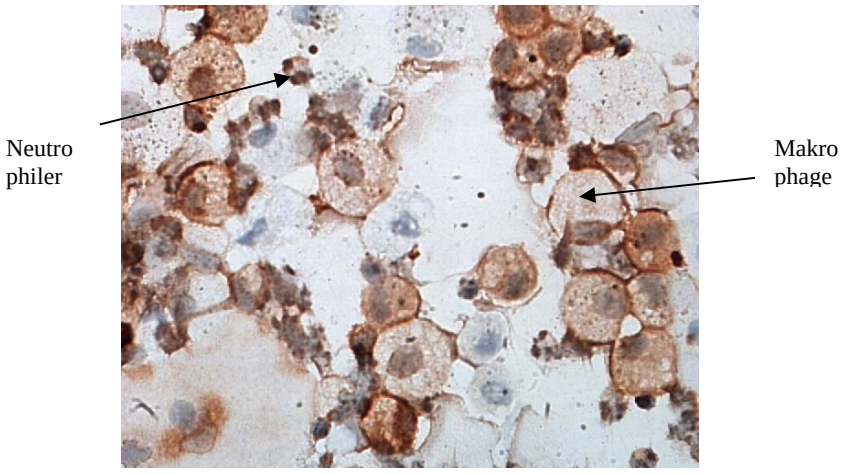

Abbildung 6: hBD-1im induzierten Sputum bei 50- facher Vergrößerung

4.2.2 hBD-2

Die immunhistochemische Aufarbeitung mit dem antimikrobiellen Peptid hBD-2 als primärer Antikörper erbrachte in den meisten Fällen kein eindeutig verifizierbares Ergebnis. Auch hierzu eine typische Abbildung:

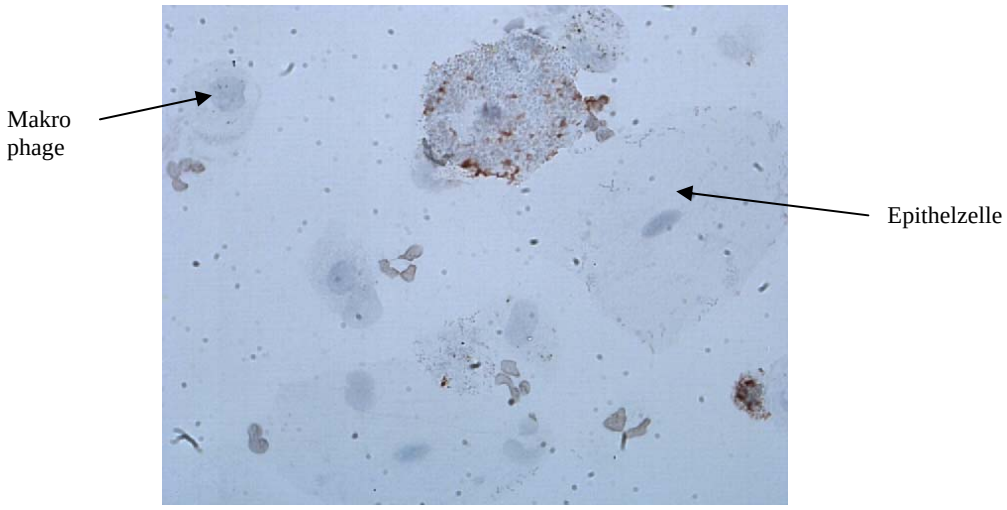

Abbildung 7: hBD-2 im induzierten Sputum bei 50-facher Vergrößerung

4.2.3 LL-37

Nach der Verwendung des primären Antikörpers LL-37 im Rahmen der immunhistochemischen Bearbeitung von Sputumpräparaten, konnte man erkennen, dass hierdurch vermehrt neutrophile Granulozyten angefärbt wurden, besonders im Vergleich zu hBD-1. Im folgenden erneut eine Beispielabbildung:

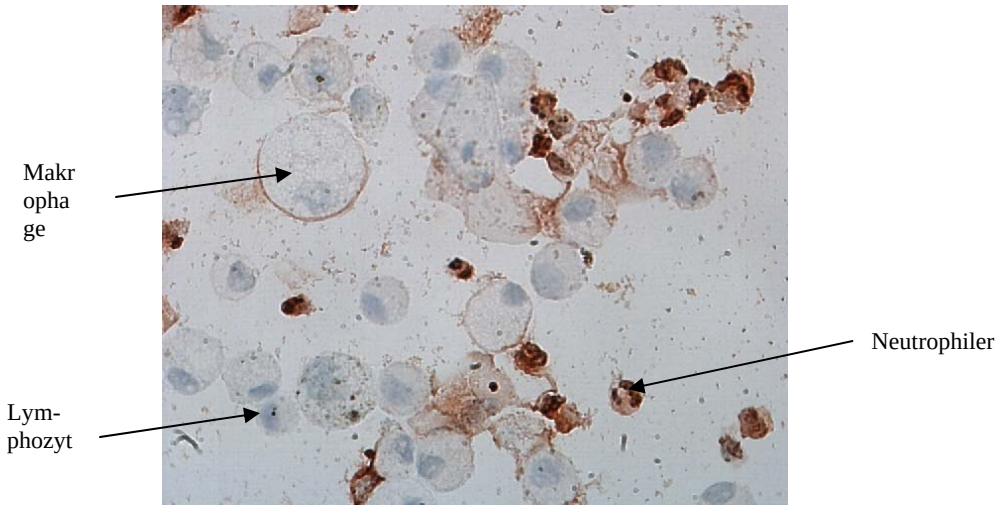

Abbildung 8: LL-37 im induzierten Sputum bei 50-facher Vergrößerung

4.2.4 Kontrolle

Zur Kontrolle der tatsächlich erfolgten Antigen-Antikörper Reaktion wurde stets ein Kontrollpräparat angefertigt. In diesem Fall wurde statt eines primären Antikörpers ein neutrales Medium, in der Regel PBS, verwandt. Nachfolgend die entsprechende Kontrolle zu der in §4.2 dokumentierten Serie von Sputum-Proben:

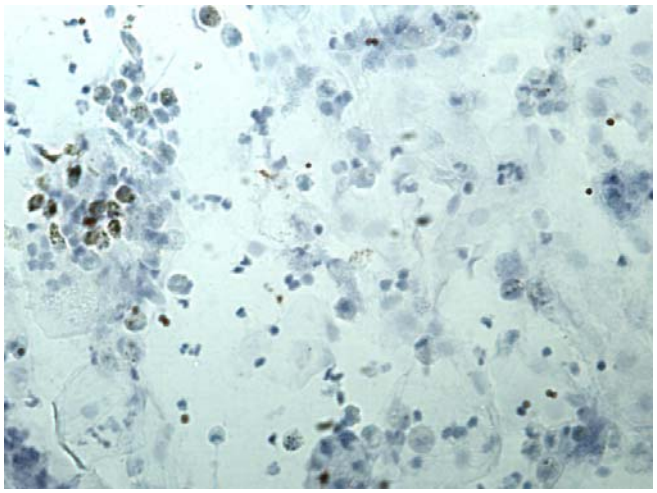

Abbildung 9: Kontrolle im induzierten Sputum bei 20-facher Vergrößerung

4.3 Univariate Vergleiche zwischen Rauchern und Nicht-/ Exrauchern bezüglich Zellzahlen und biochemischer Parameter

In den univariaten Analysen wurde für alle Variablen Graphiken erstellt, die für beide Gruppen getrennt zu jedem möglichen Meßwert den Anteil von Probanden mit über diesen hinausgehendem Meßergebnis ("proportion exceeding") darstellen. Diese Kurven leiten sich direkt aus den sog. empirischen Verteilungsfunktionen ab (vgl. z.B. Schäfer, 2001, §1.3.5). Verläuft eine der beiden Kurven “im wesentlichen“ oberhalb der anderen, zeigt dies an, dass die Probanden in der ersteren zu höheren Werten tendieren als diejenigen in der Vergleichsgruppe. Die zu jedem Paar von Verteilungskurven angegebenen p-Werte basieren auf dem nichtparametrischen U-Test von Mann-Whitney-Wilcoxon (siehe Schäfer, a.a.O., §3.9), der die Nullhypothese prüft, dass die entsprechenden Kurven in den Grundgesamtheiten, welchen die Stichproben ent-

stammen, identisch sind. Alle p-Werte beziehen sich auf die einseitige Version des Tests. Sie gelten also unter der Voraussetzung, dass von vornherein nur Abweichungen zwischen Rauchern und Nichtrauchern in eine von beiden möglichen Richtungen in Betracht zu ziehen waren.

Abbildung 10 zeigt die bezüglich der Gesamtzell-Zahl gefundenen Verteilungen. Erwartungsgemäß verläuft die für die Raucher ermittelte Kurve praktisch über der gesamten X-Achse oberhalb der für die Nichtraucher gefundenen Verteilungskurve. Im Einklang hiermit verfehlte der p-Wert auf dem (einseitigen) Mann-Whitney-Wilcoxon Test die übliche Signfikanzschranke mit 5.7% nur knapp.

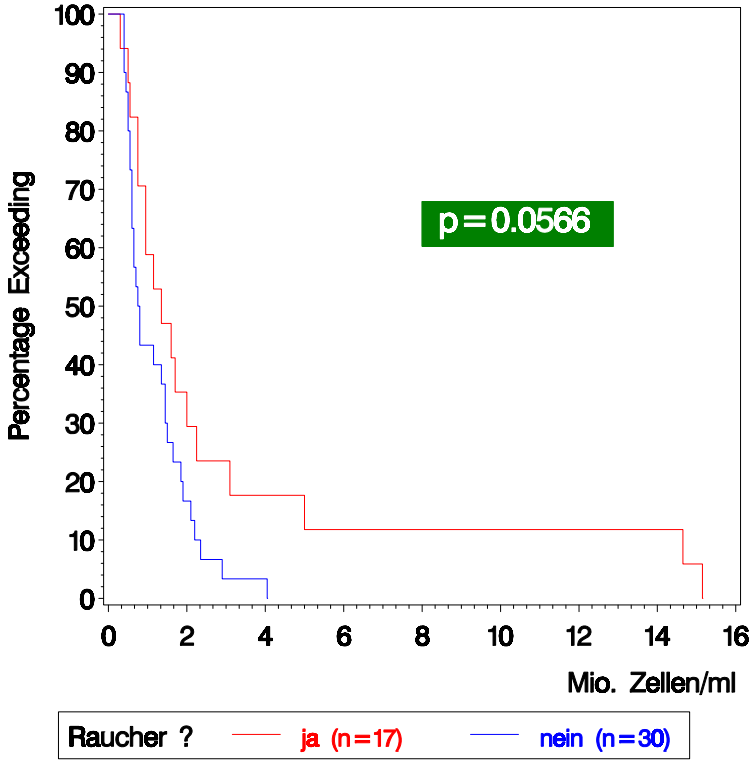

Abb. 10: Verteilung der Gesamtzell-Zahl bei Nichtrauchern und Rauchern.

Bei der Vitalität ergab sich ein weitgehend ausgeglichenes Bild, indem beide Überschreitungsfunktionen einen sehr ähnlichen Verlauf aufwiesen. Wie die detaillierte graphische Darstellung in Abbildung 11 u.a. außerdem zeigt, traten

Vitalitätswerte unterhalb der üblichen Normgrenze von 70 [%] in beiden Gruppen nur in wenigen Ausnahmefällen auf.

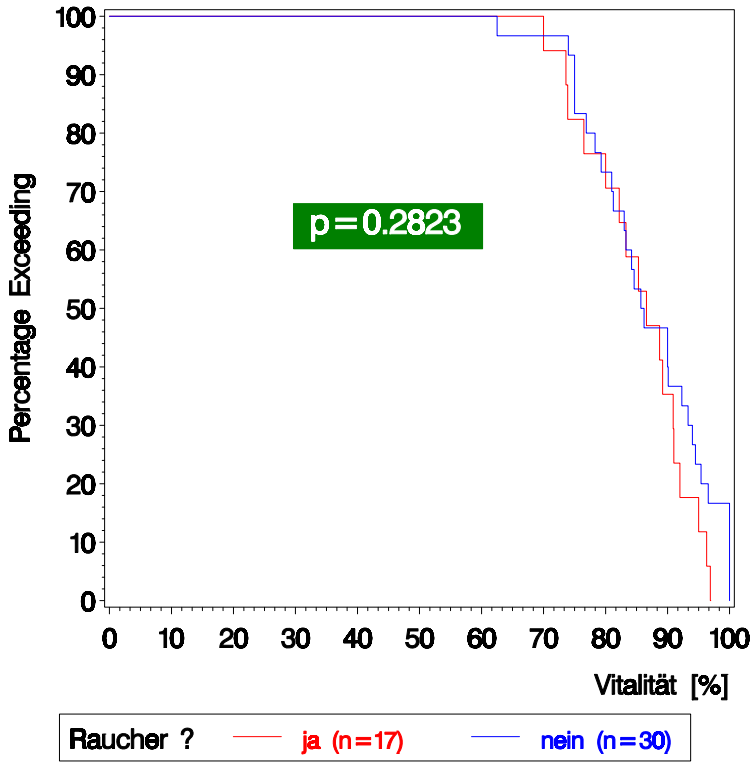

Abb. 11: Verteilung der Zellvitalität bei Nichtrauchern und Rauchern.

Hinsichtlich des Prozentsatzes von Makrophagen unter den im induzierten Sputum ausgezählten Zellen unterschieden sich Raucher und Nichtraucher sehr deutlich: Wie aus Abbildung 12 ersichtlich wird, lag die Überschreitungskurve für die Nichtraucher über dem gesamten Range dieser Größe weit über der entsprechenden Kurve für die Raucher. Der p-Wert im Mann-Whitney-Wilcoxon-Test lag dementsprechend deutlich unterhalb der Signifikanzschwelle. Zur Ergänzung ist in Abbildung 12a das entsprechende Box-Whiskers-Plot hinzugefügt, aus dem insbesondere die Unterschiedlichkeit der Mediane direkt ersichtlich wird.

