

Aus der Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. VIRCHOW

**Prüferinitiierte placebokontrollierte randomisierte Pilotstudie
zum Einfluss von Fluticasone und Salmeterol auf myeloide
Dendritische Zellen (mDCs) von Rauchern mit COPD
im spirometrischen Stadium 0 oder 1 nach GOLD**

Eine klinisch-experimentelle Studie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



vorgelegt von

Laura Lux, geb. Tröbs

geb. am 08.06.1986 in Cottbus

Rostock, im Juni 2018

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002677

Dekan: Herr Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

Gutachter: 1. Gutachter:

Univ. Prof. Dr. Marco Idzko

Fachabteilung Pulmologie und Somnologie, Medizinische

Universität Wien

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz

Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universitätsmedizin

Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. Marek Lommatzsch

Abteilung für Pneumologie, Universitätsmedizin Rostock

Datum der Einreichung: 04. Juni 2018

Datum der Verteidigung: 10. März 2020

**Meiner Familie
gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das Immunsystem	5
1.2	Abwehrsystem der Lunge	6
1.3	Dendritische Zellen in der Lunge.....	8
1.4	Zigarettenrauch-assoziierte Erkrankungen	10
1.5	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	13
1.5.1	Definition und Epidemiologie	13
1.5.2	Pathophysiologie	15
1.6	Myeloide dendritische Zellen	18
1.6.1	mDCs bei Rauchen und Patienten mit COPD.....	21
1.7	Fazit und Fragestellung	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Probanden.....	24
2.2	Ablauf der Studie	28
2.3	Studienmedikation	29
2.3.1	Fluticason (F, Flutide ® 250 µg Diskus®).....	31
2.3.2	Fluticason+Salmeterol (F+S, Viani ® 50 µg / 250 µg Diskus®)	32
2.3.3	Placebo (P)	32
2.4	Randomisierung, Verblindung und Entblindung	32
2.5	Bodyplethysmographie	33
2.5.1	Material	33
2.5.2	Methode	34
2.5.3	Durchführung.....	35
2.6	Körperliche Untersuchung.....	38
2.7	Anlage eines peripheren Venenzuganges mit Blutentnahme	39

2.7.1	Material	39
2.7.2	Methode und Durchführung.....	39
2.7.3	Bluwertmessungen	40
2.8	Pulsoxymetrie.....	41
2.9	Flexible Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL)	41
2.9.1	Material	41
2.9.2	Methode und Durchführung.....	42
2.10	Aufbereitung der BALF inklusive Zellzählung.....	43
2.10.1	Material.....	43
2.10.2	Methode und Durchführung.....	44
2.11	Durchflusszytometrie (FACS Analyse)	46
2.11.1	Material.....	46
2.11.2	Methode	46
2.11.3	Durchführung.....	48
2.11.4	Analyse der Zellen	50
2.12	Statistische Auswertung.....	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Charakterisierung der Studienpopulation	53
3.2	Charakterisierung der Lungenfunktion.....	57
3.3	Differenzierung der BALF.....	58
3.4	Blut-Parameter	62
3.5	Anzahl der mDCs in der BALF und im Blut	66
3.6	Oberflächenmarker der myeloiden DCs	70
4	Diskussion.....	72
4.1	Methodische Stärken und Schwächen	73
4.2	Einfluss ICS und LABA auf die Zellpopulationen der Leukozyten in der BALF und im Blut	74
4.3	Einfluss ICS und LABA auf die mDCs in den Atemwegen	76
4.4	Rolle der Kombinationstherapie ICS und LABA bei COPD	78

4.5	Schlussfolgerung	82
5	<i>Zusammenfassung</i>	84
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	86
7	<i>Anhang</i>	95
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	95
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	98
7.3	Tabellenverzeichnis.....	99
7.4	Prüfplan der Studie	99
7.5	Patienteninformationen und Einwilligungen	99
7.6	Untersuchungsunterlagen	100
7.7	Weitere Daten	100
7.8	Curriculum Vitae	101
7.9	Publikation	102
7.10	Danksagung	103
7.11	Thesen zur Dissertationsschrift.....	105
7.12	Eidesstattliche Erklärung	107

1 Einleitung

Durch die Erkenntnis, dass das Zusammenspiel zwischen Krankheitserreger, dem Immunsystem des Wirtes und Arzneimittel die Grundlage für eine erfolgreiche Behandlung ist, gewinnt die Erforschung immuntherapeutischer Ansätze immer mehr an Bedeutung. Ein deutliches Zeichen dafür ist die Auszeichnung von Bruce Beutler, Jules Hoffmann und Ralph Steinman mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin im Jahr 2011 für ihre Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Immunologie.

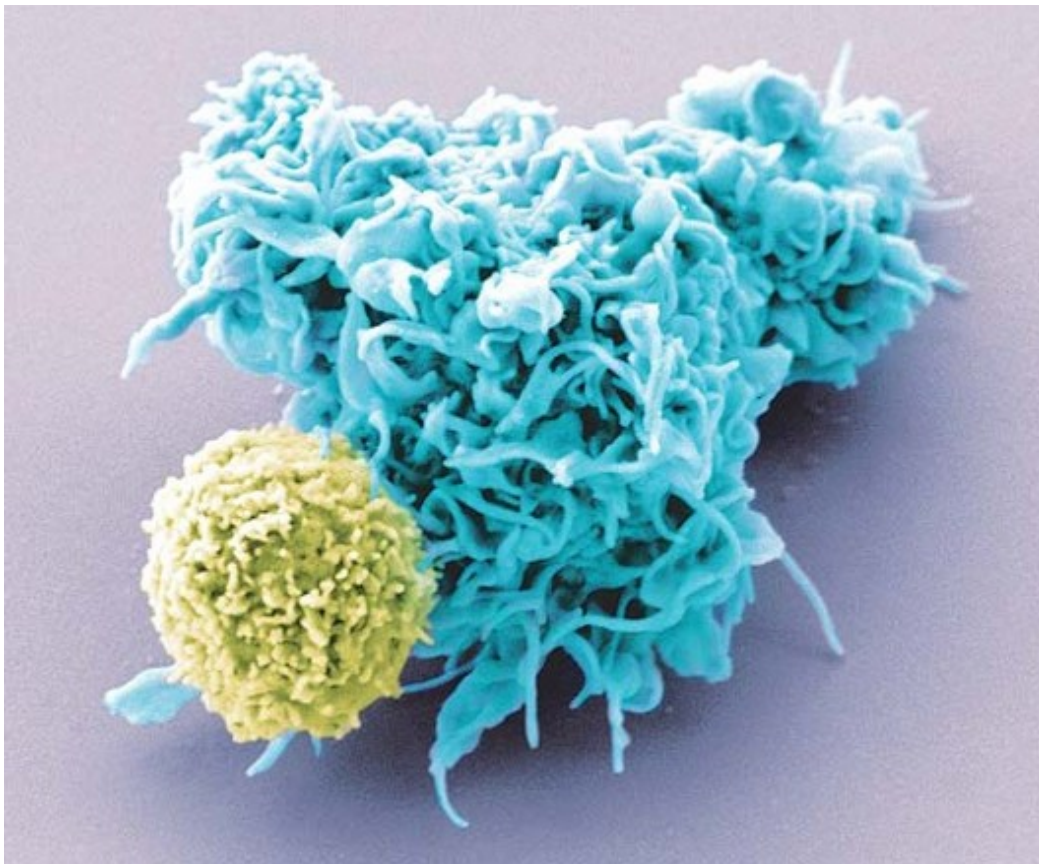


Abbildung 1: Antigenpräsentation durch eine myeloide dendritische Zelle.

Eine dendritische Zelle umfasst mit ihren Verästelungen einen Lymphozyten. So wird die humorale Immunabwehr durch das angeborene Immunsystem aktiviert. Die Grafik ist entnommen aus ¹.

Steinman hatte Anfang der 70er Jahre die dendritischen Zellen in den peripheren lymphatischen Organen der Maus unter dem Mikroskop entdeckt und in den Jahren danach ihre Bedeutung als Vermittler zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität erkannt [**siehe Abbildung 1**]. Steinmans Entdeckung war bahnbrechend und ist zum Zeitpunkt ihrer Veröffentlichung 1973 auf große Skepsis innerhalb der Fachwelt gestoßen. Denn bis dahin hielt man nur drei Zelltypen für immunologisch relevant: T-, B-Lymphozyten und Makrophagen. Inzwischen weiß man, dass dendritische Zellen, und unter ihnen vor allem die myeloiden aus dem Knochenmark, die zentralen Schaltstellen für die effektive Immunantwort sind. Anders als bei Lymphozyten ist das Rezeptorrepertoire der dendritischen Zellen wie das der anderen Zellen des natürlichen Immunsystems genetisch in der Keimbahn determiniert. Die Aktivität dendritischer Zellen umfasst die Phagozytose pathogener Keime, Antigenpräsentation und Kostimulation von Lymphozyten. Dabei sind sie circa tausendmal effektiver in der Immunstimulation als Makrophagen. In zahlreichen Studien analysierten Steinman und seine Mitarbeiter das System der dendritischen Zellen und lieferten damit die Grundlage für weitere Forschungen, u.a. auch der Immunzelltherapie ¹.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes System, das dem Schutz des Körpers vor Infektionen, Toxinen, Stoffwechselprodukten und abnormalen Körperzellen dient. Es werden ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem unterschieden, die beide durch vielfältige Effektormechanismen miteinander verbunden sind [**siehe Abbildung 2**]. Die erste, frühe Phase der Verteidigung stellt dabei die angeborene Immunität mit deren unspezifischen zellulären und nichtzellulären Effektormechanismen dar. Ist diese Stufe überwunden, wird die erworbene, adaptive Immunantwort ausgelöst. Diese agiert antigenspezifisch und nachhaltig gegen Krankheitserreger.

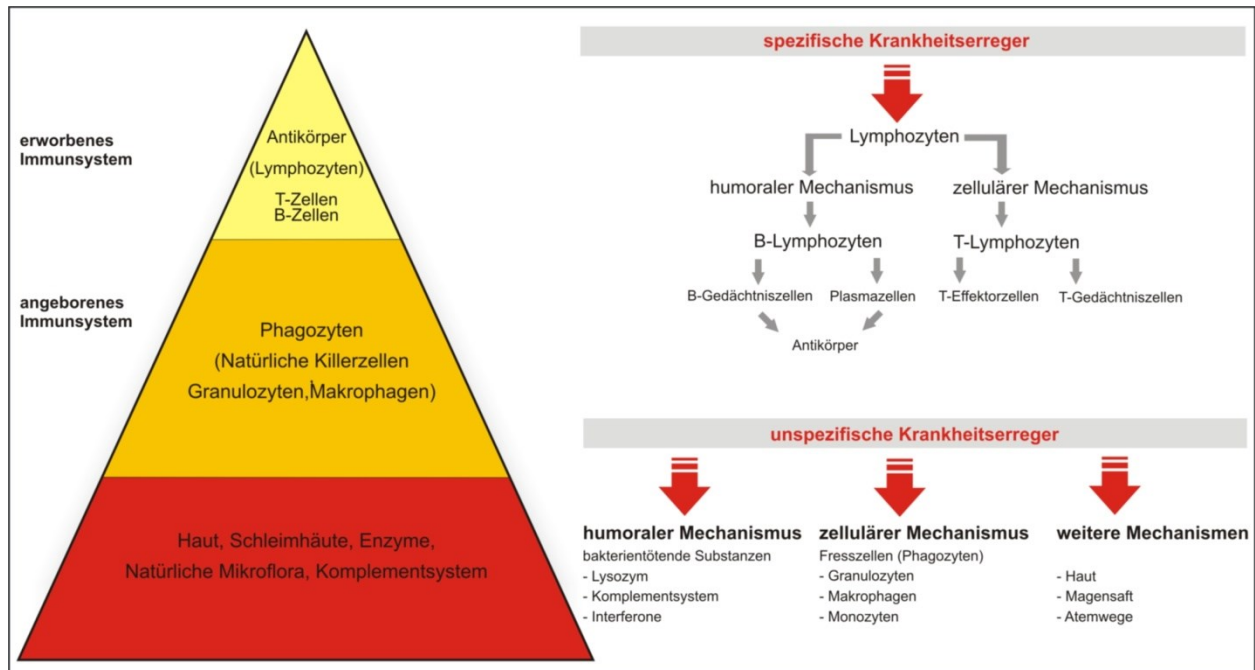


Abbildung 2: Das Immunsystem.