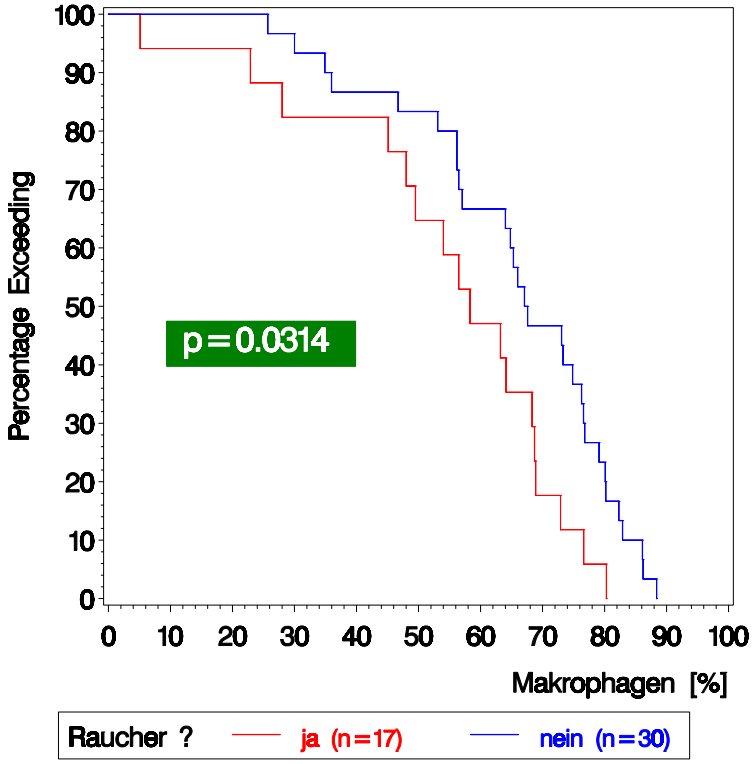

Abb. 12: Verteilung des Makrophagen-Anteils im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

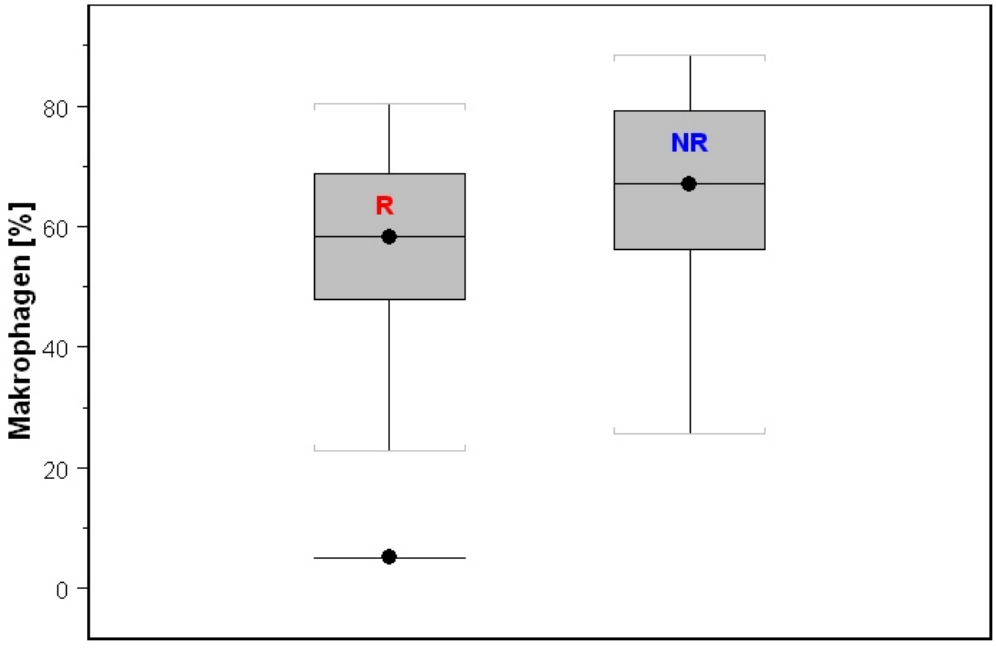

Abb. 12a: Box-Whiskers-Plot zu den Verteilungen aus Abbildung 12.

Das Ergebnis des analogen Vergleichs hinsichtlich des prozentualen Anteils neutrophiler Granulozyten zeigen die Abbildungen 13/13a. Hier kehrte sich die Richtung des Unterschiedes, der sich wiederum fast gleichmäßig auf den gesamten Range der Variablen bezog und für den im Mann-Whitney-Wilcoxon Test der p-Wert praktisch exakt mit der Signifikanzschwelle zusammenfiel, erwartungsgemäß um: Die im induzierten Sputum untersuchten Zellen spalteten sich zum weitaus überwiegenden Anteil (> 90%) auf in Makrophagen und neutrophile Granulozyten, so dass zwischen Makrophagen- und neutrophilen-Anteil in derselben Probe eine sehr hohe negative Korrelation bestand. Diese wird durch den geringen Abstand der Einzelpunkte von der Regressionsgeraden im Streuungsdiagramm aus Abbildung 13b veranschaulicht.

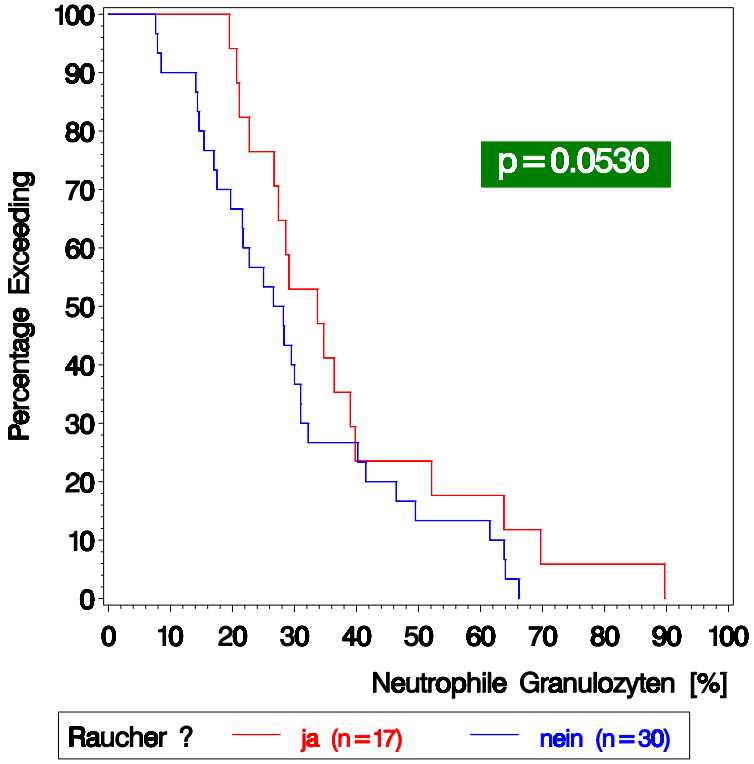

Abb. 13: Verteilung des Anteils neutrophiler Granulozyten im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

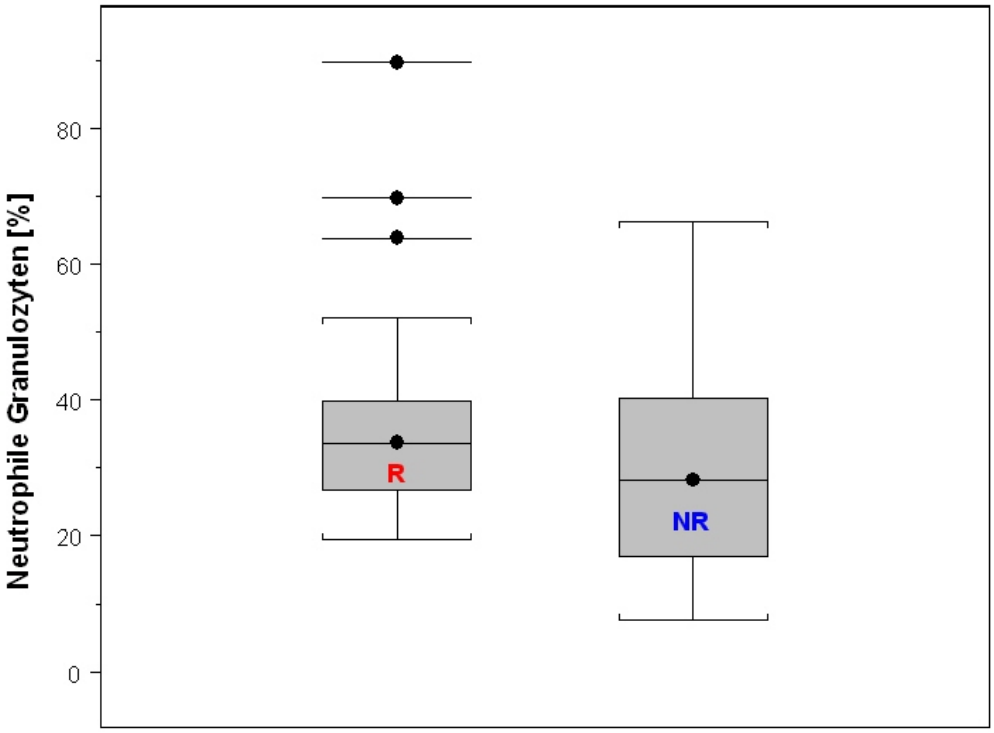

Abb. 13a: Box-Whiskers-Plot zu den Verteilungen aus Abbildung 13.

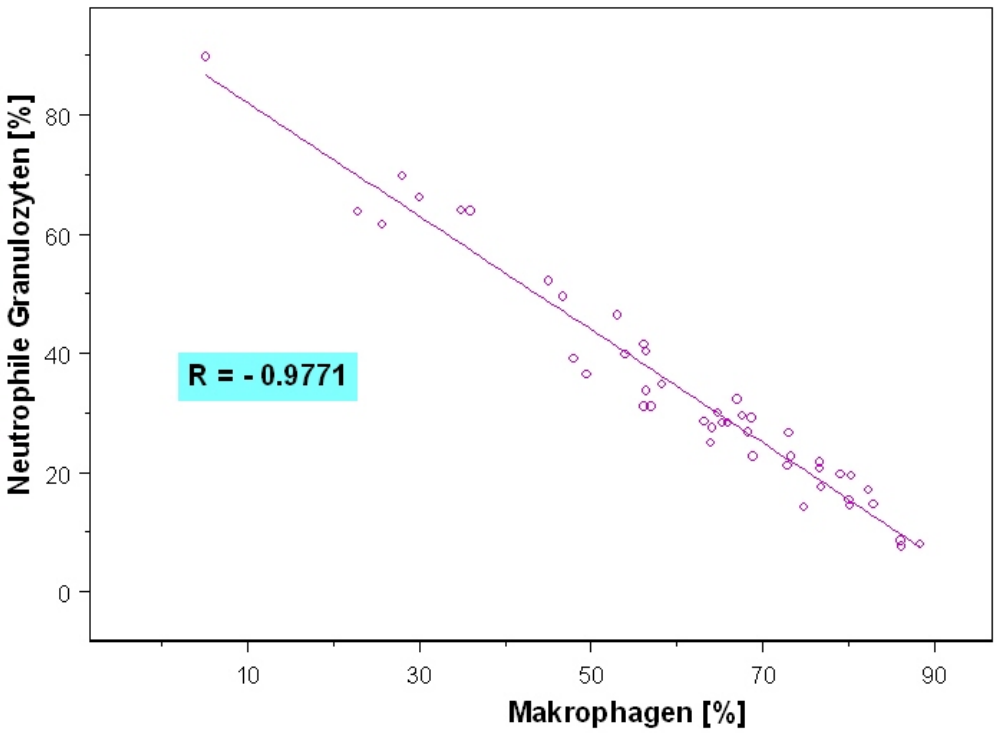

Abb. 13b: Lineare Regression des Anteils neutrophiler Granulozyten auf den Makrophagen-Anteil im Gesamtkollektiv.

Der im Vergleich zur Gesamtzellzahl in beiden Gruppen geringe Anteil an Lymphozyten war zwischen Rauchern und Nichtrauchern ebenfalls deutlich unterschiedlich verteilt, wie eine genauere Inspektion der folgenden Abbildung 14 zeigt. Ausschlaggebend für die Beurteilung des Ausmaßes der Unterschiedlichkeit beider Verteilungen ist nämlich der vertikale Abstand der dargestellten Kurven, der vor allem für Werte bis 6 [%] beträchtlich ist. Insoweit stimmt der im Mann-Whitney-Wilcoxon-Test gefundene p-Wert von rund 3% mit dem optischen Eindruck überein.

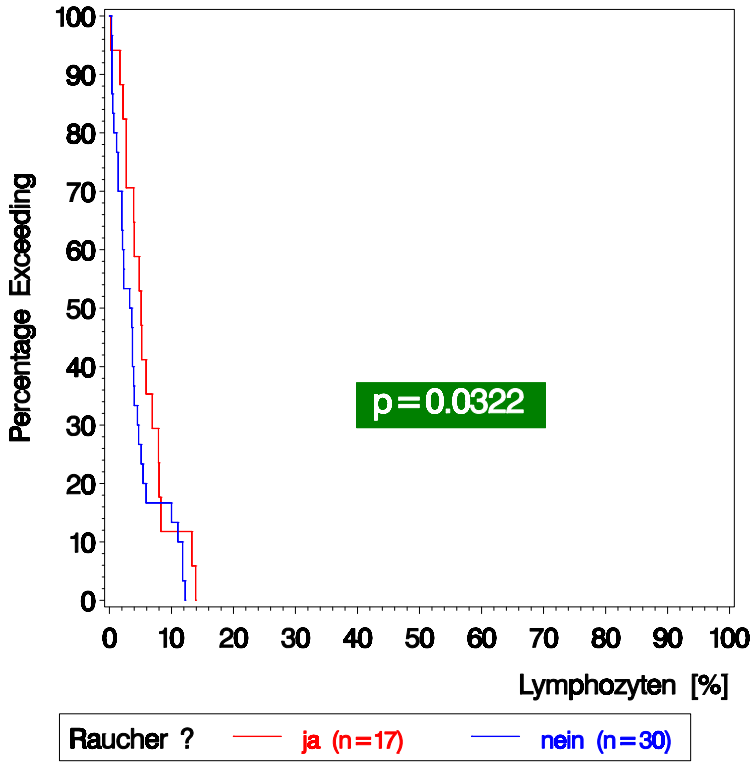

Abb. 14: Verteilung des Anteils von Lymphozyten im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

Für den Proteingehalt zeigte sich, wie aus der nächsten Graphik (Abbildung 15) ersichtlich wird, eine deutliche Verschiebung der Verteilung bei den Rauchern in Richtung auf kleinere Werte. Im einseitigen Mann-Whitney-Wilcoxon Test ergab sich mit einem p-Wert von rund 6% ein knapp oberhalb der Signifikanzschranke gelegenes Resultat.

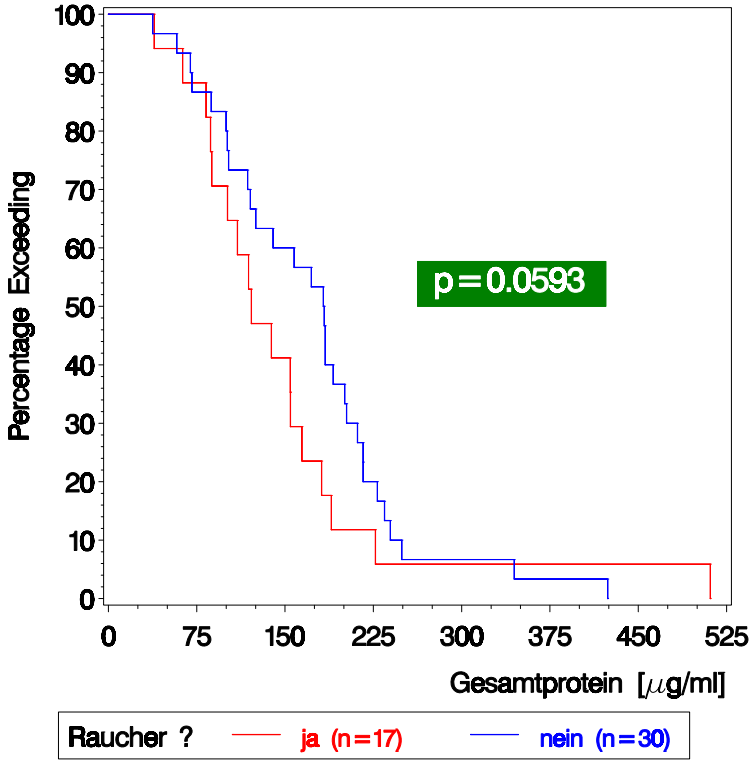

Abb. 15: Verteilung des Gesamtproteins im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

Weniger eindeutig ist das Bild, das sich für IL-1β ergab. Von den in Abbildung 16 hierzu dargestellten Überschreitungsfunktionen liegt zwar diejenige für die Raucher im weitaus überwiegenden Teil des Wertebereichs weit oberhalb der für die Nichtraucher ermittelten Kurve, was sich insbesondere in einer Erhöhung des Medians für die Raucher manifestiert (→ Abbildung 16 a). Auf Grund der Überschneidung beider Kurven in der Nähe des Ursprungs sowie am rechten Rand des Wertebereichs lag aber der p-Wert aus dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test mit rund 12% deutlich oberhalb der Signifikanzschranke.

.

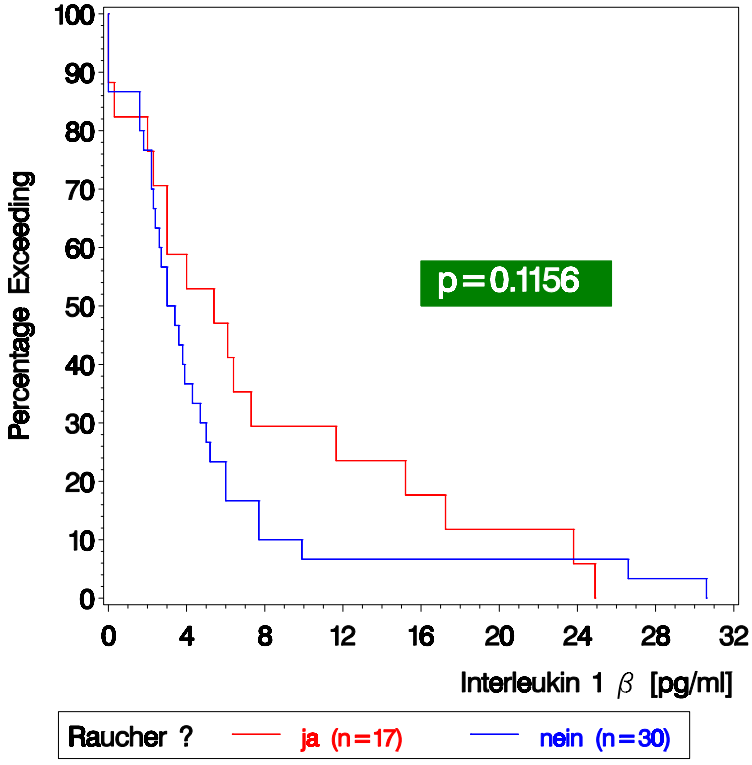

Abb. 16: Verteilung von Interleukin 1 β im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern

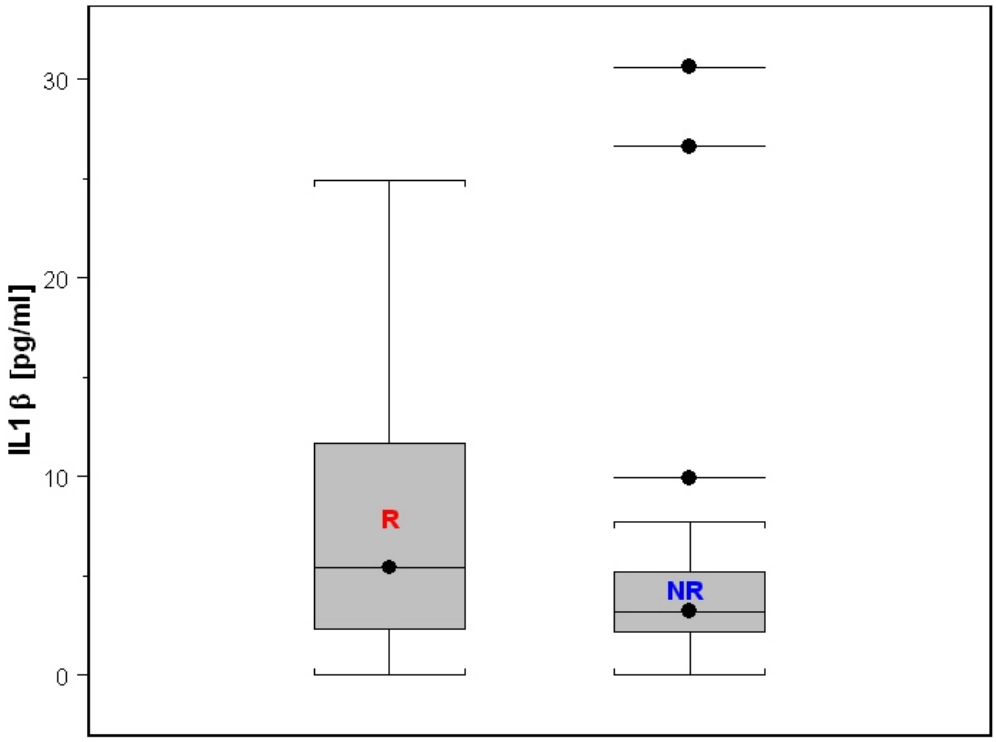

Abb. 16a: Box-Whiskers-Plot zu Abbildung 16.

Die genaue Verteilung der Interleukin-6-Werte ist in Abbildung 17 dargestellt. Wie aus der Graphik unmittelbar ersichtlich wird, bezieht sich der Hauptunterschied zwischen Rauchern auf den Anteil von Werten unterhalb der messtechnischen Nachweisbarkeitsgrenze (Nullwerte).

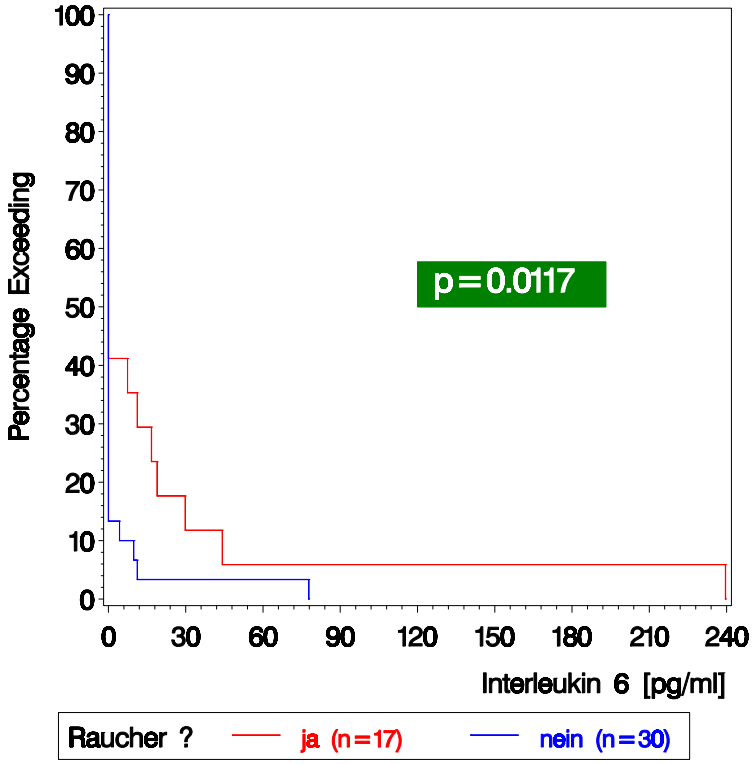

Abb. 17: Verteilung von Interleukin 6 im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

Während in den Sputumproben von weniger als 15% der Nichtraucher IL 6 in meßbaren Mengen vorhanden war, wurden IL-6-Werte oberhalb der Nachweisbarkeits-Grenze bei mehr als 40% der Raucher gemessen. Das durch den hohen Anteil von Nullwerten bedingte "pathologische" Aussehen der IL-6-Verteilung, besonders bei den Nichtrauchern, wird aus den zugehörigen Box-Whiskers-Plots (→ Abbildung 17 a) ersichtlich:

Bei den Nichtrauchern besteht die Verteilung der Nichtnull-Werte ausschließlich aus Ausreißern, d.h. aus Werten, die um mehr als das 1.5-fache des Quartilabstandes vom oberen Quartil abweichen, wobei Q3 genau wie Q1 und der Median mit der Null zusammenfällt. Im Gegensatz dazu hat bei den Rauchern

die obere Hälfte der Box eine normale Form, indem das dritte Quartil wie gewohnt gegenüber dem Median deutlich nach oben verschoben ist. Der p-Wert von rund 1%, der unter Berücksichtigung des hohen Anteils sogenannter Bindungen (Übereinstimmungen der Meßergebnisse verschiedener Probanden) mittels des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests berechnet worden ist, spiegelt in erster Linie den großen Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich des Anteils von Nullwerten wider.

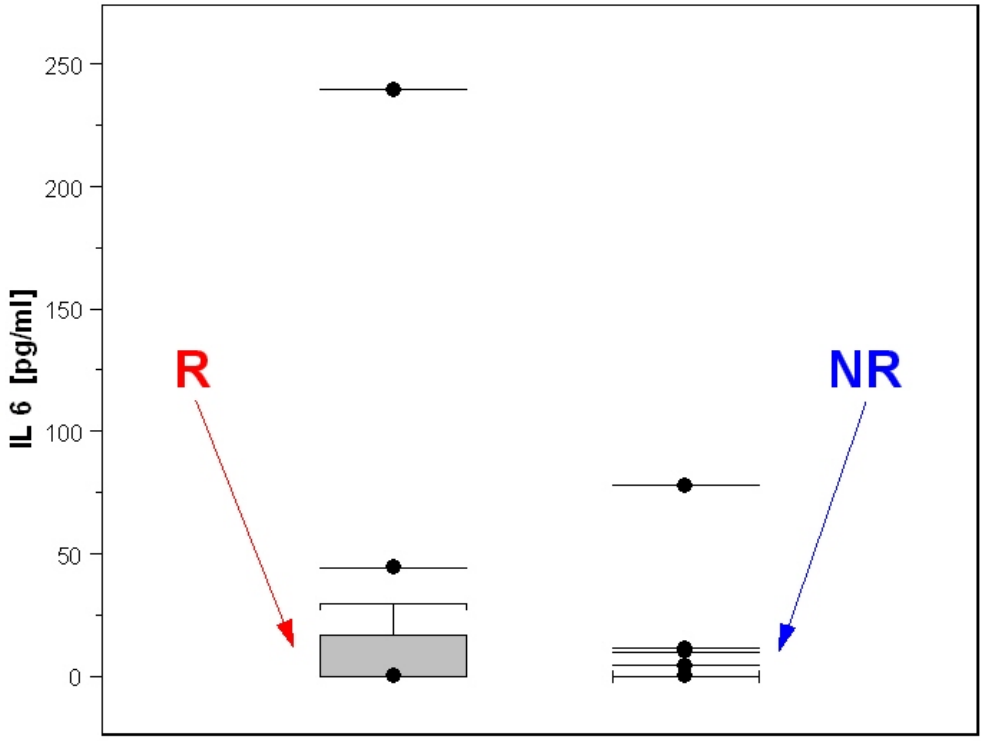

Abb. 17a: Box-Whiskers-Plot zu den Verteilungen aus Abbildung 17.

Im Gegensatz zum Interleukin 6 erwiesen sich für Interleukin 8 die Unterschiede der Verteilungen bei Rauchern und Nichtrauchern als vernachlässigbar (siehe Abbildung 18). Insbesondere waren die Unterschiede zwischen den medianen IL-8-Werten sehr gering (→ Abbildung 18 a), und der p-Wert aus dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test lag mit rund 31% dementsprechend weit weg von der Signifikanzschranke.