1.2 Abwehrsystem der Lunge

Das Abwehrsystem der Lunge ist eine komplexe Anordnung von strukturellen und funktionellen Abwehrmechanismen in den proximalen und distalen Atemwegen. Dieses System schützt in erster Linie durch eine mechanische Barriere vor den teils gefährlichen Molekülen und Antigenen aus der umgebenden Luft, mit denen die Schleimhautoberfläche der Lunge täglich in Kontakt kommt. Der Verbund von Epithelzellen mit Schlussleisten, kanalbildenden Proteinkomplexen und Desmosomen bildet eine Schleimhautbarriere und trägt ebenfalls zur mukoziliären Klärfunktion bei ². Ein kontinuierlich aufgelagerter Surfactant-Film wirkt aufgrund seiner Zusammensetzung aus Phospholipiden und verschiedenen Proteinen oberflächenaktiv und führt dadurch zu einer Benetzung eingeatmeter Partikel und deren Dislokation in die Tiefe des Films. Toxische und Allergie-auslösende Partikel können so mit den Epithelzellen interagieren, was für die Pathophysiologie der Atemwegserkrankungen eine wesentliche Rolle spielt, oder mittels des mukoziliären Transports rachenwärts befördert werden ³. Die Translokation von Partikeln in subepitheliale

Bindegewebsschichten und deren anschließende Phagozytose durch interstitielle Makrophagen verlängert deren Retention in der Lunge im Vergleich zu jenen kleineren Partikeln, welche bereits von den primären Fresszellen der Lunge, den Atemwegs- und Alveolarmakrophagen, aufgenommen werden ⁴. Komplementiert wird das Abwehrsystem durch ein transepithelial interagierendes Netzwerk von dendritischen Zellen ⁵. Dendritische Zellen (DCs) als professionelle Antigen-präsentierende Zellen innerhalb und unterhalb der Epithelschicht besitzen bäumchenartige Zytoplasmaausläufer, welche sie durch die Tight Junctions vorstrecken [siehe **Abbildung 3**]. So kann die dendritische Zelle (DC) über ihre direkte Umgebung hinaus Kontakt zu Antigenen aufnehmen, die Antigeninformation auswerten und an die lokalen Lymphknoten weiterleiten ⁶. Das beidseitige Interagieren durch Produktion einer Vielzahl verschiedener Mediatoren zwischen Epithelzellen und dem Verbund aus DCs spielt dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase im respiratorischen Gewebe ⁷.

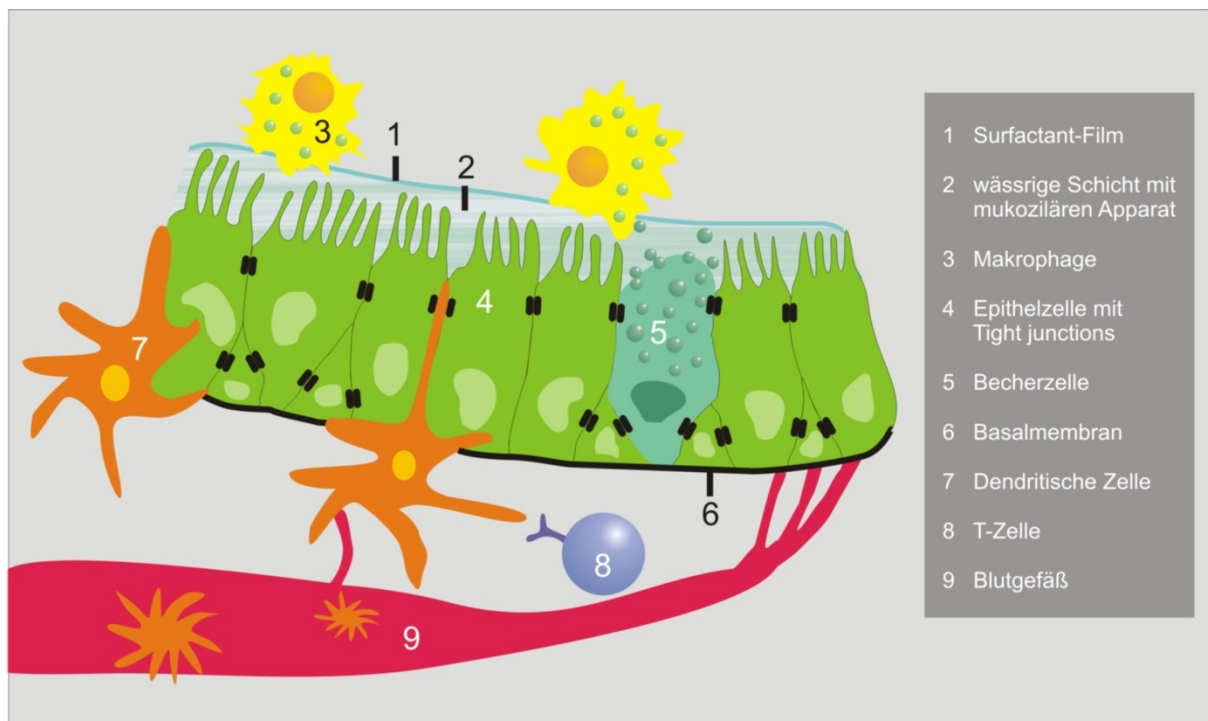


Abbildung 3: Abwehrstrukturen in den Atemwegen.

Schematisch dargestellt sind die einzelnen Abwehrstrukturen der Lunge. Adaptiert nach ⁶.

Durch aerodynamische Mechanismen wie Husten, Schnäuzen und Bronchokonstriktion und den mukoziliären Transportapparat wird in den mehrfach dichotom verzweigten Atemwegen eine Filtration von mehr als 95% der inhalierten Antigene erreicht, so dass die weiter peripher gelegenen Atemwege vor zu starken Ablagerungen an partikulärem Material verschont bleiben ⁸. Zigarettenrauch als die Hauptursache der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) kann diese ausgefeilten Schutzmechanismen schädigen, sodass u.a. die Frequenz der Zilienschläge verlangsamt wird. Fremdpartikel verbleiben länger im bronchialen System und lösen Entzündungsreaktionen aus, die mit einer erhöhten Schleimbildung, Kapillarpermeabilität und Destruktion der Alveolarwand einhergehen. Auch körpereigene Schutzmechanismen gegen die „Selbstverdauung“ der Lunge können negativ beeinflusst werden und spielen ebenso wie die Vermehrung der Makrophagen, DCs, T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten bei der Pathophysiologie der COPD eine wesentliche Rolle.

1.3 Dendritische Zellen in der Lunge

Mit einer Oberfläche von annähernd 150 m², einem Luft-Ventilations-Volumen von 350 Liter pro Stunde und einer sehr empfindlichen Gasaustauschregion stellt das respiratorische System eine riesige Herausforderung für das Immunsystem dar. Anatomisch unterscheidet man zwei Hauptkompartimente, die leitenden Atemwege und das Lungenparenchym. Beide Regionen sind funktional verschieden und unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung an immunologischen Zellen [**siehe Abbildung 4**] ⁹.

DCs stellen als Sensoren der Lungen mit ihrer einzigartigen Fähigkeit, die adaptive Immunität zu initiieren, den Schlüssel des angeborenen Immunsystems dar ¹⁰. Ihre entscheidende Aufgabe ist die kontinuierliche Überwachung der Antigen-exponierten Standorte im ganzen Körper, wobei sie entscheiden, ob Antigen-Bestandteile in immunogener oder tolerogener Weise präsentiert werden.

Erstmalig wurde die DC im Jahre 1868 von Paul Langerhans vorwiegend suprabasal sitzend im intraepidermalen Abschnitt der Haut beschrieben. Ihre auffällige Morphologie mit den lang ausgestreckten Armen, welche bis zwischen die Epithelzellen verflochten sind, ließen ihn die DCs fälschlicherweise den Zellen des Nervensystems zuordnen. Es

dauerte mehr als ein Jahrhundert, bis man diese Ansicht korrigierte und die DCs als Subpopulation der Leukozyten identifizierte ¹¹.

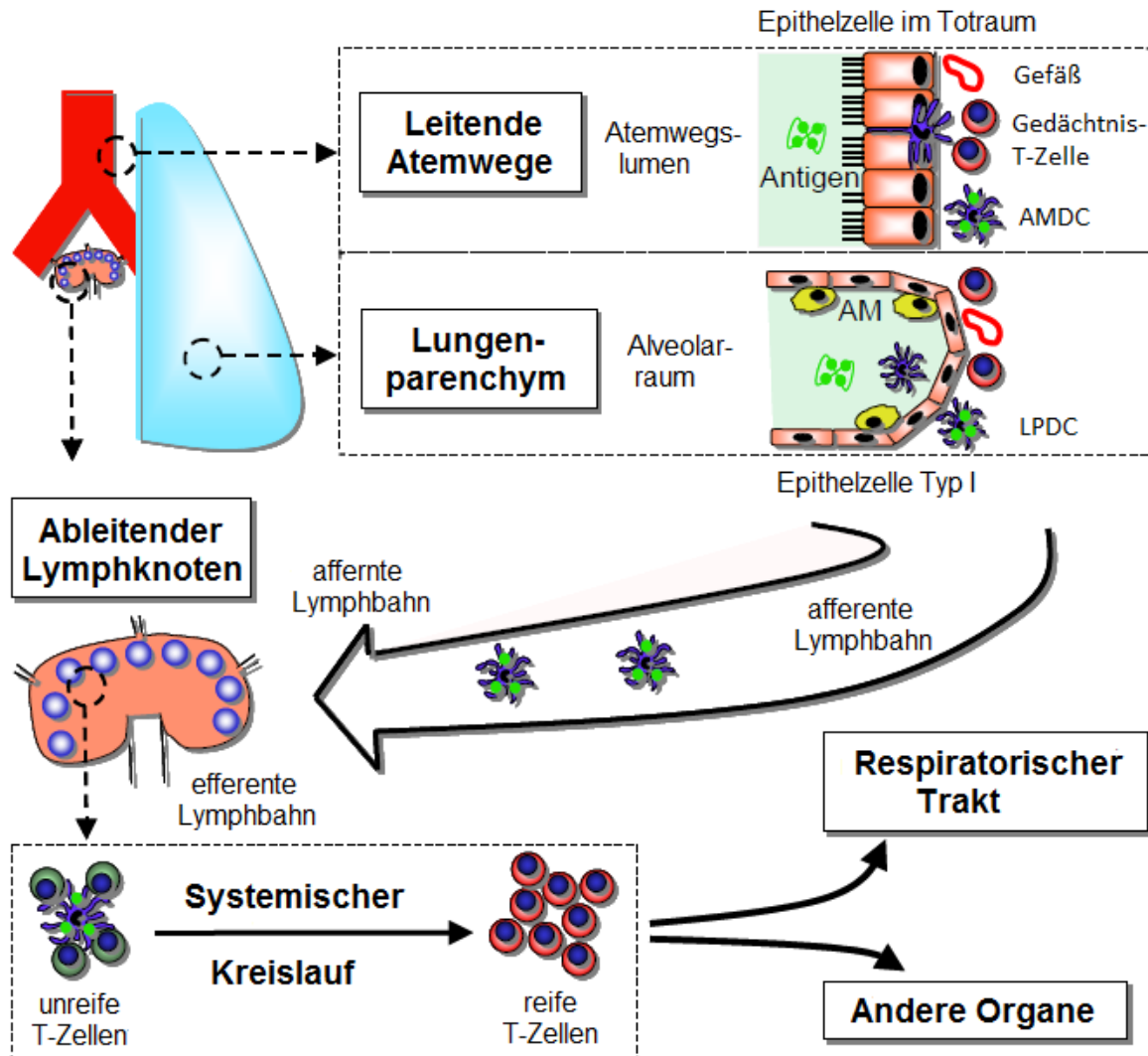


Abbildung 4: Immunologische Kompartimente im respiratorischen System.