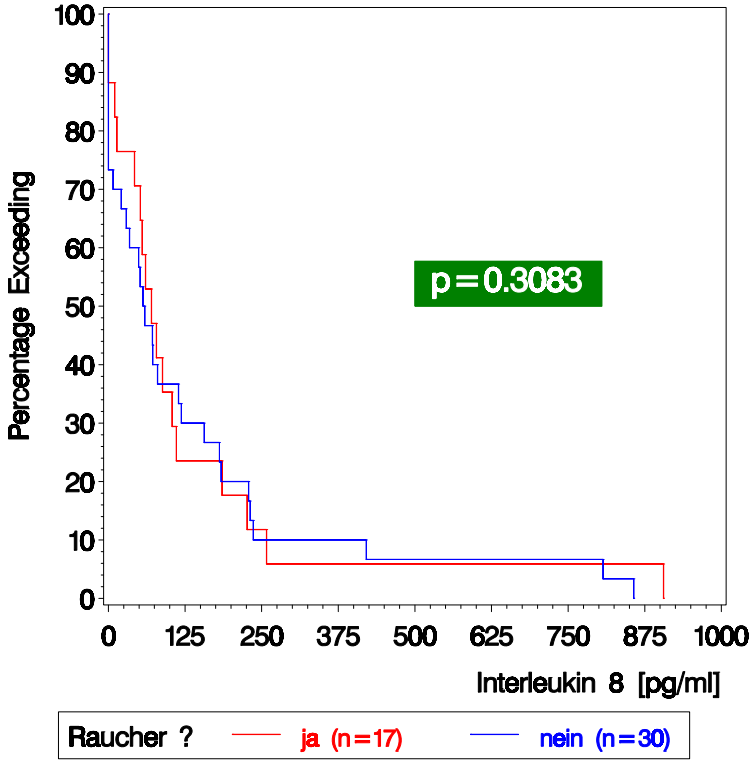

Abb. 18: Verteilung von Interleukin 8 im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

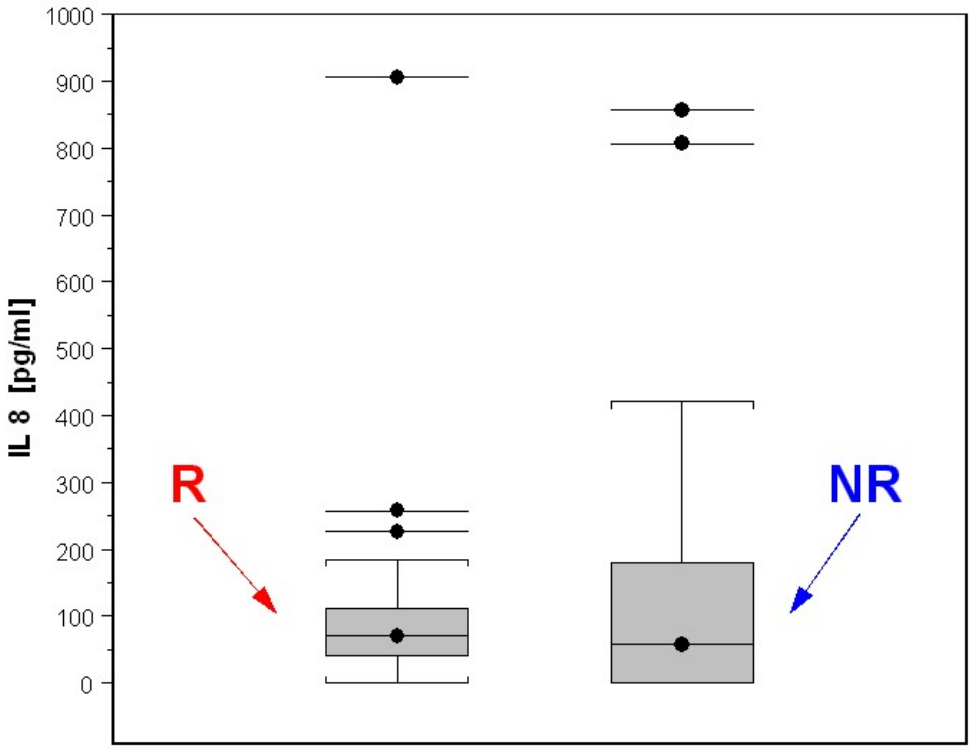

Abb. 18a: Box-Whiskers-Plot zu den Verteilungen aus Abbildung 18.

Die detaillierte Darstellung der für LL 37 erhaltenen Ergebnisse enthält Abbildung 19.

Der Verlauf der Verteilungskurven von Rauchern gegenüber Nichtrauchern lässt eine ausgeprägte Tendenz zu erhöhten LL-37-Werten erkennen. Wie Abbildung 19a zeigt, lag insbesondere der mediane LL-37-Wert bei Rauchern fast doppelt so hoch wie bei Nichtrauchern. Im Mann-Whitney-Wilcoxon-Test ergab sich mit 8.5 % zwar kein unterhalb der Signifikanzschranke gelegener p-Wert. Dies lässt jedoch in keiner Weise den Schluss zu, dass es sich um lediglich zufallsbedingte Abweichungen zwischen den Gruppen handelt, da die Power des Tests in Anbetracht der Stichprobenumfänge ziemlich gering war.

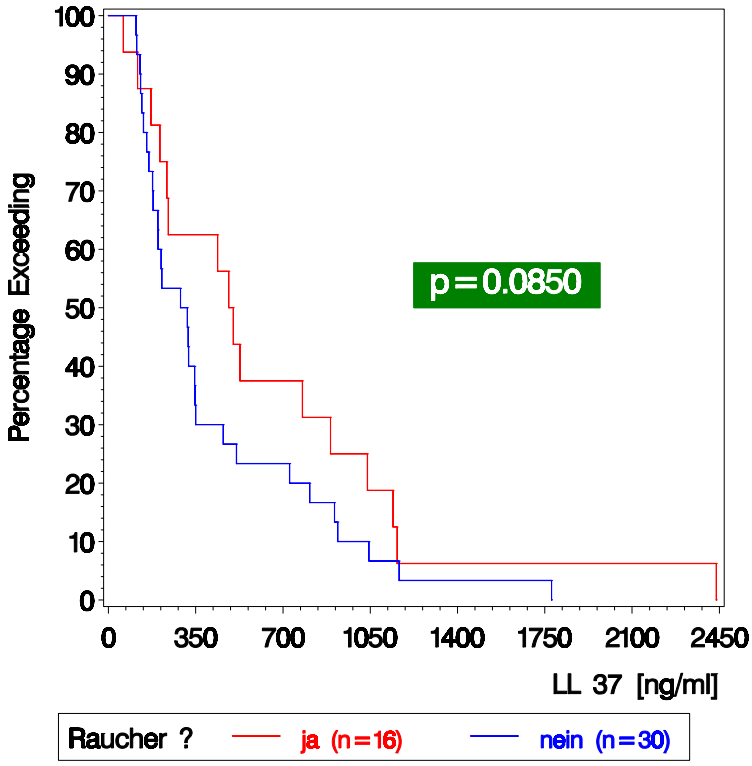

Abb. 19: Verteilung von LL 37 im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

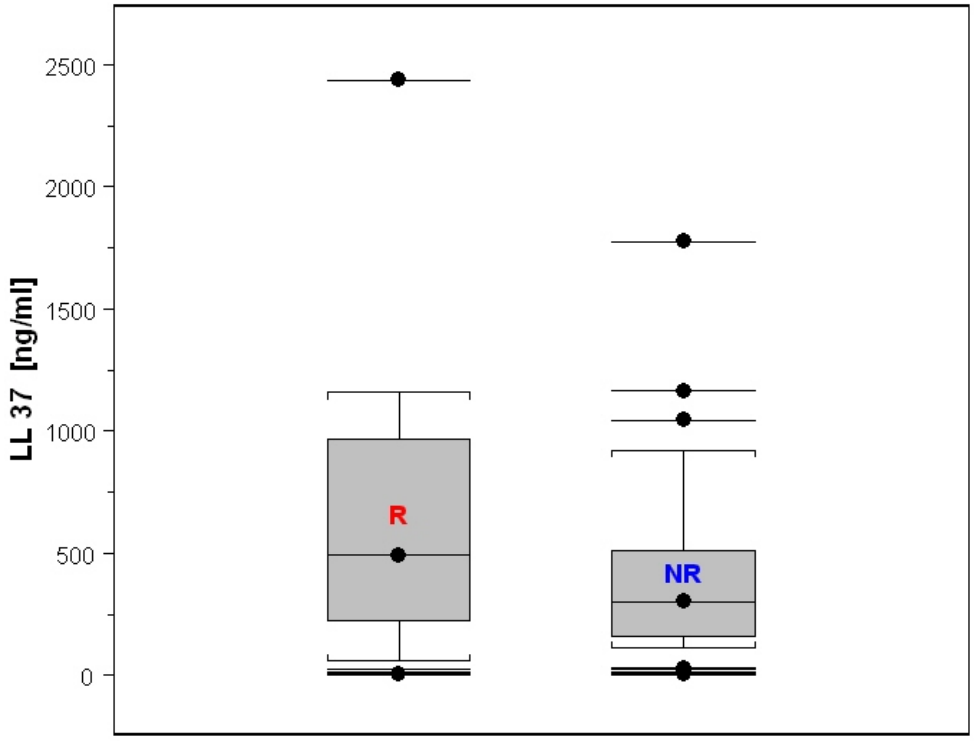

Abb. 19a: Box-Whiskers-Plot zu den Verteilungen aus Abbildung 19.

Der letzte Schritt der univariaten Analyse bezog sich auf die Ergebnisse der Mucin-Bestimmungen. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, konnte der Befund von Caramori [2004], dass es bei Rauchern zu einer beträchtlichen Erhöhung des Mucin-Levels kommt, eindeutig reproduziert werden. Der Unterschied war statistisch signifikant, bei einem sogar unterhalb von 1% gelegenem p-Wert im zugehörigen nichtparametrischen Test. Wie das zugehörige Paar von Box-Whiskers-Plots (→ Abbildung 20a) zeigt, manifestierte sich die Erhöhung der Mucinwerte unter Zigarettenrauch-Exposition mit Bezug auf die Quartile beider Verteilungen in der Weise, dass der Median für die Gruppe der Nichtraucher ziemlich genau dem unteren Quartil bei den Rauchern entsprach.

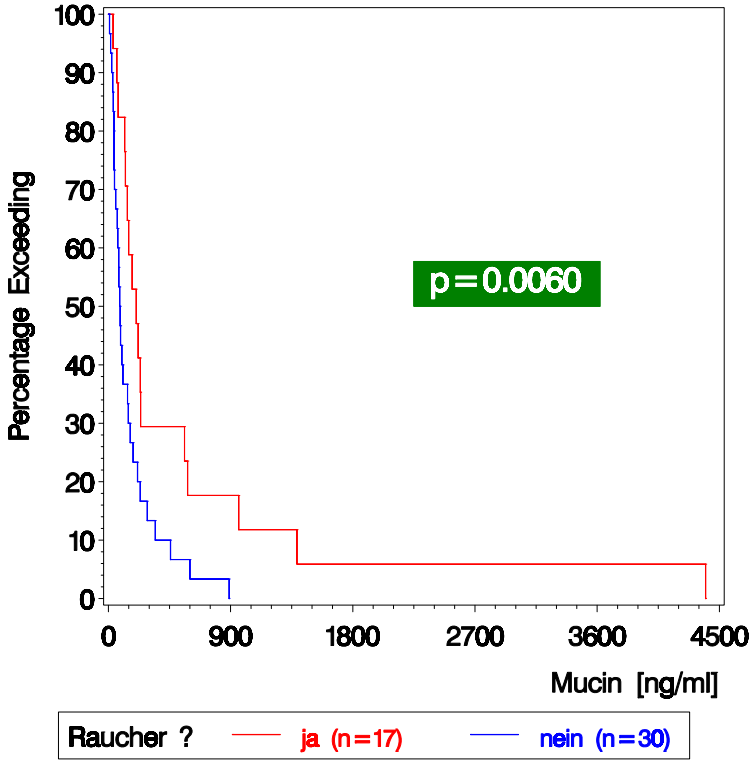

Abb. 20: Verteilung von Mucin im induzierten Sputum von Nichtrauchern und Rauchern.

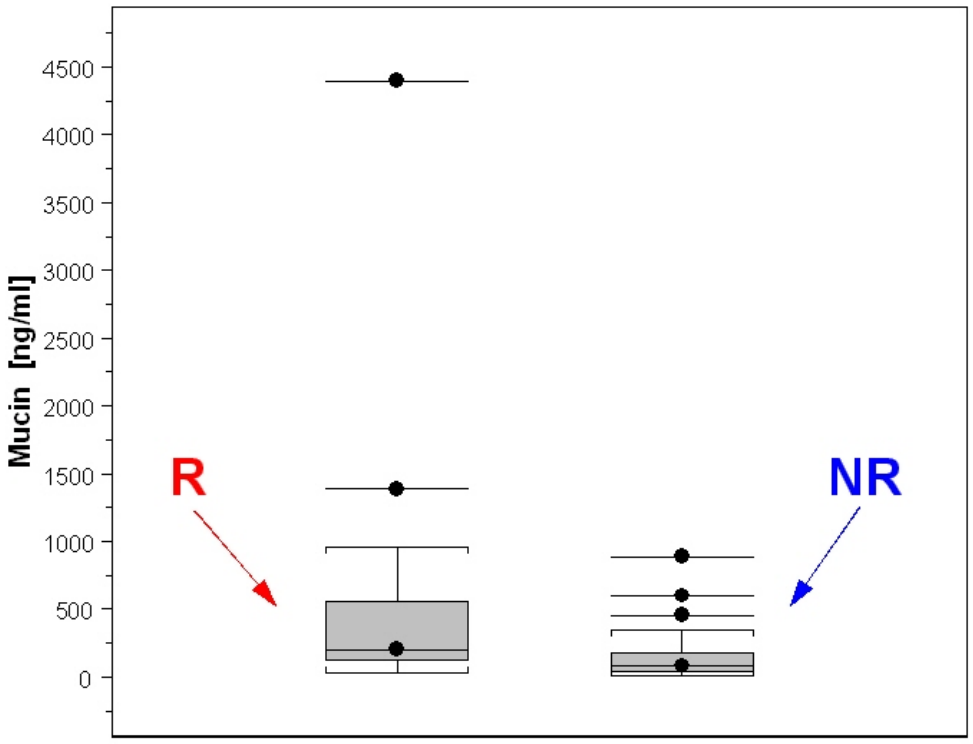

Abb. 20a: Box-Whiskers-Plot zu den Verteilungen aus Abbildung 20.

4.4 Untersuchung zur Diskrimination zwischen Rauchern und Nichtrauchern mittels der im induzierten Sputum bestimmten Parameter

Ein plausibler Ansatz zur Bewertung des Ausmaßes der Assoziation zwischen ausgewählten Laborparametern und Expositionsstatus (in unserem Falle dem Indikator für Zigarettenrauchen) beruht auf folgender Überlegung: Angenommen, die zu bewertenden Parameter sollen dazu verwendet werden, im Sinne einer diagnostischen Beurteilung für einen beliebigen Probanden vorherzusagen, ob es sich um einen Raucher oder Nichtraucher handelt. Je besser die Treffergenauigkeit, die sich dabei erzielen lässt, umso enger die Assoziation.

Im ersten Schritt dieses Teils der Datenanalyse wurde eine logistische Regression mit *allen* 11 in §4.3 auf der univariaten Ebene analysierten Parametern durchgeführt. Diese wurden dabei als die unabhängigen Variablen behandelt, während der Raucherstatus als abhängige Variable diente. Die hierbei ermittelten Regressionskoeffizienten, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, wurden anschließend als Gewichte für die rechnerische Zusammenfassung der 11 IS-bezogenen Variablen zu einem Gesamtscore benutzt. Für diesen wurde ein Cut-off-Wert bestimmt, mit dem die optimal mögliche Trennung zwischen Rauchern und Nichtrauchern erreicht wird, sofern ein Proband bei Überschreiten dieses Cut-off als Raucher und bei Unterschreiten als Nichtraucher klassifiziert wird. Die hierbei erreichte Trefferquote lässt sich leicht durch Auszählen über die in dem als Abbildung 21 dargestellten Punktediagramm bestimmen: Jeder rot markierte Punkt unterhalb der Cut-off-Linie entspricht einem Raucher, der fälschlich als Nichtraucher klassifiziert wurde. Analog entsprechen die oberhalb der Linie gelegenen, blau gezeichneten Punkte je einem falsch zugeordneten Nichtraucher. Wie man sieht, gab es 4 Raucher und 1 Nichtraucher, die unter Ausnutzung der in allen 11 Parametern enthaltenen Information nicht korrekt eingruppiert wurde. Als Trefferquote ergab sich dementsprechend die Zahl: $100 \times (1 - 5/46) = 89.1\%$.

Tab. 2: Ergebnisse der logistischen Regression mit allen 11 IS-bezogenen Parametern als unabhängigen und dem Raucherstatus als abhängiger Variablen.

Variable	Intercept	Zellz.	Vit	Prot	Makr	Neut
Regr.-Koeff.	85.4084	2.447E-7	-0.1102	-0.00154	-0.8264	-0.7556
	Lymph	IL 1 β	IL 6	IL 8	Mucin	LL 37
	-0.7016	0.1416	0.1577	-0.0183	0.00320	0.00172

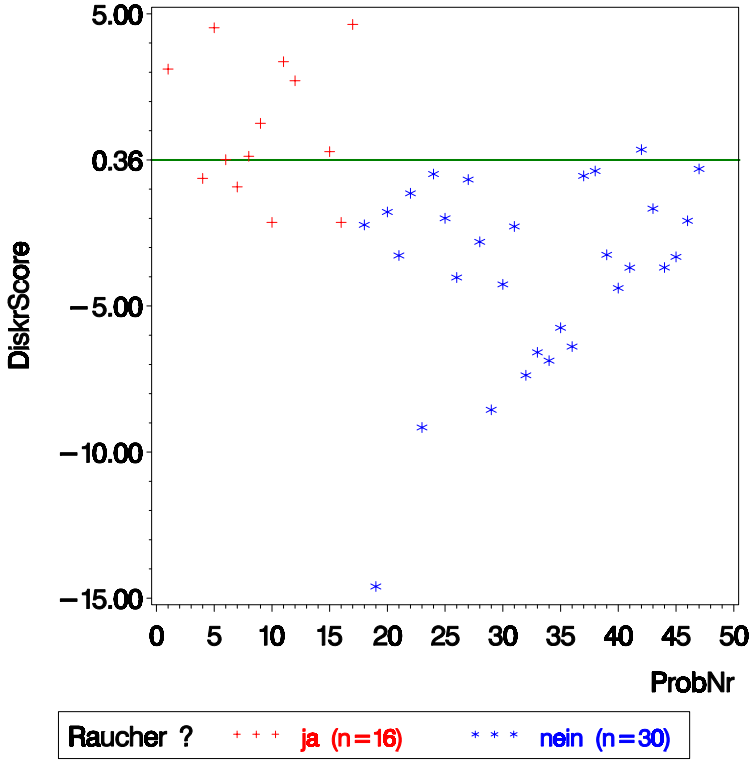

Abb. 21: Werte der Diskriminanzfunktion auf der Basis aller 11 Parameter aus der Untersuchung des induzierten Sputums.

Zur Evaluierung des Beitrags, den die biochemischen Parameter zur diagnostischen Trennung zwischen Rauchern und Nichtrauchern leisten, wurden anschließend die analogen Schritte ohne Berücksichtigung der Interleukine, von Mucin sowie LL 37 durchgeführt. Das logistische Regressionsmodell, das dabei

an die Daten angepasst wurde, umfasste demnach nur noch 6 unabhängige Variablen, für deren Regressionskoeffizienten sich die in Tabelle 2 gezeigten Werte ergaben.

Tab. 3: Ergebnisse der logistischen Regression bei Nichtberücksichtigung der biochemischen Parameter.

Variable	Intercept	Zellz.	Vit	Prot	Makr	Neut
Regr.-Koeff.	27.4402	4.59E-7	-0.0274	-0.00341	-0.2725	-0.2489
	Lymph	---	---	---	---	---
	-0.1909	---	---	---	---	---

Als optimaler Cut-off-Wert, mit dem der zugehörige, weder die Interleukine noch Mucin oder LL 37 einbeziehende Score für die Zwecke der Trennung zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu vergleichen ist, ergab sich die Zahl -0.343. Wie sich anhand von Abbildung 22 optisch nachvollziehen lässt, ist diesmal die Anzahl von Punkten, die auf der falschen Seite der Cut-off-Linie liegen, erheblich größer als vorher, als auch die 5 biochemischen Parameter eingingen. Die genaue Auszählung ergibt jetzt 6 falsch klassifizierte Raucher und 5 in die Gruppe der Raucher einzuordnende Nichtraucher, so dass die diagnostische Trefferquote absinkt auf den Wert: $100 \times (1 - 11/46) = 76.1\%$. Der Zuwachs auf fast 90% korrekter Zuordnungen, der sich unter Einbeziehung der biochemischen Parameter erzielen ließ, spiegelt deren Relevanz für die Differenzierung zwischen beiden Probandengruppen wider.

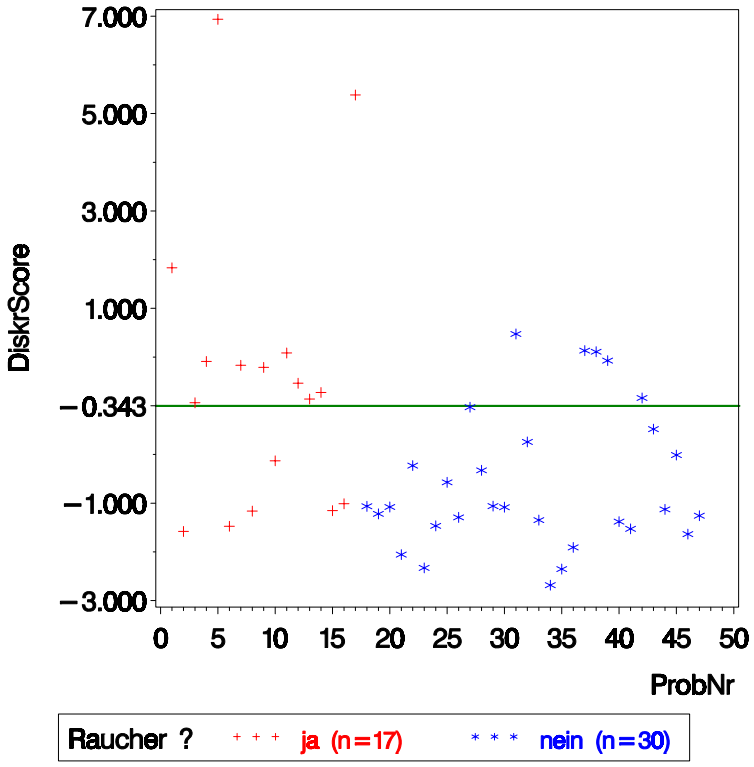

Abb. 22: Werte der Diskriminanzfunktion bei Elimi-nierung der biochemischen Parameter.

4.5 Multivariate Untersuchung der Abhängigkeit zwischen Rauchfrequenz und den im induzierten Sputum bestimmten Parametern

In Anbetracht der im vorangehenden Abschnitt dargestellten positiven Ergebnisse zur Frage der diagnostischen Wertigkeit der im induzierten Sputum bestimmten Parameter für die Trennung zwischen Rauchern und Nichtrauchern lag es nahe zu überprüfen, inwieweit diese auch als Prädiktoren für die quantitative Rauchexposition von Bedeutung sind. Hierzu wurden für die Gruppe der Raucher multiple lineare Regressionensananalysen mit der täglichen Rauchfrequenz als der abhängigen Variablen und verschiedenen Kombinationen bzw. Auswahlen von IS-bezogenen Parametern als unabhängigen Variablen durchgeführt. Die Auswahl der relevanten Einflussgrößen erfolgte dabei schrittweise, und zwar sowohl unter schrittweiser Hinzufügung weiterer Prädiktoren (Forward Selection) als auch "abbauend", d.h. mit schrittweiser Verringerung der Anzahl berücksichtigter Kovariablen (Backward Elimination).

Beide Verfahren der Variablenselektion führten zum selben Ergebnis: Bei der Forward Selection war die an erster Stelle ausgewählte Variable die Gesamtzellzahl, und als zweitwichtigster Prädiktor der Zigarettenzahl pro Tag wurde IL 6 identifiziert.
Umgekehrt wurden bei der Backward Elimination alle anderen Kovariablen bis auf die Gesamtzellzahl und IL 6 wegen einem im Vergleich zu diesen relativ geringen Beitrag zur Vorhersage der Rauchfrequenz von dem Algorithmus aus dem Modell entfernt.

Die nachfolgend gezeigten Graphiken zur Vorhersage der täglichen Zigarettendosis beschränken sich dementsprechend auf die Gesamtzellzahl und IL 6. Abbildung 23 zeigt die lineare Regression auf die Gesamtzellzahl allein, während in Abbildung 24 die gewichtete Summe aus der Zellzahl und dem IL-6-Wert (zuzüglich einer als Intercept bezeichneten Konstante) auf der X-Achse abgetragen ist. Als optimale Werte lieferte die Regressionsanalyse dabei folgende Zahlen:

Intercept:10.48261
Zellzahl [Mio/ml]:1.31
IL-6 [pg/ml]: 0.38557 .

Von besonderem Interesse ist dabei der Vergleich beider Regressionen hinsichtlich des Anteils R^2 der durch das Modell erklärten Varianz der Rauchfrequenz. Dieser erhöhte sich durch die zusätzliche Einbeziehung von IL 6 von rund 40 auf 60 Prozent, was die Bedeutung der Interleukinfraktion 6 als Prädiktor für die Rauchexposition unterstreicht. (Auf die Angabe der p-Werte, mittels derer in der Regressionsanalyse die Regressionskoeffizienten auf Abweichung von Null geprüft werden, wird hier verzichtet, da diese Testverfahren Normalverteilung der abhängigen Variablen voraussetzen.)

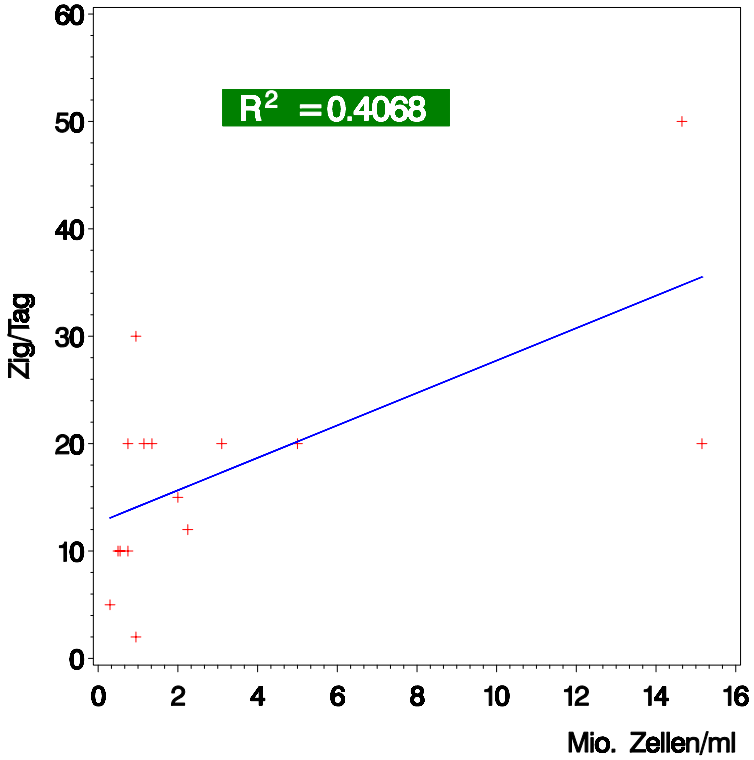

Abb. 23: Punktediagramm zur linearen Regression der täglichen Zigarettenfrequenz auf die Gesamtzellzahl im induzierten Sputum

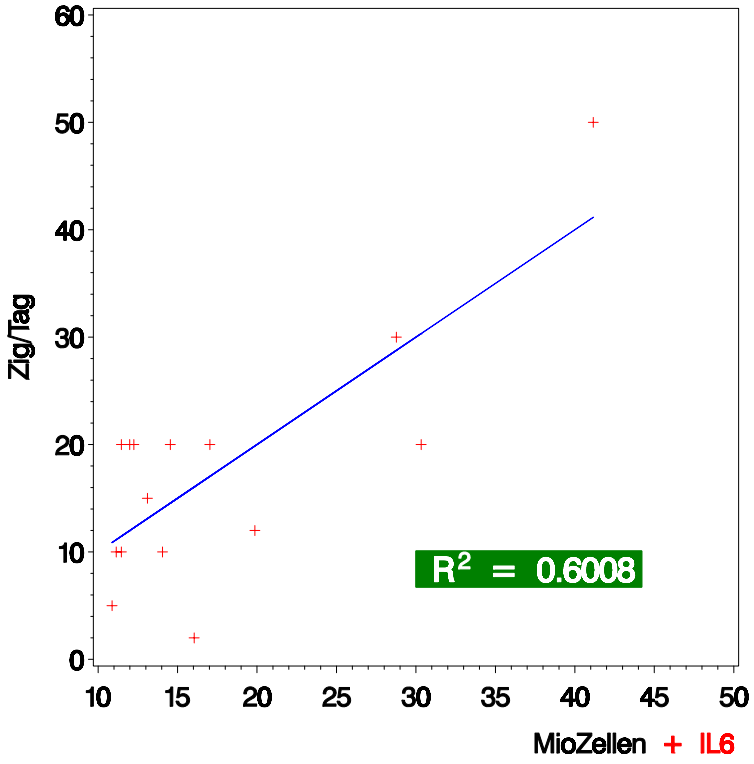

Abb. 24: Punktediagramm zur multiplen linearen Regression der täglichen Zigarettenfrequenz die Gesamtzellzahl und IL 6.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung induzierter Sputa von Rauchern und Nichtrauchern. Das zentrale Resultat der Studie zeigt, dass bereits bei gesunden Rauchern eine Entzündung der Atemwege abläuft. Dies äußert sich vor allem einer Hochregulation der beiden proinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-1ß und IL-6 wie auch des antimikrobiellen Peptids LL-37.