Inhalierete Antigene gelangen in der Lunge in Kontakt mit den Antigen-präsentierenden Zellen. Dabei dominieren in den leitenden Luftwegen die AMDC (airway mucosal DCs), während im Lungenparenchym ein Übermaß an AM (alveolar macrophages) herrscht, welche auf die LPDC (lung parenchymal DCs) einen inhibitorischen Effekt haben um die lebenswichtige Gasaustauschoberfläche zu schützen. AMDC und LPDC wandern anschließend zu den ableitenden Lymphknoten, wo sie den unreifen T-Zellen Antigen-Peptide präsentieren. Die T-Zellen können sich nun zu Gedächtnis-T-Zellen differenzieren. Adaptiert nach ⁹.

Im Gleichgewicht befinden sich die DCs gleichmäßig verteilt zwischen den peripheren Geweben und lymphatischen Organen. Eine Teilmenge von DCs zirkuliert stets im Blut. Um eine antimikrobielle Immunität auszulösen, müssen sich DCs einem komplexen Prozess von Reifung und Umwandlung von einer Antigen-erfassenden Zelle zu einer Antigen-präsentierenden Zelle unterziehen. Dieser Prozess beinhaltet die Umwandlung der Morphologie der Zelle einschließlich des Verlusts anhaftender Strukturen, die Neuorganisation des Zytoskeletts und den Erwerb einer hohen zellulären Motilität ¹². Aus dem Knochenmark stammende und über das Blut in die Lunge einwandernde DCs sind mit speziellen Rezeptoren, sog. C-Typ Lektin-Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren (TLRs), ausgestattet. Diese dienen dem Ablesen von sog. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) und gefährlich-erscheinenden Molekülstrukturen, welche durch Gewebeerstörung freigegeben werden ¹³. Zahlreiche Erreger in Form von Mikroorganismen, absterbenden Zellen sowie Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems können so erfasst werden und DCs aktivieren ¹⁴. Die „Reifung“ der DCs ist verbunden mit dem Verlust der zur Endozytose befähigten Rezeptoren ¹⁵ und der Translokation von MHC-Molekülen, welche aufgenommene Antigen-Peptide gebunden haben, an die Zelloberfläche ¹⁶. Zusätzlich werden die Sekretion von costimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 hochreguliert ¹⁷ und verschiedene Zytokine exprimiert, die zwischen den angelockten Effektorzellen differenzieren sowie die Wanderung zu den regionalen Lymphknoten fördern (insbesondere Chemokinrezeptor CCR7) ¹⁸. Sobald die mit Antigen-Peptiden beladenen DCs zu den regionären Lymphknoten gelangt sind, induzieren sie dort die T-Zell-Proliferation und Bildung von Effektor-T-Zellen [siehe **Abbildung 4**].

1.4 Zigarettenrauch-assoziierte Erkrankungen

Zigarettenrauch ist die bedeutendste und ebenso vermeidbarste Ursache für Morbidität und Mortalität weltweit ¹⁹. Schätzungsweise versterben mehr als 5 Millionen Menschen jährlich an Krankheiten, die durch das Rauchen verursacht werden [siehe **Tabelle 1**] ²⁰.

Rauchen ist der Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, zu denen Arteriosklerose, Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris, Bluthochdruck, plötzlicher Herzstillstand und Schlaganfall gehören ^{21, 22, 23, 24}. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass mehr als einer von 10 kardiovaskulären Todesfällen weltweit dem Rauchen zuzuschreiben ist. Dies demonstriert eindrucksvoll, dass das Rauchen eine der wichtigsten Ursachen kardiovaskulärer Mortalität ist ²⁵. Tabakkonsum hat auch zahlreiche kutane Wirkungen, von denen die meisten schädlich sind. So ist Rauchen eng verbunden mit Hautkrankheiten wie Psoriasis, Pustulosis palmoplantaris, Hidrosadenitis suppurativa und systemischem Lupus erythematoses sowie Krebsarten der Lippe, Mundhöhle und Anogenitalregion ²⁶.

Weiterhin lässt Aktiv- und Passivrauchen bewiesenermaßen das Risiko sowohl für Infektionen als auch invasive Krankheiten des Respirationstraktes aller Altersklassen steigen. Im Kindesalter ist insbesondere die Aufnahme von Passivrauch assoziiert mit Infektionen der oberen und unteren Atemwege wie einer akuten Otitis media, Pneumonie oder Bronchitis ²⁷. Durch Rauchen induzierte inflammatorische Atemwegsreaktionen und die Steigerung der Schleimproduktion weisen darauf hin, dass eine Abhängigkeit zwischen der Prävalenz einer chronischen Bronchitis und den Pack Years des Patienten besteht ²⁸. Ebenso konnte in Tierversuchen bestätigt werden, dass Asthma und Atopien durch oxidativen Stress und den durch Tabakrauch verursachten Schaden der Bronchialschleimhaut, welcher eine tiefere Allergen-Penetration ermöglicht, mit verursacht werden ²⁹.

Zigarettenrauch beinhaltet ca. 4000 Chemikalien, von denen 250 Substanzen eine gesundheitsgefährdende Wirkung zugeschrieben werden konnte und wenigstens 50 kanzerogen wirken ³⁰. Die potentesten Kanzerogene des Zigarettenrauchs sind Nitrosamine, welche die DNA-Struktur verändern und so Mutationen hervorrufen, die zu verschiedenen Karzinomformen führen können [**siehe Tabelle 1**]. Hervorzuheben ist hier insbesondere das Bronchialkarzinom. Dieses ist aktuell die häufigste Krebserkrankung beider Geschlechter in Deutschland ^{31, 32}.

Tabelle 1: Durch Rauchen verursachte oder aggravierte Erkrankungen.

	Erkrankungen
Augen	Katarakt ³³
Zähne	Parodontitis ³⁴
Atemwege	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung ^{35 28}
	Pneumonie ³⁶
	Bronchitis ²⁸
	Asthma ²⁹
	Tuberkulose ^{35, 37}
Herz-Kreislauf-System	Arteriosklerose ²²
	Koronare Herzerkrankungen (Myokardinfarkt) ²⁴
	Zerebrovaskuläre Erkrankungen (Schlaganfall) ²³
	Bauchaortenaneurysma ³⁸
	Gefäßverschlüsse (pAVK) ³⁸
Haut	Psoriasis ²⁶
	Lupus erythematodes ²⁶
	Hidrosadenitis suppurativa ²⁶
	Pustulosis palmoplantaris ²⁶
Karzinome	Bronchialkarzinom ³¹
	Mundbodenkarzinom ²⁶
	Kehlkopfkarzinom ³¹
	Ösophaguskarzinom ³¹
	Magenkarzinom ³¹
	Pankreaskarzinom ³¹
	Karzinome des Urogenitaltraktes ³¹
	Nierenkarzinom ³¹
	Leukämie ³¹
	Mammakarzinom ³⁹
	Zervixkarzinom ³¹
Stoffwechsel	Diabetes mellitus ⁴⁰
	Osteoporose ⁴¹
	Impotenz, Unfruchtbarkeit ³⁹

Eine der wichtigsten Rauch-assoziierten Erkrankungen ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Noch 1990 wurden die durch COPD bedingten Todesfälle weltweit auf 2,2 Millionen geschätzt und die Lungenerkrankung rangierte auf Platz 6 der am häufigsten zum Tode führenden Krankheiten. Bereits 2020 wird nach Schätzungen die Anzahl der Todesfälle auf 3,5 Millionen steigen und die COPD in der Rangliste Platz 3 einnehmen ⁴². Für 2030 wird prognostiziert, dass die COPD auf Platz 4 der häufigsten Krankheiten weltweit zu finden sein wird ⁴³.

1.5 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.5.1 Definition und Epidemiologie

Die COPD ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Erkrankungen der Lunge, die zu Atemnot, chronischem Husten und Auswurf führen. Sie ist definiert durch einen Tiffeneau-Index $[FEV_1/FVC] < 70\%$ und das Vorliegen einer nicht voll reversiblen, chronischen Atemwegsobstruktion, typischer Risikofaktoren (wie z.B. Zigarettenrauch oder Exposition mit Rauch in Innenräumen) und einer typischen Symptomatik (vor allem einer über viele Jahre langsam zunehmenden Belastungsluftnot) ⁴⁴ [siehe **Abbildung 5**].

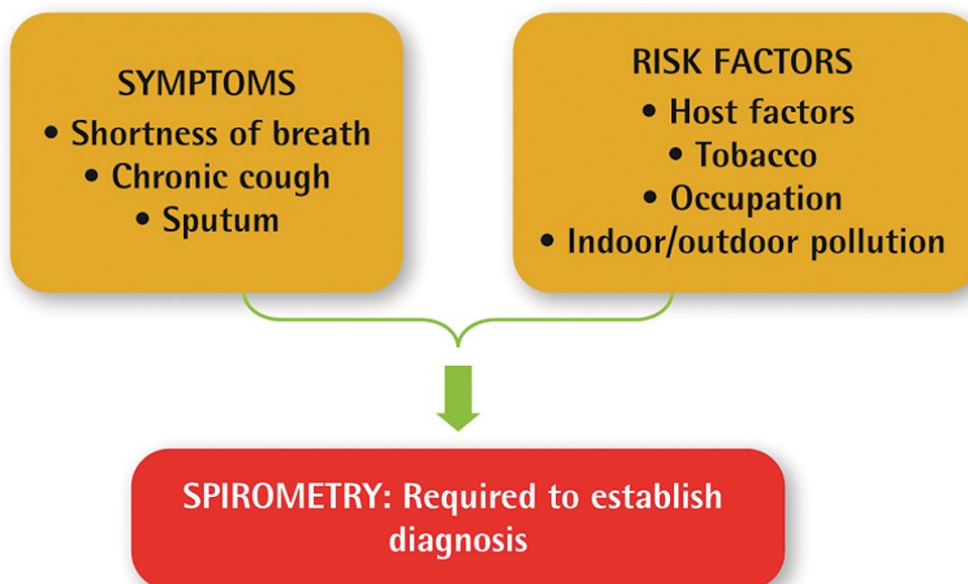


Abbildung 5: Wege zur Diagnose einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung. Die Grafik ist entnommen aus ⁴⁴.

In den aktuellen Empfehlungen der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) wird eine Schweregradeinteilung empfohlen, welche sowohl lungenfunktionelle (spirometrische) Aspekte enthält als auch die Symptomatik (Ausmaß der Belastungsluftnot und Anzahl der Exazerbationen) abbildet [siehe **Abbildung 6**].