5.1 Zelldifferenzierung

Hinsichtlich der Zelldifferenzierung ergab sich in unserer Studie ein recht klares und gut interpretierbares Bild: Mit Hilfe der in §3.10.2 beschriebenen Verfahren konnte der Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern in der Verteilung des Makrophagenanteils statistisch gesichert werden. Bestätigt wurde insbesondere die zu erwartende Richtung der Abweichung, indem sich der Makrophagenanteil bei den Rauchern als signifikant verringert erwies. Selbst für den durchweg vergleichsweise geringen Anteil der Lymphozyten konnte in unserer Studie ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern nachgewiesen werden, wobei sich bei den Rauchern erhöhte Werte ergaben. Der umgekehrte Effekt beim Anteil der neutrophilen Granulozyten war, bezogen auf die bei den Makrophagen gefundene Relation, ebenfalls sehr deutlich. Im entsprechenden statistischen Test verfehlte jedoch der p-Wert knapp die Signifikanzschranke. Es kann vermutet werden, dass sich hierin lediglich die Tatsache widerspiegelt, dass trotz einer Verdoppelung der Fallzahlen gegenüber inhaltlich vergleichbaren Studien in der Literatur (s.u.) die Power auch in der vorliegenden Studie nur für sehr starke Effekte ausreichend hoch war. Ähnliches gilt für das Gesamtprotein, das bei Rauchern deutlich verringert zu sein scheint.

Die weitgehenden Resultate, die in der bisher vorhandenen Literatur zur Frage von charakteristischen Änderungen im Diffentialzellbild von Patienten mit Erkrankungen der Atemwege zu finden sind, entstammen einer Studie von Balzano et al. aus dem Jahre 1999. Diese schloss neben Gesunden mit und ohne

chronische Exposition an Zigarettenrauch sowie Asthmatikern vor allem Patienten mit stabiler COPD ein. Da es sich bei der COPD um eine chronische Entzündung der Lunge handelt, galt das Hauptinteresse dieser Autoren einer Bestätigung der Hypothese, dass das differentiale Zellbild in dieser Patientengruppe sich von demjenigen bei gesunden Vergleichsprobanden im Sinne einer Linksverschiebung unterscheidet. Die von Balzano und Mitautoren gewonnenen Daten konnten die Annahme einer solchen Verschiebung zwar nicht im strikten Sinne statistisch bestätigen, aber im deskriptiven Rahmen durchaus plausibel machen. Insbesondere zeigten sich deutliche, wenn, wie gesagt, auch nicht signifikante Unterschiede bezüglich des Prozentsatzes von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten. Letztere manifestierten sich in einem praktisch verdoppelten Anteil der neutrophilen Granulozyten bei COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern und Nichtrauchern. Der Anteil an Makrophagen verhielt sich in den Daten von Balzano et al. gegenläufig zum Anteil an neutrophilen Granulozyten: Er betrug bei COPD-Patienten im Mittel nur etwa 1/3 des für die gesunden Kontrollen eruierten Wertes. Zwischen gesunden Rauchern und Nichtrauchern konnten im Gegensatz hierzu in der gleichen Studie keine ausgeprägten Unterschiede hinsichtlich der Zelldifferenzierung ausgemacht werden

Auch bezüglich der Gesamtzellzahl im induzierten Sputum existieren bislang lediglich Daten, die COPD-Patienten mit gesunden Rauchern und/oder Nichtrauchern vergleichen, wobei kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtzellzahl zwischen den beschriebenen Gruppen gefunden werden konnte [Vernooy et al. 2002, Balzano et al. 1999].

Nachdem die in der bisherigen Literatur verfügbaren Studien sich mit relativ kleinen Stichprobenumfängen ($n \approx 10$ pro Gruppe) begnügt hatten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wesentlich größere Gruppen rekrutiert, um zumindest die ausgeprägteren der Effekte auch statistisch absichern zu können. Trotz erheblicher Anstrengungen bei der Probandenrekrutierung (die Ausgangszahl von Probanden, bei denen die Sputum-Induktion durchgeführt wurde, lag bei rund 100) konnte aufgrund methodisch-technischer Schwierigkeiten die effektive Gruppengröße gegenüber der Studie von Balzano et al. nur etwa verdoppelt werden. Wie die Ergebnisse hinsichtlich des Anteils an Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten gezeigt haben, hat aber bereits eine Stei-

gerung der Stichprobenumfänge in dieser Größenordnung zu einem erheblichen Zuwachs an statistisch abgesicherten Resultaten geführt.

Eine von der Fallzahl her vergleichsweise große Studie (n=96) über Gesamtzellzahlen, Vitalität und differentiale Verteilung auf die wichtigsten Zellarten im Sputum war bereits im Jahre 2000 von Belda et al. vorgelegt worden. Allerdings handelte es sich hierbei anstatt um eine vergleichende um eine einfache Normalwertstudie, die lediglich gesunde, nicht nikotinabhängige Probanden einschloss. Die Auswertung der Sputumproben ergab für dieses Probandenkollektiv für die verschiedenen Zellarten arithmetische Durchschnitts-werte, die mit den von uns in der Nichtraucher-Gruppe gefundenen Ergebnissen im wesentlichen vergleichbar sind. Eine ähnliche Studie zur Zellzahl und -verteilung im Sputum von gesunden Rauchern wurde bislang nicht vorgelegt.

5.2 Antimikrobielle Peptide kommen in den Zellen des induzierten Sputums vor.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen interessierte uns auch die Frage, ob es mittels immunhistochemischen Methoden gelingen würde, das intrazellulärere Auftreten von verschiedenen AMPs nachzuweisen. Da in der Literatur bisher nur sehr wenige Daten zum intrazellulären Vorkommen dieser Gruppe von Peptiden publiziert worden sind, wurde zu dieser Fragestellung hier eine Art „Feasibility-Studie“ durchgeführt. Die Ergebnisse waren in dem Sinne positiv, dass ein qualitativer Nachweis der Peptide möglich war. Für den Antikörper hBD-2 konnte in den meisten Fällen keine positive Reaktion verzeichnet werden. hBD-1 konnte sowohl in Makrophagen als auch in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte LL-37 hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten zur Darstellung gebracht werden; die für Makrophagen zu verzeichnende Reaktion erwies sich als wesentlich schwächer.

Obwohl es sich bei den hier vorgestellten Ergebnissen zur immunhistochemischen Darstellbarkeit antimikobieller Peptide im intrazellulären Bereich

lediglich um qualitative Daten handelt, erscheint die Aussage gerechtfertigt, dass diese Peptide intrazellulär gespeichert werden. Um deren quantitatives Ausmaß erfassen zu können, bedarf es weitergehender Untersuchungen mit verfeinerten Methoden auf der Basis einer standardisierten Zellzählung sowie einer FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting). Ein wesentliches Ziel für die Zukunft besteht in der Klärung der Frage, ob und in welchem Grade AMPs zu Entzündungsreaktionen beitragen.

5.3 Zellzahlen versus biochemische Parameter als Indikatoren für den Effekt des Zigaretterauchens

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Gewinnung von Daten, die über die Frage Aufschluss geben, welchen über die Zellzahlen und -anteile hinausgehenden Beitrag die Zytokine im induzierten Sputum biochemisch bestimmten Parameter der Zytokin- und AMP-Ausschüttung für die Differenzierung zwischen Nichtrauchern und klinisch (noch) gesunden Rauchern leisten. Der erste Schritt zur Beantwortung dieser Frage bestand in der vergleichenden Gegenüberstellung der Verteilungen dieser Parameter in beiden Probandengruppen.

Von denen zeigten im Rahmen dieser univariaten Vergleiche IL-1ß und IL 6 die deutlichsten Unterschiede. Für **IL-1ß** fand sich bei den Rauchern eine ausgeprägte, wenn auch statistisch nicht als signifikant nachweisbare Tendenz zu gegenüber Nichtrauchern erhöhten Werten. Der Anteil von Fällen, bei denen IL-1ß wegen Unterschreitung der Nachweisbarkeitsgrenze nicht mehr meßbar war, hatte in beiden Gruppen die gleiche Größenordnung (rund 10 Prozent).

Da bisher lediglich eine Studie existierte, in der das IL-1ß-Level von stabilen versus symptomatischen Asthmatikern verglichen wird, wobei bei letzteren ein deutliche erhöhtes IL-1ß-Niveau konstatiert wurde [Konno et al.,1996], kann zur Zeit über eine Erklärungsmöglichkeit für den leicht erhöhten IL-1ß-Spiegel lediglich spekuliert werden.
Pathophysiologisch geht man von folgendem Modell aus: Zigarettenrauch ist ein inhomogenes Gemisch aus verschiedenen Partikeln und Gasen [Hogg 2004]. Wird dieses Gemisch eingeatmet, so wird es in der humanen Lunge als Fremdkörper registriert, mit der Folge einer Aktivierung von Makrophagen, die

ihrerseits eine Reihe von unterschiedlichen inflammatorischen Zytokinen produzieren und sezernieren [Martin TR, 1997]. Am Anfang dieses als inflammatorische Kaskade bezeichneten, mehrstufigen Prozesses steht die Ausschüttung von IL-1ß und TNF-α. Aus diesem Grund werden diese Substanzen häufig auch „early response cytokines“ genannt. Sie aktivieren neben weiteren Makrophagen u.a. auch Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten, die daraufhin ihrerseits zusätzliche inflammatorische Zytokine produzieren und ausschütten. Dabei werden unter anderem auch sogenannte Chemokine freigesetzt, die zu einer Einwanderung von Leukozyten in das entzündete Areal führen und als Untergruppe der Zytokine betrachtet werden. Sowohl neutrophile Granulozyten als auch Makrophagen zeigen dann eine antiinflammatorische Wirkung im entzündeten Gebiet. Wie in einer kürzlich erschienenen Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine Überexpression mit IL-1ß in der Lunge einer erwachsenen Maus zur Entstehung einer COPD-ähnlichen Entzündung. [Lappalainen et al. 2005].

Auch wenn sich in unseren Daten keine eindeutige Änderung der **IL-8**-Werte bei Zigarettenrauchern abzeichnete, lässt die signifikante Steigerung des Anteils der neutrophilen Granulozyten klar darauf schließen, dass regelmäßiger Zigarettenkonsum über einen genügend langen Zeitraum hinweg als chronisch persistierender Prozess die gesamte inflammatorische Kaskade aktiviert. Im übrigen ist als mögliche Erklärung für die Abwesenheit von Unterschieden in der Verteilung der IL-8 Werte wiederum die eingeschränkte Power der von uns durchgeführten statistischen Tests in Betracht zu ziehen: Trotz der im Vergleich zu den von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten Daten etwa verdoppelten Probandenrekrutierung erreichten die Stichprobenumfänge auch in unserer Studie nicht die Größenordnung, wie sie z.B. in kontrollierten klinischen Therapiestudien üblich ist.