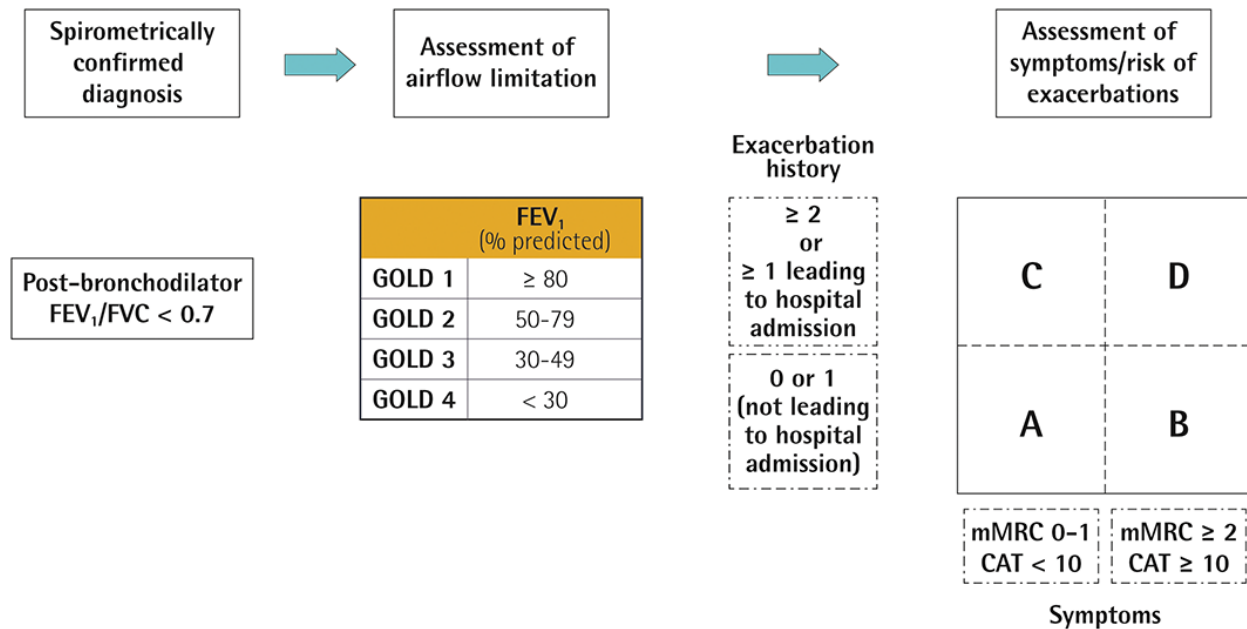


Abbildung 6: Klassifikation der COPD nach GOLD mit modifiziertem ABCD-Bewertungsinstrument. Die Grafik ist entnommen aus ⁴⁴.

Bei der spirometrischen Schweregradeinteilung ist nicht der Tiffeneau-Index (FEV_1/FVC), sondern die FEV_1 maßgebend, da diese ein „Summations-Parameter“ aus Obstruktion und Pseudo-Restriktion durch das Emphysem darstellt.

Die COPD ist eine vermeidbare und behandelbare Erkrankung, die eine große medizinische und wirtschaftliche Bedeutung hat ⁴⁵. Ihre Prävalenz steigt mit dem Alter der Patienten und der Intensität des Zigarettenkonsums und kann so in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Population von 25% bis 50% variieren ⁴⁶. Die meisten Fälle mit einer nicht diagnostizierten COPD sind milde Formen in einem frühen Stadium der Erkrankung. Näherungsweise 95% der Erkrankungen im Stadium I und 80% im Stadium II bleiben unentdeckt ⁴⁷.

Weltweit betrifft die COPD 9,8% der Männer und 5,6% der Frauen ⁴⁸, sie ist damit gegenwärtig die vierthäufigste Todesursache. Für die nahe Zukunft ist ein weiterer Anstieg

von Prävalenz, Morbidität und Mortalität zu erwarten, so dass die COPD im Jahr 2020 unter den häufigsten Todesursachen auf den dritten Platz vorrücken wird ⁴⁹.

1.5.2 Pathophysiologie

Die COPD entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener pathophysiologischer Phänomene, die letztendlich zu einer chronischen Obstruktion des expiratorischen Luftstroms und progredienten Destruktion des Lungenparenchyms führen. Sie spielen sich in den proximalen und peripheren Atemwegen, dem Lungenparenchym und pulmonalen Blutgefäßen ab. Die pathologische Entwicklung umfasst dabei eine chronische Inflammation mit einem Anstieg spezifischer Entzündungszellen in den unterschiedlichen Lungenkompartimenten und strukturelle Veränderungen resultierend aus wiederholter Verletzung und Reparatur des Gewebes ⁵⁰.

Die COPD manifestiert sich in einer chronischen Atemwegsobstruktion und einem Lungenemphysem.

Das Lungengewebe bei Patienten mit einer chronischen Bronchitis weist verdickte Bronchialwände und die Verlegung des Atemlumens durch vermehrte Schleimhautexsudate und mucopurulente Ablagerungen auf. Mikroskopisch findet man dementsprechend eine Hyperplasie von Becherzellen und subepithelialen mukösen Drüsen, eine peribronchiale Fibrosierung und Hypertrophie der glatten Muskulatur sowie Verdickung der subepithelialen Basalmembran. Ebenso kann eine chronisch inflammatorische Infiltration oder auch eine Plattenepithelmetaplasie vorhanden sein ⁵¹. Ein durch Schadstoffe und Entzündungsreaktion induziertes Protease-Antiprotease-Ungleichgewicht kann zur Zerstörung von Alveolarsepten und damit zur Ausbildung eines Lungenemphysems führen.

Es gibt verschiedene Typen des Emphysems, welche die Destruktion der Alveolarwand mit dem Resultat der Erweiterung der Atemwege distal der terminalen Bronchioli gemeinsam haben. Das zentrilobuläre Emphysem wird am häufigsten mit Zigarettenrauch-Exposition in Verbindung gebracht und entwickelt sich typischerweise aus einer chronisch obstruktiven Bronchitis. Dieser Typ ist vorwiegend im Oberlappen

der Lunge zu finden und betrifft zunächst die Bronchioli respiratorii, später auch die Bronchioli terminales und Azini ⁵².

Analysen von Zellkulturen aus den Alveolen und kleinen Atemwegen zeigen einen Anstieg aller Zelltypen, die in der Pathophysiologie der COPD von Bedeutung sind, einschließlich Makrophagen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten ⁵³.

Extrazelluläre Signalproteine, sogenannte Zytokine, fungieren als Mediatoren zwischen den Zellen und können so immunologische Reaktionen koordinieren. Eine erhöhte Menge proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-8, IL-6, IL-1 und Tumornekrosefaktor α und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 konnten im Sputum von Rauchern mit einer COPD nachgewiesen werden ⁵⁴. Neutrophile Granulozyten werden beispielsweise durch Chemokine, insbesondere IL-8, angelockt, was sie veranlasst, in den respiratorischen Trakt einzuwandern. Dort sezernieren sie Serinproteasen, wozu die Neutrophile Elastase (NE), Katepsin G und Proteinase-3 gehören. Diese fördern die Schleimproduktion und tragen vermutlich zur Alveolardestruktion bei ⁵⁵.

James C. Hogg konnte in seiner Studie von 2004 den Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der COPD und der Anzahl der Lymphfollikel, bedingt durch Infiltration der Bronchienwand durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, nachweisen ⁵⁶. Vorhergehende Berichte zeigen ebenso, dass B-Zellen, CD4- und CD8-Lymphozyten im Gewebe der kleinen Atemwege vorhanden sind und dass deren Anstieg verbunden ist mit einem Abfall der FEV₁. Aus dem Anstieg der Lymphozyten resultiert eine Vergrößerung des Atemwegs-assoziierten lymphatischen Gewebes (engl. Bronchus-Associated Lymphoid Tissue, BALT) [**siehe Abbildung 7**]. In Abhängigkeit vom spirometrischen GOLD-Stadium ist diese BALT-Vermehrung in unterschiedlich starker Ausprägung nachweisbar ⁵⁷.

Die genauen Ursachen für die Vergrößerung des BALT bzw. der lokalen Lymphfollikel bei der COPD sind jedoch bis heute nicht endgültig erforscht. Eine mögliche Erklärung liefern die in der Studie von K. Bratke 2008 erhobenen Daten. Demnach könnte eine ursächlich durch Zigarettenrauch verminderte Expression des Chemokinrezeptor-7 (CCR7) auf myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) ein wichtiger Stimulus für eine Ex-

pansion des BALT bzw. lokaler Lymphknoten sein. Die durch CCR-7-Suppression bedingte verminderte Abwanderung von aktivierten mDCs in die mediastinalen Lymphknoten könnte zu einer Akkumulation von mDCs in der Bronchialwand und somit zur Bildung von lokalen Lymphfollikeln beitragen ⁵⁸.

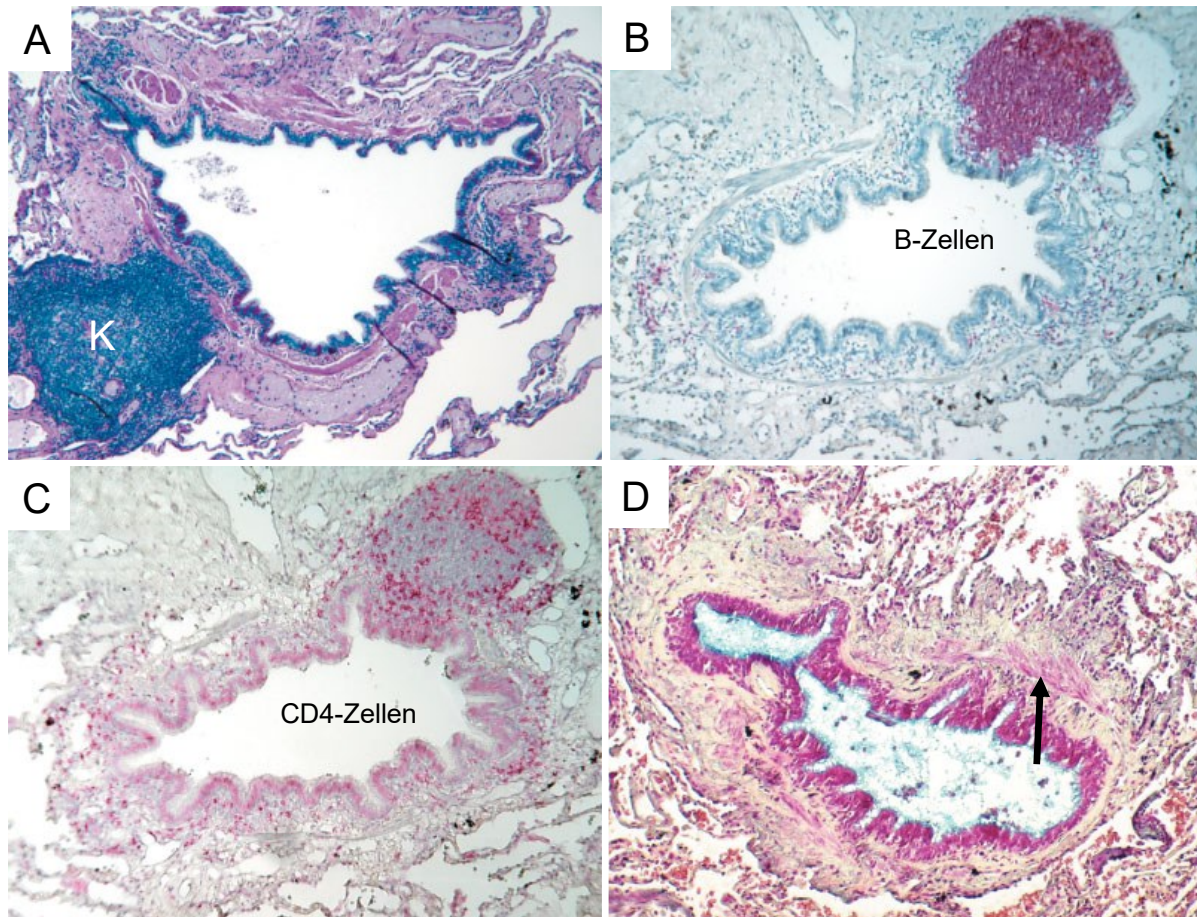


Abbildung 7: Pathologische Befunde bei Patienten mit COPD

Bild **A** zeigt eine Ansammlung von lymphatischem Gewebe, das einen Lymphfollikel mit Keimzentrum (K) beinhaltet, in den kleinen Atemwegen, umgeben von zahlreichen dunkel gefärbten Lymphozyten in der Schleimhaut. Im Bild **B** ist ein anderer Follikel abgebildet, dessen Keimzentrum vor allem gefärbte B-Lymphozyten beinhaltet und bei dem in Bild **C** CD4-Zellen mit einer spezifischen Färbung hervorgehoben sind. Diese sind um den Follikel herum und in der Atemwegswand angeordnet. Bild **D** zeigt einen histologischen Schnitt eines kleinen Atemweges mit Bindegewebsumbau im subepithelialen Kompartiment und in der Adventitia. Der Pfeil zeigt auf die glatte Muskulatur, die die subepitheliale Schicht und die Adventitia voneinander trennt. Die Abbildungen sind entnommen aus ⁵⁶.

1.6 Myeloide dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind Schlüsselkoordinatoren der Immunantwort. Sie dirigieren die Entscheidung zwischen Toleranz und Immunität. Basierend auf Phänotyp, Lokalisation und Funktion werden verschiedene Subpopulationen differenziert. Zu den wichtigsten Subpopulationen gehören neben den plasmazytoiden DCs (pDCs), die sich aus lymphozytären Vorläuferzellen entwickeln, die myeloiden DCs (mDCs). Diese stammen ebenso wie die pDCs von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab, entwickeln sich jedoch unter dem Einfluss des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) und dem Flt-3 Liganden über monozytäre Vorläuferzellen zu mDCs ⁵⁹.

DCs definieren sich über die unterschiedliche Expression einer Vielfalt von Oberflächenmarkern. Zwar fehlen bei den DCs die klassischen Marker von Lymphozyten, Granulozyten und NK-Zellen (CD3, CD19, CD14, CD20 und CD56), dafür zeigen sie eine deutliche Ausbildung des MHC-II-Komplexes oder auch HLA-DR (engl. human leukocyte antigen-DR) ⁶⁰. Myeloide DCs weisen zusätzlich die spezifische Expression der myeloiden Marker CD11c, CD13 und CD33 auf [**siehe Tabelle 2**] ⁶¹. Oftmals als eigenständige Subtypen der DCs klassifizierte Langerhans-Zellen und intraepitheliale DCs werden mittlerweile der Gruppe der mDCs zugeordnet ⁶². Einen singulären Oberflächenmarker, der mDCs definieren würde, gibt es nicht. Vielmehr werden heute mDCs durch die Abwesenheit von Markern der Lymphozyten, Granulozyten und NK-Zellen (lineage-cell-markers) und der starken Expression von HLA-DR und CD11c definiert. Bestimmte mDC-Subtypen sind durch weitere Marker definiert (wie z.B. Langerhans-Zellen durch den Marker Langerin oder CD1a).

Tabelle 2: Oberflächenmarker bei mDCs. Adaptiert nach ⁶³.

Marker	Ausprägungsgrad	Funktion
CD1a	+	Lipid-bindendes Antigen auf APC
CD1c (BDCA-1)	++	Antigenpräsentation
CD4	+	Corezeptor von MHC-II auf T-Zellen, Antigenerkennung
CD11a	++	Zelluläre Adhäsion und kostimulatorische Wirkung
CD11c	++	Transmembranprotein, Aktivierung, Chemotaxis
CD13	++	Antigenerkennung
CD31	++	Zelladhäsion
CD33	++	bindet N-Acetylneuraminsäure
CD36	+	Aufnahme von Cholesterinester, freien Fettsäuren und Kollagen
CD40	++	Aktivierung
CD45RO	++	Tyrosinphosphatase, mit starker Assoziation zum T-Zell-Rezeptor
CD45RA	-	Tyrosinphosphatase, mit geringer Assoziation zum T-Zell-Rezeptor
CD54	++	Adhäsion
CD123	±	Interleukin-3-Rezeptor
CCR5	++	Chemotaxis
CXCR3	-	Aktivierung, reguliert Leukozytenmigration
ILT1	++	Erkennung von kranken Zellen
ILT3	++	Erkennung von kranken Zellen
MHC II	++	Antigenpräsentation
Ausprägungsgrad der Markerexpression: - abwesend, ± niedrig, + mittel, ++ hoch		

Unreife mDCs sind durch ihre kontinuierliche endozytotische Aktivität gekennzeichnet ⁶⁴ und sondieren ihre Umgebung in den peripheren Geweben ständig nach Antigenen ⁶⁵. Verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine oder auch chemisch-physikalische Noxen können eine Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B bewirken und so die Ausreifung von mDCs veranlassen ⁶⁶. Über die Rezeptoren TLR2

und TLR4, die über Signaltransduktionswege ebenfalls den Transkriptionsfaktor induzieren, können Lipopolysaccharide (LPS) sowie bakterielle Zellkomponenten mDCs aktivieren^{67, 68}. NF- κ B beeinflusst die Transkription von Genen, die u.a. an angeborenen und adaptiven Immunantworten⁶⁹, Entzündungsreaktionen⁷⁰ und Aktivierung bzw. Reifung von Zellen beteiligt sind⁷¹. Weiterhin lassen sich der Mannose-Rezeptor, DEC-205, und Rezeptoren für die Fc-Domäne von Immunglobulinen nachweisen⁷². Über diese können Antigene in Endosomen aufgenommen und der Denaturierung durch Proteasen sowie der Prozessierung zugeführt werden⁷³. Die entstandenen Peptide werden anschließend auf MHC-Moleküle geladen und an der Oberfläche präsentiert⁶³. Während der Reifung durchlaufen die mDCs strukturelle und funktionelle Veränderungen. Demnach stellen sie die Expression von Molekülen zur Antigenerkennung und -aufnahme ein, regulieren die Neusynthese von MHC-II-Molekülen herunter und bilden durch Akkumulation des Aktinbündelungsproteins Fascin dendritische Fortsätze aus^{74, 75}. Während ihrer Aktivierung und Reifung sezernieren mDCs verschiedene Zytokine, die vielfältige Rollen bei der Immunantwort übernehmen. Reife mDCs wandern unter Wirkung des CCR7 in die lymphatischen Organe, regulieren kostimulatorische Moleküle (u.a. CD40, CD80, CD86, OX40-Ligand, 4-1BB-Ligand) hoch und präsentieren aufgenommene Antigene über MHC-Moleküle, wodurch sie eine CD4- und CD8-T-Zell-Antwort veranlassen können⁷⁶.

Ein geringer Anteil der mDCs erlangt im Gleichgewichtszustand des Körpers eine Teilaktivität und migriert in sekundäre lymphatische Organe. Charakteristisch für diese Spontanmigration sind mDCs mit einer starken Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen, die jedoch keine für eine effektive T-Zell-Aktivierung notwendigen proinflammatorischen Zytokine sezernieren⁷⁷. Aufgrund ihres spezifischen tolerogenen Phänotyps sind diese mDCs auch unter nichtinflammatorischen Bedingungen in der Lage, in autoreaktiven T-Zellen Apoptose, Anergie oder einen regulatorischen Status zu induzieren⁷⁸.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass mDCs als potenteste APCs sowohl bei proinflammatorischen Immunantworten als auch bei der Induktion der immunologischen Toleranz eine zentrale Rolle spielen.

1.6.1 mDCs bei Rauchern und Patienten mit COPD

Zigarettenrauch beeinflusst signifikant die Funktion dendritischer Zellen. Direkte Rauchexposition führt zu einer sofortigen und selektiven Rekrutierung von mDCs in die menschlichen Atemwege ²². Aktivierte dendritische Zellen induzieren die adaptive Immunantwort und bewirken somit über T-Helferzellen, CD4+ und CD8+ T-Zellen und B-Zell-Antwort eine Entwicklung lymphoider Follikel infolge einer chronischen Entzündungsreaktion ⁷⁹.

R. Vassallo et al. konnte in seiner Studie von 2010 zeigen, dass es zu einer Ansammlung von reifen mDCs (definiert als CD83+) und DCs vom Langerhans-Typ (definiert als CD1a+) im Lungengewebe von COPD-Erkrankten kommt. Zigarettenrauch steigert dabei nachweislich das Überleben der DCs ⁸⁰. Das Profil der Funktions-assoziierten Oberflächenmoleküle auf mDCs in den Atemwegen bei Rauchern und Nichtrauchern wurde von Bratke et al. mittels Vierfarben-Durchflusszytometrie in der BALF analysiert. Es wurde eine 7-fache Zunahme der Gesamtzellzahlen in der BALF bei Rauchern, verglichen mit Nichtrauchern, festgestellt. Weiterhin gab es eine starke Zunahme in der Expression von Langerin und CD1a (Marker von Langerhans-Zellen) auf mDCs bei der Population der Raucher. Darüber hinaus wurde eine stärkere Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf mDCs der Raucher beobachtet. Eine verminderte Expression hingegen wiesen die mDCs von Rauchern beim Lymphknoten-Homing-Rezeptor CCR7 auf, was mit der Atemwegsobstruktion und Überblähung bei Rauchern korreliert ⁵⁸.

Auch bei Patienten mit COPD wurde eine Akkumulation von Langerhans-Zellen in den kleinen Atemwegen gezeigt ⁸¹.

Auch in der immunhistochemischen Studie von Liao et al. von 2015 fand sich bei Patienten mit COPD eine deutlich erhöhte Anzahl von CD1a+ DCs und eine verminderte Expression von CCR7+ und CD83+ mRNA. Daraus lässt sich ein reduziertes Migrationspotential von mDCs in die Lymphknoten ableiten, was wiederum eine übermäßige lokale adaptive Immunantwort auslösen kann und somit ein Schlüsselement in der Pathogenese der COPD darstellt ⁸².

Unabhängig vom Rauchstatus findet sich bei Patienten mit COPD eine stark reduzierte Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5, welcher auch für die Erkennung von

mikrobiellen Strukturen wichtig ist, auf mDCs, was die DC-Interaktionen mit mikrobiellen Antigenen behindern könnte ⁸³.

Somit scheint bei Patienten mit COPD eine Dysfunktion der mDCs vorzuliegen, welche zur Pathophysiologie der Erkrankung wesentlich beiträgt ⁸⁴.

1.7 Fazit und Fragestellung

Rauchen ist der bekannteste Risikofaktor für die Entwicklung von entzündlichen Lungenerkrankungen wie der COPD ⁸⁵. Es gibt immer mehr Hinweise auf eine pathologische Anhäufung und Aktivierung von mDCs in der Lunge bei Patienten mit COPD. Es ist davon auszugehen, dass mDCs als Antigen-präsentierende Zellen und der damit verbundenen Steuerung pulmonaler Immunreaktionen eine zentrale pathogenetische Rolle im Krankheitsbild der COPD spielen ⁷⁹. Am Universitätsklinikum Rostock konnte durch die von Dr. K. Bratke und Prof. Dr. M. Lommatzsch entwickelte Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung von DCs in der humanen BALF eine detailliertere Beschreibung Funktions-assoziiierter Oberflächenmoleküle von mDCs in den Atemwegen von Rauchern und Nichtrauchern erfolgen ^{58, 86, 87}.