Die Bestimmung von **IL-6** im Überstand von induziertem Sputum gestaltete sich ähnlich wie bei IL-1ß recht schwierig. Tatsächlich konnte bei rund 85% aller Nichtraucher IL-6 nicht in messbaren Mengen nachgewiesen werden. Dennoch zeigten sich beim Vergleich der Verteilungen für IL-6 zwischen Rauchern und Nichtrauchern Unterschiede, die sich statistisch im Rahmen der in § 3.10.2 beschriebenen Vorgaben eindeutig absichern ließen. Denn der Anteil von Pro-

banden mit über der Meßbarkeitsgrenze liegendem IL-6-Wert vergrößerte sich bei den Rauchern von 15 auf über 40%, so dass das Vorliegen von messbaren Mengen von IL-6 unabhängig von der Höhe des Wertes im Rahmen unserer messmethodischen Bedingungen als ein relativ starker Hinweis auf Nikotinabhängigkeit zu bewerten ist. Dies untermauert noch einmal die Annahme, dass der dauerhafte Zigarettenkonsum einen chronischen Entzündungsprozess unterhält, der als Vorstadiums der COPD eingestuft werden kann, da das Zytokin IL-6 im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion vermehrt ausgeschüttet wird. In der Entzündungskaskade wird IL-6 etwa zum gleichen Zeitpunkt wie IL-8 ausgeschüttet. Es gilt als Akute-Phase-Protein und hat eine proinflammatorische Wirkung [Takizawa 1998]. Obwohl die Unterschiede hinsichtlich der Rate von IL-6-Werten im messbaren Bereich bereits mit den uns vorliegenden Stichprobenumfängen statistisch gesichert werden konnten, wäre die Durchführung einer Replikationsstudie mit nochmals vervielfachten Fallzahlen auch mit Hinblick auf diesen Befund unbedingt wünschenswert.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Bestimmung von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) im Überstand des induzierten Sputums. Hierfür wurde ein speziell in unserer Arbeitsgruppe entwickelter LL-37-ELISA sowie ein eigener Mucin-ELLA (**E**nzym **L**inked **L**ectin **A**ssay) verwendet.
LL-37, das im Rahmen dieser Arbeit erstmals für Untersuchungen im induzierten Sputum als Laborparameter eingesetzt worden ist, gehört zu der relativ großen Gruppe der sogenannten antimikrobiellen Petptide (=AMPs), von denen angenommen wird, dass sie eine nicht unerhebliche Rolle im Rahmen der angeborenen Immunität des Menschen spielen. Ihre genaue Rolle bei der Entzündungsreaktion ist bis heute noch nicht geklärt. Bei AMPs handelt es sich allgemein gesagt um körpereigene Abwehrstoffe, die auf mukösen Oberflächen exprimiert werden und antimikrobielle Eigenschaften an den Tag legen. Des weiteren wird von ihnen angenommen, dass sie in einer recht frühen Phase der Entzündungskaskade eine Rolle als Entzündungsmediatoren spielen und weiterhin unter anderem die Chemotaxis beeinflussen. Aufgrund dieser Eigenschaften liegt die Vermutung nahe, dass AMPs eine Rolle bei der Pathogenese der COPD spielen. Aus diesem Grund wollten wir Aufschluss darüber erhalten, in welchem Stadium der Krankheitsentstehung sich ein Wandel in der Ausschüttung dieses antimikrobiellen Peptides vollzieht.

Bei Rauchern haben wir insgesamt per ELISA etwa doppelt so hohe mediane LL-37-Werte gemessen wie bei Nichtrauchern. Dass der p-Wert im Test auf Unterschiede zwischen den zugehörigen Verteilungen die Signifikanzschwelle nicht erreichte, erklärt sich u.E. wiederum am plausibelsten durch die geringe Power des Tests, bedingt durch eine Gesamtfallzahl von rund 50. Auch für LL-37 halten wir es für sehr wahrscheinlich, dass sich die Differenz zwischen Rauchern und Nichtrauchern in einer Replikationsstudie mit entsprechend vergrößerten Stichprobenumfängen als signifikant nachweisen ließe. Pathophysiologisch ließe sich der Anstieg des LL-37- Levels unter chronischem Zigarettenkonsum dadurch erklären, dass von diesem AMP angenommen wird, dass es im Rahmen einer Entzündung eine Rolle als Mediator spielt. Daher liegt es nahe, dass es genau wie beispielsweise IL-1ß oder IL-6 bei einer chronischen Zigarettenraucheinwirkung hochreguliert wird. Da bisher aber die genaue Rolle von LL-37 im Rahmen eines chronischen Entzündungsprozesses nur unzureichend erforscht ist, bleiben diese Aussagen bis auf weiteres letztendlich spekulativ.

Als weitgehend evident kann hingegen die Tatsache betrachtet werden, dass langjährige Raucher genau wie COPD-Patienten häufig morgendlichen Auswurf produzieren. Dies ist in erster Linie durch eine rauchbedingten Störung der mukozilliären Clearence erklärbar. Durch ganz feine Rauchpartikel werden die Zilien in den kleineren und auch größeren Atemwegen behindert [Hogg 2004]. Es sammelt sich dort Schleim an, der durch einen Hustenreiz schlussendlich abgehustet werden kann. Dieser Schleim bietet, insbesondere bei COPD-Patienten, ein denkbar günstiges Milieu für Infektionen, die dann meist eine akute Exazerbation einer COPD auslösen [Rogers 2005].

Für uns stellte sich nun die Frage, inwieweit die oben beschriebene Störung der mukoziliären Clearance schon bei jüngeren gesunden Rauchern eine Rolle spielt. Hierzu wurde der Mucingehalt im Überstand von gesunden Rauchern und Nichtrauchern mittels Mucin-ELLAs bestimmt. Erwartungsgemäß zeigte sich für Raucher ein wesentlich erhöhter Medianwert, wobei der zugehörige statistische Test einen p-Wert ergab, der sogar das 1%-Niveau deutlich unterschritt. Dies untermauert in recht klarer Weise die Vermutung, dass Rauchen bereits in einem recht frühen Stadium einer „Raucherkarriere“ in gravierender

Weise in die Physiologie des pulmonalen Systems eingreift. Auch bietet dieser Befund eine plausible Erklärung für die schleichende Pathogenese einer irreversiblen Atemwegsobstruktion im Rahmen einer COPD.

Im **multivariaten** Teil der Datenanalyse wurde als erstes Kriterium für die Bewertung des Beitrags der biochemisch bestimmten Parameter zur Erfassung der genannten pathophysiologischen Veränderungen die Verbesserung der Genauigkeit herangezogen, mit der sich die Sputum-Proben bezüglich des Raucherstatus der Probanden klassifizieren lassen. Hierzu wurde die Trennung zwischen Rauchern und Nichtrauchern analog zu einem diagnostischen *Diskrimanzproblem* angegangen. Die Berechnung der Diskriminanzfunktion erfolgte zum einen unter Berücksichtigung aller im induzierten Sputum bestimmten Parameter, zum anderen nur auf der Basis der durch Zellzählung und -differenzierung ermittelten Werte (einschließlich Vitalität und Gesamtprotein). Da das Gesamtprotein ein Gemisch verschiedener Proteine darstellt, welches recht unspezifisch ist, wird es in dieser Arbeit nicht zu den biochemischen Parametern gezählt.
Unter Berücksichtigung aller Parameter (einschließlich der mittels biochemischer Verfahren ermittelten) ließen sich auf diese Weise insgesamt fast 90 Prozent der Proben korrekt klassifizieren. Bei Eliminierung der Interleukine, von LL-37 sowie dem Mucinwert aus der Diskriminanzfunktion sank die diagnostische Trefferquote auf 76% Prozent ab, wobei dieser Unterschied direkt als Maß für den Beitrag der biochemisch ermittelten Parameter zur Differenzierung zwischen Rauchern und Nichtrauchern interpretiert werden kann: Im negativen Fall würde die Trefferquote bei Hinzunahme der biochemisch bestimmten Parameter in die Diskriminanzfunktion unverändert bleiben.
Für eine realistische Bewertung der unter Berücksichtigung aller im induzierten Sputum gemessenen Parameter erreichbaren Klassifikationsgenauigkeit ist allerdings zu beachten, dass die Anwendung der ermittelten Diskriminanzregel auf die gleiche Stichprobe ("Lernstichprobe"), anhand derer die Gewichte für die einzelnen Komponenten bestimmt wurden, tendenziell zu einem Bias in die optimistische Richtung führt. Um diese Verzerrung zu reduzieren, wäre die Durchführung einer sogenannten Kreuzvalidierung erforderlich, für die aber die verfügbare Stichprobe in ein Lern- und ein Validierungssample aufgeteilt werden muss, was wiederum eine andere Größenordnung der Fallzahlen voraussetzt.

Als zweites Kriterium für die Bewertung der verschiedenen Parameter hinsichtlich ihrer Bedeutung als Indikatoren für durch das Zigarettenrauchen induzierte pathophysiologische Veränderungen wurde im Rahmen der multivariaten Analysen der Anteil der *erklärten Varianz der Rauchfrequenz* herangezogen. Dabei zeigte sich, dass bereits zwei der insgesamt 11 von uns in den Sputumproben bestimmten Parametern dazu ausreichen, über 60% der Varianz der Anzahl der von den Rauchern pro Tag konsumierten Zigaretten zu erklären. Nächst der Gesamtzellzahl leistete dabei IL-6 den stärksten Beitrag zur Varianzaufklärung, was als weiterer Hinweis auf die Relevanz dieser Interleukinfraktion im vorliegenden Zusammenhang gelten kann. Hinsichtlich der Einschätzung der Genauigkeit , mit der die tägliche Rauchfrequenz mittels einer optimal gewichteten Summe aus Gesamtzellzahl und IL-6 Wert vorgesagt werden kann, stellt sich ein analoges Problem wie bei der Beurteilung der Trefferquote der Diskriminanzfunktion für die Unterscheidung zwischen den Rauchern als Gesamtgruppe und den Nichtrauchern: Die angegebenen Korrelationskoeffizienten bzw. Varianzanteile beziehen sich auf dieselbe Stichprobe, anhand derer auch die Koeffizienten für die Gewichtung der als Prädiktoren verwendeten Parameter berechnet wurden. Bei der Überprüfung der Formel in einer neuen Stichprobe zigarettenrauchender Probanden würde sich der Anteil der durch die gefundene Kombination aus Gesamtzellzahl und IL-6 erklärbaren Varianz der Erwartung nach mehr oder minder deutlich verringern.

6. Zusammenfassung

Die COPD gilt bezüglich Klinik und Epidemiologie als die bedeutendste und gravierendste Langzeitkomplikation eines langjährigen Nikotinabusus. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Entzündung bereits bei jungen, klinisch noch gesunden Rauchern zu finden ist. Hierzu wurden Nichtraucher als gesunde Kontrollen rekrutiert und mit einer Stichprobe von gesunden Rauchern bezüglich des Diffentialzellbildes, mehrerer Zytokine sowie des antimikrobiellen Peptids LL-37 verglichen. Alle diese Parameter wurden im induzierten Sputum der Probanden bestimmt.

Im klinisch-experimentellen Teil bestand das methodische Vorgehen in der Entwicklung eines detaillierten Protokolls für die Sputuminduktion, die anschließende Aufarbeitung der Sputumproben sowie der Bestimmung der interessierenden zellulären und immunhistochemischen Parameter. Die differentiale Zellzählung erfolgte auf der Basis von mindestens 400 Nicht-Epithelzellen in nach May-Grün-Giemsa gefärbten Präparaten. Der intrazelluläre Gehalt an den antimikrobiellen Peptiden hBD-1, hBD-2 und LL-37 wurde im Überstand des Sputums mittels immunhistochemischer Darstellung bestimmt. Ebenfalls im Sputumüberstand wurde der Gesamtproteingehalt mittels eines BCA Protein-Assay gemessen. Zur Bestimmung der Zytokine IL-1ß, IL-6 und IL-8 wurden geeignete ELISA-Techniken eingesetzt. Das antimikrobielle Peptid LL-37 wurde mit Hilfe eines in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten speziellen ELISAs bestimmt. Für die Ermittlung des Mucingehalt im Sputumüberstand wurde ein neu etablierter Mucin-ELLA (=Enzym Linked Lectin Assay) verwendet.

Der Prozess der Probandenrekrutierung führte zum Einschluss von insgesamt ca. 100 freiwilligen, gesunden, rauchenden bzw. nichtrauchenden Versuchspersonen. Obwohl der Anteil von Probanden, die im Sinne der im Protokoll festgelegten Einschlusskriterien auswertbare Sputumproben lieferten, nur rund 50% betrug, lagen die effektiven Fallzahlen in beiden Vergleichsgruppen (Raucher: n=17; Nichtraucher: n=30) erheblich über den in den bisherigen Studien zum induzierten Sputum bei COPD-Patienten verfügbaren Stichprobenumfängen.
Folgende **Hauptergebnisse** konnten im Rahmen dieser Arbeit erhoben werden:

- Der Makrophagen-Anteil war bei Nichtrauchern signifikant gegenüber Rauchern erhöht.
- Falls IL-6 überhaupt im Sputum nachweisbar ist, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich bei diesem Probanden um einen Raucher handelt.
- Für IL-8 ergaben sich im Vergleich der beiden Probandengruppen keine signifikanten Unterschiede.
- Weiterhin zeichnete sich eine deutliche Tendenz zu erhöhten LL-37-Werten bei Rauchern ab. Diese Ergebnisse waren zwar nicht signifikant; es kann aber davon ausgegangen werden, dass dies durch Beschränkungen der Fallzahl und damit der Power des durchgeführten Signifikanztests bedingt war.
- Biochemische Parameter leisten zur korrekten Klassifikation eines Probanden als Raucher oder Nichtraucher einen relevanten Beitrag: Unter Verwendung dieser Parameter war eine korrekte Zuordnung bei rund 90% der Probanden möglich; bei Nichtberücksichtigung der biochemischen Parameter reduzierte sich die Rate korrekter Zuordnungen auf 76%.
- IL-6 leistet einen wesentlichen Beitrag zur Prädiktion der Rauchexposition. In einem multivariaten linearen Regressionsmodell konnte gezeigt werden, dass das Einbeziehen von IL-6 den Anteil der erklärten Varianz der Rauchfrequenz von rund 40% auf 60% erhöht.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sich die Zellzusammensetzung des Sputums bereits zu Beginn einer „Raucherkarriere“ im Sinne einer Entzündung verändert. Die Hypothese einer chronischen Entzündung konnte untermauert werden durch den Nachweis einer Hochregulation von IL-1ß und IL-6 bei Rauchern: beide Zytokine besitzen eine proinflammatorische Wirkung und besitzen somit die Fähigkeit zur Unterhaltung eines chronischen Entzündungsprozesses.