Bisher gibt es umfangreiche Hinweise, dass inhalative Corticosteroide (ICS), welche eine zentrale Rolle in der Therapie von Asthma spielen, einen Einfluss auf Atemwegs-DCs bei Patienten mit allergischem Asthma und allergischer Rhinitis haben ^{88, 89, 90}.

Die Rolle der ICS in der Therapie der COPD ist jedoch umstritten. Zudem liegen derzeit keine Informationen über die Wirkung der ICS auf Atemwegs-DCs bei Zigarettenrauchen mit oder ohne Rauch-bezogene Lungenerkrankungen vor. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der Studie, erstmalig den Einfluss von ICS, entweder als alleinige Gabe oder in Kombination mit langwirksamen Beta-2-Mimetika (LABA), auf mDCs in den Atemwegen von Rauchern mit COPD im spirometrischen Stadium 0 oder 1 nach GOLD zu untersuchen.

Folgende konkrete Fragestellungen sollen in der Dissertationsschrift behandelt werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Anzahl der mDCs in der BALF von Rauchern, die mit einem inhalativen Steroid (Fluticason), einer Kombination aus einem inhalativen Steroid und einem LABA (Fluticason+Salmeterol) oder Placebo behandelt wurden?
2. Ist ein Einfluss der verschiedenen Medikationen in den drei Studiengruppen auf die exprimierten Oberflächenmarker der mDCs in der BALF zu beobachten?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der mDCs in der BALF und der Gesamtanzahl der Probanden, die mit einem inhalativen Steroid (Fluticason oder Fluticason+Salmeterol) behandelt wurden, im Vergleich zu den Probanden, die ein Placebo einnahmen?

Zur Klärung dieser Fragen wurde eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie durchgeführt, deren Design, Durchführung und Ergebnisse in der vorliegenden Promotionsarbeit dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Potentielle Probanden wurden durch öffentliche Aushänge in Rostock sowie zwei Zeitungsanzeigen im „Warnow Kurier“ Rostock im Zeitraum von September 2008 bis Juli 2009 auf die klinische Studie der Abteilung für Pneumologie an der Universität Rostock aufmerksam gemacht. Interessenten meldeten sich telefonisch oder per E-Mail. Telefonisch erfolgte dann neben der Erläuterung der klinischen Studie die Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien. Um eine ausreichende Bedenkzeit zu gewährleisten, wurde den Teilnehmern mindestens 2 Wochen vor Studienbeginn eine ausführliche Probandeninformation per Post zugesandt.

Für die Probanden galten folgende Einschlusskriterien:

- Männer im Alter zwischen 30 – 60 Jahren
- Raucheranamnese über mindestens 15 Jahre
- Aktives Rauchen, im Durchschnitt mindestens 10 Zigaretten pro Tag
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung

Folgende Ausschlusskriterien galten für alle Studienteilnehmer:

- Jede Art von akuten und chronischen Erkrankungen (außer COPD oder Hypertonus)
- Regelmäßige Einnahme oder Inhalation von Medikamenten (außer Antihypertensiva)
- Nachweis einer FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) von < 80% vom Soll in der Bodyplethysmographie
- Nachweis einer Sauerstoffsättigung von < 90% in der Pulsoxymetrie
- Asthma bronchiale (gesicherte Diagnose oder Angabe von typischen Symptomen)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie in den letzten 60 Tagen


- Umstände, die eine regelmäßige Einnahme der Studienmedikation unwahrscheinlich erscheinen lassen (z.B. mangelnde Compliance, Probleme beim Umgang mit dem Diskus)
- Akute Infektion der unteren Atemwege in der Woche vor Beginn der Studie
- Allergie gegen Lidocain (Lokalanästhetikum für die Bronchoskopie)
- Bekannte Unverträglichkeit gegenüber einer der Studienmedikationen

Jeder der Teilnehmer unterzeichnete eine Einverständniserklärung und willigte damit in die Teilnahme an der klinischen Studie ein.

Die Studie wurde entsprechend den Richtlinien der Good Clinical Practice (CPMP/ICH/135/35) und dem Arzneimittelgesetz (AMG) durchgeführt. Erst nach Vorlage eines positiven Votums der zuständigen Ethikkommission (Mecklenburg-Vorpommern) und der Genehmigung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) wurde die Studie begonnen [**siehe Abbildung 8 und Abbildung 9**].

Die Studie begann am 18.05.2009 und endete am 21.09.2009.

Klinische Prüfung

 **BfArM**
Bundesinstitut für Arzneimittel
und Medizinprodukte

DM-H • Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3 • D-53175 Bonn

University Rostock
Herrn Dr. Marek Lommatzsch
E.-Heydemann-Str. 06
18057 Rostock

Postanschrift:
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3
D-53175 Bonn
<http://www.bfarm.de>
Telefon: (0228) 207-4318
(0228) 99307-4318
Telefax: (0228) 207-5207
(0228) 99307-5207
e-mail: klinpruefung@bfarm.de

Nachrichtlich:
Landesbehörde
Mecklenburg-Vorpommern
Ethikkommission der Med. Fakultät Universität
Rostock

per Fax: +49 381-494-7392
Ihre Zeichen und Nachricht vom: _____
Gesch.Z.: Bitte bei Antwort angeben: _____

(0228) 99307- _____ Bonn, 17. Juni 2009

04.02.2009 61-3910-4035007 4318
26.02.2009
16.03.2009
23.04.2009

**Betr.: Antrag auf Genehmigung einer klinischen Prüfung § 42 Abs. 2 AMG,
Inhaltliche Prüfung der Antragsunterlagen gemäß § 9 Abs. 1 GCP-V**

Eingangsdatum BfArM	:	07.02.2009
Mängelschreiben	:	17.02.2009 / 09.03.2009 / 24.03.2009
Eingang nach Formalprüfung	:	27.02.2009 / 17.03.2009
Eingang nach Bescheid	:	24.04.2009
EudraCT-Nummer	:	2009-009459-40
Vorlage-Nummer	:	4035007
Sponsor	:	University Rostock
Legal representative Sponsor	:	J.
Prüfplancode des Sponsors	:	DC_und_COPD
Protokollversion	:	version 6 Version vom: 2009-01-28
IMP Nummer	PR01	: Salmeterol als Xinafoat 50 µg/Einzeldosis, Fluticasonpropionat 250 µg/Einzeldosis, einzeldosiertes Pulver zur Inhalation (Viani 50µg/250 µg Diskus, Zul.-Nr.: 44918.01.00)
IMP Nummer	PR02	: Fluticasonpropionat, 250 µg/Einzeldosis, einzeldosiertes Pulver zur Inhalation (Flutide 250 Diskus, Zul.-Nr.: 56290.03.00)
IMP Nummer	PL01	: Placebo zu PR1, PR2 (einzeldosiertes Pulver zur Inhalation)

Titel der klinischen Prüfung :
Prüferinitiierte placebokontrollierte randomisierte Pilotstudie zum Einfluß von Fluticasone
und Salmeterol auf Dendritische Zellen (DC) von Rauchern mit COPD im Stadium 0 oder 1
nach GOLD
[Investigator initiated placebo controlled randomized Pilot trial of the Influence of
Fluticasone and Salmeterol on Dendritic cells (DC) in Smokers with COPD stadium GOLD 0
or I]

Leiter/in der klinischen Prüfung gemäß § 40 Abs. 1 Nr. 5 AMG:
Dr. Marek Lommatzsch, Rostock


 Das BfArM ist ein Bundesinstitut im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit.

Abbildung 8: Genehmigung des BfArM, Seite 1.

- 2 -

Bescheid

Nach Durchsicht der bei uns am 24.04.2009 eingegangenen von Ihnen nachgereichten Unterlagen wurden alle in unserem Bescheid vom 15.04.2009 benannten Gründe für den Einspruch gegenstandslos. Die Durchführung der oben genannten klinischen Prüfung wird genehmigt.

Rechtsbehelfsbelehrung: Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, 53175 Bonn, schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

Die Unterlagen werden unter der o. g. Vorlagennummer verwahrt. Bitte geben Sie die Vorlage-Nr. und den Code des Prüfplans stets im weiteren Schriftverkehr zur o.g. klinischen Prüfung an und verwenden Sie als Postanschrift:

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Fachregistratur Z 14.2.06,
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, **D-53175 Bonn**,
Tel. +49 (0)228-207-4318, Fax +49 (0)228-207-5207

Hinweis: Wir weisen Sie darauf hin, dass entsprechend § 67 (1) AMG der Sponsor vor dem Beginn der klinischen Prüfung u. a. der Bundesoberbehörde sämtliche Prüfer (soweit erforderlich auch mit Angabe der Stellung als Hauptprüfer oder Leiter der klinischen Prüfung) und Prüfzentren anzuzeigen hat. Sollten die angegebenen Prüfzentren von denen im ursprünglich an die Bundesoberbehörde gestellten Antragsformular abweichen, ist dieses korrigiert als XML- und PDF-Datei nachzureichen. Für die Anzeige des Endes einer klinischen Prüfung benutzen Sie bitte das Formular Annex 3 der Leitlinie ENTR/CT1.

Sollten Prüfzentren während der Studie ab- oder angemeldet werden, ist nach positivem Votum der zuständigen Ethik-Kommission der Bundesoberbehörde zusätzlich ein aktualisiertes Antragsformular des Antrags auf Genehmigung einer klinischen Prüfung gemäß § 7 GCP-V als XML- (ausführliche Version) und PDF-Datei vorzulegen.

Mit freundlichen Grüßen
im Auftrag

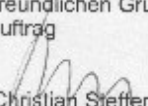

Dr. Christian Steffen

Abbildung 9: Genehmigung des BfArM, Seite 2.

2.2 Ablauf der Studie

Einen Überblick zum Ablauf der Studie gibt **Abbildung 10**. Die Durchführung der klinischen Studie fand für alle Studienteilnehmer in der Zeit von 8 Uhr bis 12 Uhr vormittags statt. Dabei erfolgte zu Beginn die Aufklärung des potentiellen Studienteilnehmers in einem persönlichen Gespräch unter Verwendung der schriftlichen „Information für Studienteilnehmer“ (7.5). Insbesondere wurden die potentiellen Studienteilnehmer über die Weitergabe ihrer pseudonymisierten Daten im Rahmen der Dokumentations- und Mitteilungspflichten nach § 12 und § 13 GCP-V (Good Clinical Practice/Gute Klinische Praxis-Verordnung) an die dort genannten Empfänger aufgeklärt. Betroffene Personen, die der Weitergabe nicht zustimmten, wurden nicht in die klinische Prüfung eingeschlossen.

Durch eine gründliche Anamneseerhebung, welche die Dokumentation von persönlichen Daten, chronischen Erkrankungen, Allergien, der aktuellen Medikation und des Rauchverhaltens beinhaltete, und eine orientierende klinische Untersuchung wurden die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft.

Mit dem Erfüllen der Ein- und Ausschlusskriterien sowie dem Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte die Aufnahme des Probanden in die klinische Studie.