7. Anhang

Tabellarische Übersicht über das Probandenkollektiv

Lfd. Nr.	Geschl	Alter	Raucher-status	Rauchbeginn	Anzahl Zig/d	Allergien	Voerkrankungen
1	w	27	NR			keine	Keine
7	m	34	NR			keine	Keine
11	w	25	NR			keine	Belastungsasthma seit 5 Jahren
15	w	41	NR			keine	Keine
16	w	47	NR			Ratte, Maus	Keine
17	w	36	NR			keine	Keine
22	m	24	NR			keine	Keine
27	w	26	NR			keine	Keine
29	w	25	NR			keine	Keine
31	m	29	NR			keine	Keine
41	w	24	NR			keine	Keine
42	w	27	NR			Hase, Katze, Meer-schweinchen	geringes Asthma bronchiale (allergisch)
43	w	39	NR			keine	Keine
47	m	27	NR			Gräser (gering)	Keine
48	m	36	NR			keine	Keine
54	w	24	NR			Pollen, Bäume, Katze	Keine
80	w	24	NR			keine	Keine
60	w	32	NR			keine	geringfügiger grippaler Infekt
63	m	21	NR			keine	Keine
66	w	60	NR			Lösungsmittel	Keine
67	m	34	NR			Obstschalen	Keine
69	m	40	NR			keine	wenig erkältet
71	w	30	NR			Gräser, Pollen, Bäume, Getreide	Keine
72	m	45	NR			keine	Keine
75	m	28	NR			Hausstaub, Pferde, Katzen, Penicillin	Keine
80	w	24	NR			keine	Keine
18	w	23	Ex	1994-1998	2	keine	chron. Rhinitis
35	m	27	Ex	1991-1993	20	Biene	Keine
58	w	23	Ex	1996-2000	20	keine	Keine
64	m	25	Ex	1997-2000	20	Citrusfrüchte (ge-ring)	früher häufig Bronchitiden
68	m	31	Ex	1989-1996	20	geringe Rhinitis allergica	wenig Schnupfen
13	w	44	R	1975	5	Penicillin, Nickel, Katze	Struma
20	m	27	R	1995	20	keine	Keine
21	m	27	R	1988	20	keine	Keine
25	m	41	R	1981	20	keine	Keine
36	m	21	R	2001	20	Gräser, Katze, Hund	geringes Asthma bronchiale (allergisch)
38	w	41	R	1983	10	keine	Keine
62	m	23	R	1996	20	keine	Keine
65	w	21	R	1999	5	keine	Keine
73	m	30	R	1991	20	keine	Keine
74	m	28	R	1998	2	Medikamente	Keine
82	m	46	R	1983	20	keine	ganz geringer Rest Schnupfen
83	w	25	R	1993	2	keine	Keine
84	w	43	R	1990		keine	früher chron. Sinusitis
85	w	28	R	1996	30	Rhinitis allergica, Hausstaub	Keine
86	m	26	R	1993	0	keine	Keine
88	w	24	R	2000	0	keine	Keine
89	m	22	R	1995	5 0	keine	Keine

Literaturverzeichnis

Arruda L.K. et al.: Risk factors for asthma and atopy.
Curr. Opin Allergy Clin. Immunol. 2005 April, 5(2): 153-9.

Baggiolini M.: Human chemokines: an update.
Annu Rev Immunol. 1997;15:675-705.

Bals R. et al.: Human ß-defensin is a salt sensitive antibiotic expressed in human lung.
J Clin. Invest. 1998; 102: 874-880.

Bals R. et al.: The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 9541-9546.

Bals R. et al.: Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide.
Infect Immun. 1999 Nov;67(11):6084-9.

Bals R.: Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection.
Respir Res. 2000;1(3):141-50. Epub 2000 Oct 20.

Balzano, G.: Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function.
Am J Respir Crit Care Med. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1486-92.

Barnes P.J., Kleinert S.: COPD- a neglected disease.
Lancet. 2004 Aug 14-20; 364(9434): 564-5.

Beisswenger C. et al.: Antimicrobial peptides in lung inflammation.
Chem Immunol Allergy. 2005;86:55-71.

Belda J. et al.: Induced sputum cell counts in healthy adults.
Am J Respir Crit Care Med. 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.

Belda J. et al. : Sputum induction: effect of nebulizer output and inhalation time on cell counts and fluid-phase measures.
Clin Exp Allergy. 2001 Nov;31(11):1740-4.

Brabandt, H. van et al. : Partitioning of pulmonary impedance in excised human and canine lungs.
J Appl Physiol. 1983 Dec;55(6):1733-42.

Brightling, C.E. et al.: Comparison of airway immunopathology of eosinophilic
Thorax. 2003 Jun;58(6):528-32.

Caramori, G. et al.: Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease.
Histopathology. 2004 Nov;45(5):477-84.

Ezzati M., Lopez A. D.: Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000.
Tob Control. 2004 Dec;13(4):388-95.

Ganz T. et al.: Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils.
J Clin Invest. 1985; 76 (4): 1427-35.

Geiser T.: Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease.
Schweiz Med Wochenschr. 1999 Apr 10;129(14):540-6.

Goldman M. J. et al.: Human ß-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is Inactivated in cystic fibrosis.
Cell. 1997; 88: 553-560.

Gudmundsson G.H. et al.: The human gene FALL39 and processing of the cathelicidin precursor to the antibacterial LL-37 in granulocytes.
Eur J Biochem. 1996, 238: 325-332.

Hill A. T. et al.: The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis.
Am J Respir Crit Care Med. 1999: 893-98.

Hiratsuka T. et al. : Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia.
Biochem Biophys Res Commun. 1998 Aug 28;249(3):943-7.

Hogg J.: Peripheral lung remodelling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.
Eur Respir J. 2004 Dec;24(6):893-4.

Jayaram et al. : Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice.
Eur Respir J. 2000 Nov;16(5):1029.

Koczulla A.R., Bals R. : Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential.
Drugs. 2003;63(4):389-406.

Konno S. et al.: Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients.
Int Arch Allergy Immunol. 1996 Jan;109(1):73-8.

Lappalainen et al.: Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 Apr;32(4):311-8.

Lemière, C. et al. : Differential cell counts in sputum in respiratory epidemiology: a pilot study.
Chest. 2001 Oct;120(4):1107-13.

Magnussen H., Holz O.: Monitoring airway inflammation in asthma by induced sputum.
Eur Respir J. 1999 Jan;13(1):5-7.

Magnussen H. et al.: Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations.
Eur Respir J. 2000 Dec;16(6):1175-9.

Martin TR : Overview of cytokine networks in lung injury.
In: Pratter MR, Nelson S, editors. Cytokines and pulmonary infection. New York *American Thoracic Society*; 1997 p. 19-28.

Navarro P.C., Padilla R.P.: Chronic Obstructive Pulmonary Disease: an ambiguous name and an obstacle in the campaign against smoking.
Arch Bronconeumol. 2004; 40 (11): 477-79.

Ogushi K. et al.: Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells.
J Biol Chem. 2001 Aug 10;276(32):30521-6. Epub 2001 May 31.

Paggiaro P.L.: Sputum Induction.
Eur Respir J Suppl. 2002 Sep;37:3s-8s.

Panyutich A.V.: Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis.
J Lab Clin Med. 1993 Aug;122(2):202-7.

Panyutich A.V.: Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1995 Mar;12(3):351-7.

Pauwels, R.A. et al.: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.
Am J Respir Crit Care Med. 2001 Apr;163(5):1256-76.

Pistelli, R.: Determinants of prognosis of COPD in the elderly: mucus hypersecretion, infections, cardiovascular comorbidity.
Eur Respir J Suppl. 2003 May;40:10s-14s.

Rogers, D.F. et al.: Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options.
Pulm Pharmacol Ther. 2005;18(1):1-8.

Ronchi M.C. et al.: Sputum processing: a new method to improve cytospin Quality.
Clin Exp Allergy. 2002 May;32(5):674-80.

Schäfer, H.: Vorlesungsskript zur Vorleseung “Medizinische Statistik und Dokumentation für Humanmediziner, 2001.

Siafakas N.M. et al. : Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force.
Eur Respir J. 1995 Aug;8(8):1398-420.

Singh P. et al.: Production of ß-defensins by human airway epithelia.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95: 14961-14966.

Snider G.L.: Distinguishing among asthma, chronic bronchitis and emphysema.
Chest. 1985 Jan;87(1 Suppl):35S-39S.

Soong L.B. et al.: Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum.
Inflamm Res. 1997 Mar;46(3):98-102.

Takizawa H.: Cytokines/chemokines and adhesion molecules in local inflammatory responses of the lung.
Drug News Perspect. 1998 Dec;11(10):611-9.

Tanino M. et al.: Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema.
Thorax. 2002 May;57(5):405-11.

Tossi A. et al.: Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides.
Biopolymers. 2000;55(1):4-30.

Vineis P. et al.: Environmental tabacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study.
BMJ 2005: 277.

Vonk-Noordegraaf A. et al.: Noninvasive assessment and monitoring of the pulmonary circulation.
Eur Respir J. 2005 Apr;25(4):758-66.

Vernooy J. H. et al. : Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum.
Am J Respir Crit Care Med. 2002: 1218-24.

Wah J., Wellek A. et al.: Antimicrobial Peptides in immune and host defense cells.
CTR. 2006: 324(3):449-56.

Walz A. et al.: Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8.
J Exp Med. 1991 Dec 1;174(6):1355-62.

Wetering S. van et al.: Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells.
Am J Physiol. 1997 May;272(5 Pt 1):L888-96.

Yamamoto C. et al.: Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8.
Chest. 1997 Aug;112(2):505-10.

Lebenslauf

Name:	Wellek
Vorname:	Anne Sabine
Geburtsdatum und –ort:	12.07.1978, Mainz
Religion:	evangelisch
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1985-89	Martinus-Grundschule, Mainz
1989-1998	Gutenberg-Gymnasium, Mainz
1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

04/99-04/00	Studium der Zahnmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
03/2000	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2000-2005	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg
2001	Physikum
2002	1. Staatsexamen Humanmedizin
2004	2. Staatsexamen Humanmedizin
Herbst 2005	3. Staatsexamen Humanmedizin

Praktika/ Famulaturen

08/09 1999	Pflegepraktikum im kinderneurologischen Zentrum, Mainz
02/03 2002	Famulatur in der neurologischen Universitätsklinik in Mainz

03 2003	Famulatur in der kardiologischen Praxis Dr. Müller, Hanau
08 2003	Famulatur in der Universitätsklinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie, in Marburg
09 2003	Famulatur in der hausärztlich internistischen Praxis Dr. Bausch, Marburg

Praktisches Jahr

10 2004- 02 2005	Klinik für Neurologie, Universität Marburg
02 2005- 05 2005	Medizinische Klinik, Rote-Kreuz-Krankenhaus, Kassel
05 2005- 09 2005	Chirurgische Klinik, Rote-Kreuz-Krankenhaus, Kassel

Berufstätigkeit

ab 12/2005	Assistenzärztin an der Universitätsklinik für Neurologie, Marburg, AG Neuroimmunologie, Prof. Dr. N. Sommer

Akademische Lehrer

Meine Akademischen Lehrer an den **Universitäten Mainz und Marburg (einschließlich RKH-Kassel)** waren die Damen und Herren Professoren/Hochschuldozenten:

Arnold, Aumüller, Bals, Basler, Baum, Behr, Berger, Bertalanffy Bien, Engenhart-Cabillic, Gemsa, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Fauth, Hamer, Happle, Hasilik, Heeg, Hesterberg, Höffken, Hofmann, Jones, Kann, Klenk, Klose, Knoll, Kretschmer,Krieg, Oertel, Kuhn, Lange, Löser, Lohoff, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Müller, Neubauer, Remschmidt, Rosenow, Rothmund, Schäfer H., Schäfer, M., Schepelmann, Schmidt, Seyberth, Schönhense, Schüffel, Schwarz, Sommer, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wulf

Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals, gilt mein aufrichtiger Dank dafür, dass er mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung stellte und mir während der gesamten Zeit meiner Zugehörigkeit zu seiner Arbeitsgruppe mit vielfältigen Anregungen zur Seite stand. Nicht zuletzt hat er mir in der Schlussphase trotz der großen Zahl der von ihm zu verantwortenden Forschungsprojekte durch die kritische Durchsicht meiner Textentwürfe auch an Wochenenden und während der Urlaubszeit ein zügiges Vorankommen ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. med. C. Vogelmeier danke ich für die Schaffung der Rahmenbedingungen innerhalb seiner Klinik, die mir die Durchführung der experimentellen Untersuchungen ermöglichten.

Der AG Bals danke ich für die nette Aufnahme sowie die große Bereitschaft, mir als Versuchspersonen in der Testphase des experimentellen Protokolls für meine Studie zur Verfügung zu stehen.

Allen Probandinnen und Probanden danke ich für die Teilnahme an meinen Versuchen und die beispielhafte Geduld während der fast einstündigen Prozedur der Sputuminduktion.

Zu großem Dank bin ich auch Frau Annette Püchner und Herrn Thomas Damm verpflichtet, die mich geduldig in diverse Laborarbeitstechniken einarbeiteten und mir bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit beistanden.

Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. med. N. Sommer, geschäftsführender Oberarzt der Neurologischen Universitätsklinik Marburg für die Erlaubnis, einen Teil der Experimente während meines ersten PJ-Tertials in seinen Laborräumlichkeiten durchführen zu dürfen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. Anelia Todorova-Rudolph bedanken, die mich während der gleichen Phase in jeder Hinsicht unterstützte, insbesondere bei der Aufklärung meiner Probanden.

Zu Dank verpflichtet bin ich fernerhin Herrn Prof. Dr. rer. nat. S. Wellek , Leiter der Abteilung Biostatistik am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim/Universität Heidelberg, für die Beratung bei der statistischen Datenanalyse.

Frau Monika Duven möchte ich ganz herzlich danken für das Korrekturlesen aus germanistischer Sicht.

Frau Sabine Lnenicka danke ich für die tatkräftige Unterstützung in der Schlussphase der Arbeit.

Meinen Freunden danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung während der oft nervenaufreibenden Phase des klinisch-experimentellen Arbeitens, insbesondere bei der Rekrutierung von geeigneten Probanden.

Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielles Peptid
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCA	bicinchoninic acid
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
DTT	dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELLA	Enzyme Linked Lectin Assay
FEV	Forciertes expiratorisches Volumen
IL	Interleukin
IS	induziertes Sputum
NaCl	Natriumchlorid = Kochsalz
PBS	Phosphatpuffer
PBST	Phosphatpuffer mit Tween
VC	Vitalkapazität

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Antimikrobielle Peptide in induziertem Sputum“

im Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie, der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Vogelmeier mit der Unterstützung durch Herrn PD Dr. Dr. R. Bals ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile dieser Arbeit sind enthalten in folgender Publikation:
Wah J., **Wellek A.**, Frankenberger M., Unterberger P., Welsch U. and Bals R. (2006) Antimicrobial Peptides are expressed in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research;* 2006:449-56.

Marburg, im April 2006

Anne Wellek