Folgende Untersuchungen bzw. Vorbereitungen schlossen sich an:

2.5 Bodyplethysmographie

2.6 Körperliche Untersuchung

2.7 Anlage eines peripheren Venenzuganges mit Blutentnahme

2.8 Pulsoxymetrie

2.9 Bronchoskopie mit Bronchoalveolärer Lavage (BAL) und
klinische Überwachung über 30 min. nach Bronchoskopie

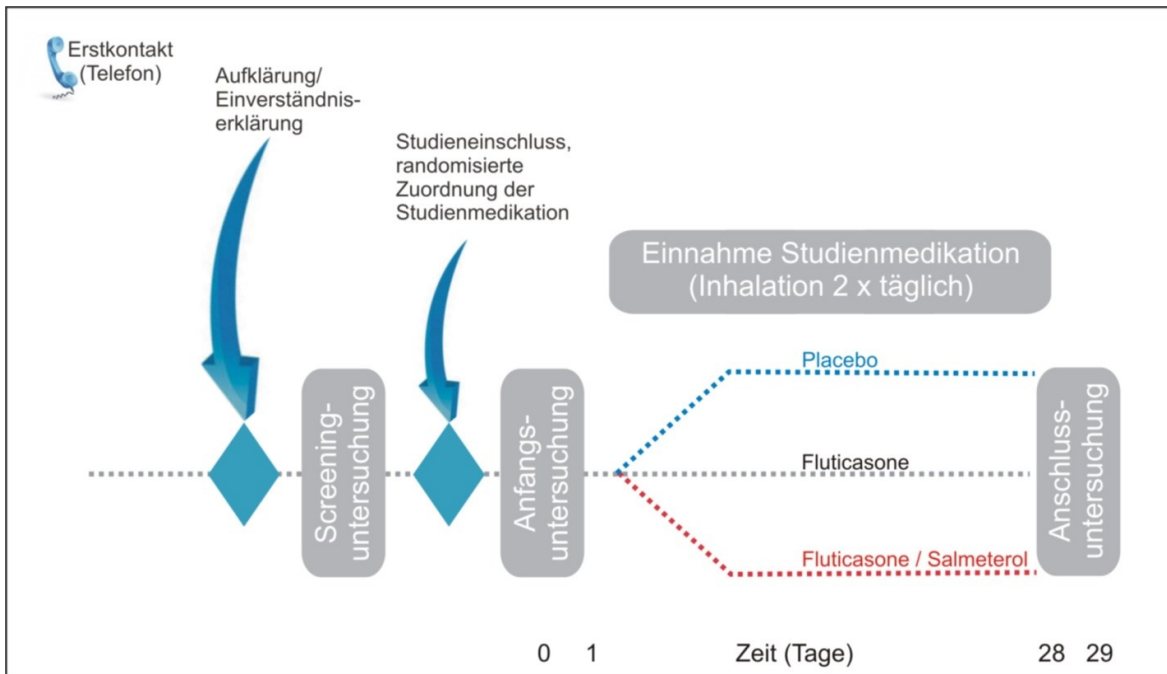


Abbildung 10: Studiendesign laut Studienprüfplan (7.4).

2.3 Studienmedikation

Mit Aufnahme des Studienteilnehmers in die Studie bekam dieser eine Studiennummer und dementsprechend die Studienmedikation zugewiesen. Diese Zuweisung der Studiennummer erfolgte fortlaufend entsprechend dem Studieneinschluss. Der erste in die Studie aufgenommene Teilnehmer erhielt die Studien-Nummer 1 und somit die Studienmedikation, die mit der Nummer 1 bezeichnet ist. Der nachfolgende in die Studie aufgenommene Teilnehmer erhielt die Studiennummer 2 und die Studienmedikation mit der Ziffer 2 usw.

Es wurden 45 Studienteilnehmer eingeschlossen, wobei jeweils 15 Teilnehmer eine der drei Studienmedikationen Placebo (P), Fluticasone (F, entsprechend dem kommerziellen Präparat Flutide®) oder der Kombination von Salmeterol/Fluticasone (F+S, entsprechend dem kommerziellen Präparat Viani®) erhielten.

Die Verteilung der 3 Studienmedikationen auf die Ziffern 1 - 45 erfolgte zuvor entsprechend einer Randomisierungsliste [**siehe Tabelle 3**], die durch Prof. Kundt (Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universität Rostock) erstellt wurde. Die Wirkstoffe werden in Folge mit P, F oder F+S bezeichnet.

Tabelle 3: Randomisierungsliste der Probanden (Erstellung durch Prof. Kundt, während der Studie war die Zuordnung der Ziffern zu den Präparaten nur Prof. Kundt bekannt).

Patientennummer	Therapie
1	Fluticason+Salmeterol
2	Placebo
3	Fluticason+Salmeterol
4	Fluticason
5	Fluticason
6	Fluticason+Salmeterol
7	Placebo
8	Fluticason
9	Placebo
10	Fluticason
11	Placebo
12	Fluticason+Salmeterol
13	Fluticason
14	Fluticason+Salmeterol
15	Fluticason+Salmeterol
16	Fluticason
17	Placebo
18	Placebo
19	Fluticason+Salmeterol
20	Fluticason
21	Placebo
22	Fluticason+Salmeterol
23	Fluticason
24	Fluticason
25	Placebo
26	Fluticason+Salmeterol
27	Fluticason
28	Placebo
29	Fluticason+Salmeterol
30	Placebo
31	Fluticason
32	Placebo
33	Fluticason+Salmeterol
34	Fluticason
35	Placebo
36	Placebo
37	Fluticason
38	Fluticason+Salmeterol
39	Fluticason+Salmeterol
40	Placebo
41	Fluticason+Salmeterol
42	Fluticason
43	Fluticason
44	Fluticason+Salmeterol
45	Placebo

Die Studienteilnehmer inhalierten nach der Anfangsuntersuchung über einen Zeitraum von jeweils 28 Tagen täglich jeweils morgens und abends die Studienmedikation über einen Diskus [siehe **Abbildung 11**].

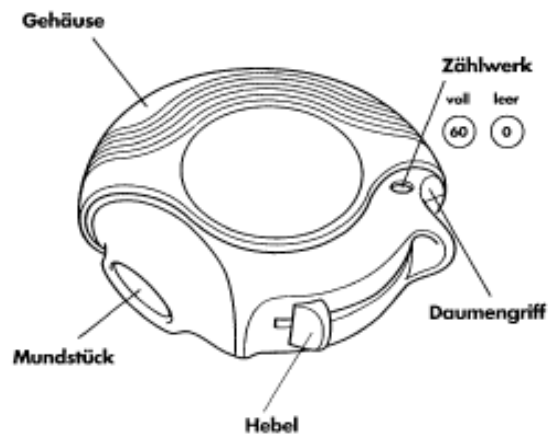


Abbildung 11: Beispieldiskus mit Studienmedikation zur Inhalation.

Über den Diskus wurde entweder Placebo oder Fluticason oder Fluticason+Salmeterol inhaliert. Die verwendeten Inhalativa (Fluticason bzw. Fluticason+Salmeterol) sind zur Therapie der COPD zugelassen⁹¹.

Die Fertig-Prüfpräparate (einschließlich Placebo) wurden von dem Hersteller (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG) hergestellt und freigegeben. Die Verblindung und Nummerierung der Inhalatoren erfolgte durch GSK anhand der Randomisierungsliste von Prof. Kundt, entsprechend den gesetzlichen Anforderungen nach AMG §10 und GCP-V §5.

2.3.1 Fluticason (F, Flutide® 250 µg Diskus®)

Flutide® 250 Diskus ist ein für die Therapie des Asthma bronchiale oder der COPD zugelassenes Arzneimittel (Zulassungsinhaber GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG). Eine Einzeldosis mit 12,5 mg Pulver von Flutide® 250 Diskus enthält 250 µg Fluticasonpropionat. Fluticason ist ein Glucocorticoid. Folgende Nebenwirkungen, die nicht unter Placebo auftraten, sind für Flutide® beschrieben: häufig (bei 1 - 10% der

Patienten) Irritationen im Rachenraum, Husten, Heiserkeit, Verletzlichkeit der Haut (bei Langzeitstudien), Soorbefall der Mund- und Rachenschleimhaut, Pneumonien; selten (bei 0,1 - 1% der Patienten) Hautausschlag, Urtikaria, Juckreiz, Überempfindlichkeits-Reaktionen.

2.3.2 Fluticason+Salmeterol (F+S, Viani[®] 50 µg / 250 µg Diskus[®])

Viani[®] 50 µg / 250 µg ist ein für die Therapie des Asthma bronchiale oder der COPD zugelassenes Arzneimittel (Zulassungsinhaber GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG). Jede Einzeldosis von Viani[®] 50 µg / 250 µg enthält 50 µg Salmeterol (als Salmeterolxinafoat) und 250 µg Fluticasonpropionat. Salmeterol ist ein langwirksames Beta-2-Mimetikum, auch LABA genannt (long-acting beta-receptor agonist). Folgende Nebenwirkungen, die nicht unter Placebo auftraten, sind für Viani[®] beschrieben: häufig (bei 1 - 10% der Patienten) Soorbefall im Mund- und Rachenraum, Tremor, Palpitationen, Irritation der Rachenschleimhaut, Heiserkeit/Dysphonie, Muskelkrämpfe, Hypokaliämie; selten (bei 0,1 - 1% der Patienten) Überempfindlichkeitsreaktionen mit Hautbeteiligung und Tachykardie.

2.3.3 Placebo (P)

Als Placebo wurde ein durch den Hersteller der beiden anderen Studienmedikationen entworfener Diskus mit dem gleichen Aussehen und den gleichen Hilfsstoffen ohne die spezifischen Wirkstoffe fabriziert.

2.4 Randomisierung, Verblindung und Entblindung

Eine Randomisierungsliste [**siehe Tabelle 3**], die die zufällige Verteilung der einzelnen Studienmedikationen auf die Probandennummern 1 - 45 sicherstellt, wurde durch den verantwortlichen Biometriker Prof. Dr. Günther Kundt erstellt. Anhand dieser Randomisierungsliste wurde die Studienmedikation mit den Ziffern 1 - 45 beschriftet.

Diese Beschriftung der Prüfpräparate mit der Probandennummer (und somit der zugeordneten Studienmedikationsnummer) stellt einen Identifizierungscode entsprechend GCP-V §5 dar.

Weder die Prüfarzte noch die Studienteilnehmer waren über die Zuordnung der einzelnen Studienmedikationen zu den Studienmedikationsnummern informiert, somit handelt es sich um eine doppelblinde, randomisierte Studie. Alle Studienteilnehmer erhielten identisch aussehende Diski, so dass keine Rückschlüsse auf die jeweilige Studienmedikation möglich waren. Die Randomisierungsliste [**siehe Tabelle 3**] war nur dem Hersteller und dem Biometriker zugänglich.

Mit der Studienmedikation wurden ebenfalls 45 einzeln verschlossene, fortlaufend mit den Studiennummern 1 bis 45 bezeichnete Umschläge an das Studienzentrum übermittelt, in denen die zu der Studiennummer zugehörige Studienmedikation unverschlüsselt niedergelegt wurde. Wenn im weiteren Verlauf während der Studienphase eine Entblindung der Studienmedikation beim Auftreten von SAE (serious adverse event: schwerwiegende Nebenwirkung) oder für die weitere Therapie des Studienteilnehmers notwendig geworden wäre, wäre nur der Umschlag mit der entsprechenden Studiennummer zu öffnen gewesen. Dieses wäre mit Grund des Öffnens, Datum, Uhrzeit und Namen des Öffnenden zu dokumentieren gewesen. Ein entsprechender Fall ist jedoch nicht eingetreten.

Nach Abschluss der Studienphase und vor Beginn der statistischen Auswertung erfolgte durch den Biometriker anhand der von ihm erstellten Randomisierungsliste die Zuordnung der einzelnen Studienteilnehmer zu den Studienmedikationen.

2.5 Bodyplethysmographie

2.5.1 Material

1. Bodyplethysmograph mit Auswertungssoftware [JAEGER, Würzburg, D]
2. Mundstück und Nasenklemme [JAEGER, Würzburg, D]

2.5.2 Methode

Die Bodyplethysmographie ist eine Untersuchung zur Messung dynamischer und statischer Lungenparameter. Es steht ein modernes Messgerät (Masterscreen, Fa. Jäger-Viasys, Masterscreen, Höchberg, Deutschland) [siehe **Abbildung 12**] und geschultes Assistenzpersonal zur Verfügung. Diese Methode erlaubt neben der Erfassung dynamischer Parameter mit großer Sensitivität eine Bestimmung des Atemwegswiderstandes und statischer Lungenvolumina (inklusive der Residualkapazität und der totalen Lungkapazität) und stellt gegenwärtig die umfassendste Methode zur Erfassung der Lungenfunktion dar. Für die Messung der Atemstromstärke ist der Patient an einen Pneumotachographen (über Mundstück) angeschlossen. Durch die Änderung seines Körpervolumens während der Atmung kommt es zu Druckveränderungen in der Kammer, die aufgezeichnet werden. Man erhält ein Druck-Strömungsdiagramm, welches über das Verhalten des Strömungswiderstandes während eines gesamten Atemzyklus genauere Aussagen erlaubt, als es mit den sonstigen Methoden möglich ist. Teil der bodyplethysmographischen Messungen ist auch eine einfache Spirometrie. Mit dieser Methode werden die mobilisierbaren Lungenvolumina (z.B. die forcierte expiratorische Vitalkapazität in der ersten Sekunde, FEV₁) und die Strömungsgeschwindigkeiten erfasst.



Abbildung 12: Plethysmograph der Fa. Jaeger.

2.5.3 Durchführung

Der Proband sitzt in bequemer aber aufrechter Haltung in der luftdicht abschließbaren Kammer des Bodyplethysmographen. Nach einigen Minuten der Gewöhnung sowie der Erläuterung des nun folgenden Ablaufs wird der Proband gebeten das Mundstück des Pneumotachographen in den Mund zu nehmen und vollständig mit den Lippen zu umschließen. Anschließend wird ihm die Nase mittels einer Nasenklemme verschlossen. Nach dem Schließen der Tür wird mit den Messungen begonnen und der Proband dazu aufgefordert gleichmäßig über das Mundstück ein- und auszuatmen. Ein- und Ausatmung erfordern durch eine Druckdifferenz eine treibende Kraft, welche die Messung des Atemflusses ermöglicht.

Initial werden so lange Druckstromdiagramme geschrieben und verworfen, bis der durch den Temperaturengleich bedingte Drift nicht mehr vorhanden ist. In der Regel

werden drei akzeptable Druckströmungsdiagramme aufgezeichnet, wobei eine weitgehende Deckungsgleichheit bestehen sollte. Entsprechen die auf dem Bildschirm dargestellten Widerstandskurven den Kriterien bei Ruheatmung, wird die Verschlussdruck-Messung gestartet. Während des Verschlusses des Atemrohres soll der Proband möglichst normal weiteratmen bis zur Öffnung der Klappe. Mit dieser Technik wird das intrathorakale Gasvolumen, welches nach normaler Expiration im Thorax verbleibt, bestimmt. Es folgt ein weiterer Verschluss, nach dessen Öffnung das Tiffeneau-Manöver durchgeführt wird. Dabei wird der Proband aufgefordert langsam maximal auszuatmen, danach zügig und vollständig einzuatmen und mit möglichst geringer Pause (unter 1 s) so schnell und stark wie möglich auszuatmen. Sobald ein Plateau im zeitlichen Volumenverlauf sichtbar wird bzw. dem Probanden eine weitere Expiration nicht mehr möglich ist, wird die normale Atmung fortgesetzt und die Untersuchung ist beendet.

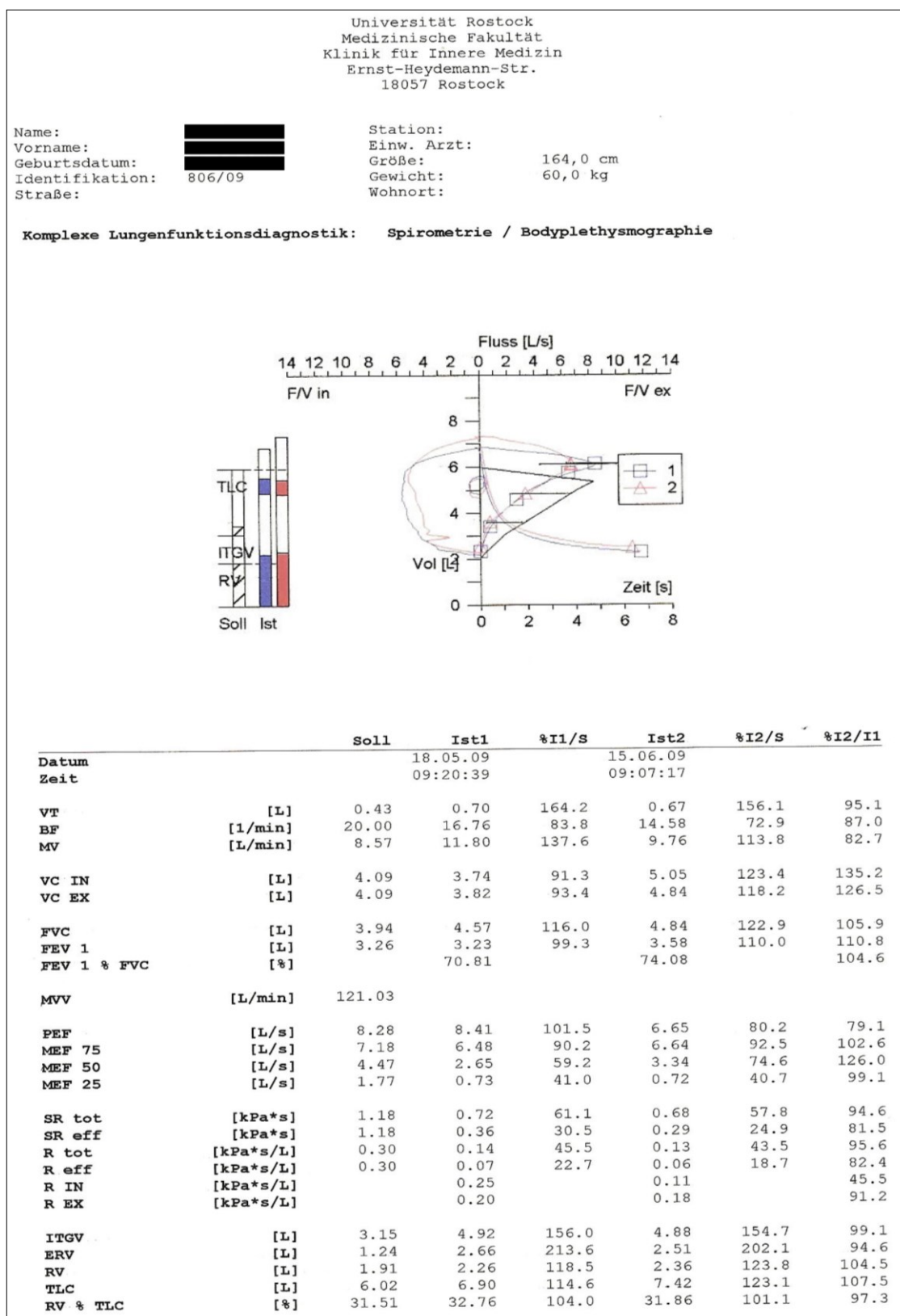


Abbildung 13: Originalbefund der Lungenfunktionsprüfung eines Probanden an den Zeitpunkten A und B.

2.6 Körperliche Untersuchung

Zum ersten Termin, dem Zeitpunkt A, wurde eine körperliche Untersuchung des Probanden durchgeführt. Diese beinhaltete neben der Beurteilung des Allgemein- und Ernährungszustandes die gründliche Inspektion, Perkussion und Auskultation aller Körperregionen. Zusätzlich wurden folgende Vitalparameter erhoben:

1. Blutdruck
2. Puls
3. Körpertemperatur im Ohr
4. Atemfrequenz
5. Sauerstoffsättigung des Blutes

Anhand der erhobenen Parameter wurde die Tauglichkeit des Probanden unter Einbeziehung der Ausschlusskriterien (**siehe Punkt 2.1**) beurteilt. Auffälligkeiten wurden dokumentiert und mit dem Prüfarzt besprochen. Desweiteren wurden Befindlichkeitsstörungen sowie subjektive und objektive Krankheitssymptome vermerkt, um so die im Zusammenhang mit der verabreichten Studienmedikation vorbeschriebenen Nebenwirkungen besser erfassen zu können.

Folgende mögliche unerwünschte Ereignisse der wirkstoffhaltigen Studienmedikation wurden am Tag 0 (Zeitpunkt A), 7, 14, 21 und 28 (Zeitpunkt B) erfragt:

1. Irritationen im Rachenraum / der Rachenschleimhaut
2. Soorbefall (Candidainfektion) der Mund- und Rachenschleimhaut
3. Husten
4. Heiserkeit / Dysphonie
5. Infektzeichen
6. Hautausschlag
7. Urtikaria (Nesselsucht)
8. Juckreiz
9. Tremor
10. Palpitationen / Tachykardie
11. Muskelkrämpfe

2.7 Anlage eines peripheren Venenzuganges mit Blutentnahme

2.7.1 Material

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| 1. Stauschlauch | |
| 2. Sterile Wattetupfer | [PAUL HARTMANN, Heidenheim, D] |
| 3. Hautdesinfektion mit Octeniderm® | [SCHÜLKE&MAYR, Norderstedt, D] |
| 4. Flexüle 20G | [B. BRAUN, Melsungen, D] |
| 5. Kanülenfixierung mit Leukomed® IV | [BSN MEDICAL, Hamburg, D] |
| 6. 2 Monovetten EDTA 2,7 ml | [SARSTEDT, Nümbrecht, D] |
| 7. Monovette Li-Heparin 2,7 ml | [SARSTEDT, Nümbrecht, D] |
| 8. Serum Monovette 7,5 ml | [SARSTEDT, Nümbrecht, D] |

2.7.2 Methode und Durchführung

Für die Punktion eines Blutgefäßes wurde das venöse Blut durch das Anlegen eines Stauschlauches gestaut. Anschließend wurde die Haut an der entsprechenden Stelle gründlich desinfiziert und eine Venenverweilkanüle angelegt. Im Rahmen dieser Maßnahme fanden gleichzeitig die Blutentnahmen statt. Es wurden folgende Röhrchen [siehe **Abbildung 14**] (insgesamt ca. 15 ml) abgenommen:

1. 1 EDTA-Röhrchen (2,7 ml) zur FACS-Analyse der DC im Blut
(Pneumologisch-Immunologisches Forschungslabor)
2. 1 EDTA-Röhrchen (2,7 ml) zur Differentialblutbildbestimmung
(Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin)
3. 1 Lithium-Heparin-Röhrchen (2,7 ml) zur CRP und Elektrolyt-Bestimmung
(Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin)
4. 1 Serum-Röhrchen (7,5 ml) zur Aliquotierung
(Pneumologisch-Immunologisches Forschungslabor)



Abbildung 14: Blutentnahme. Dargestellt sind Serum-, Li-Heparin- und EDTA-Monovetten.

2.7.3 Blutwertmessungen

Die Messungen des Differentialblutbildes, des CRP und der Elektrolyte erfolgten im Zentrallabor der Universitätsklinik Rostock, welches im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin angesiedelt ist. Die Ermittlung des Differentialblutbildes erfolgte mit einem hämatologischen Analysegerät (XE, 2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Die CRP - Bestimmung wurde mittels eines Synchron LX 20 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) durchgeführt.

2.8 Pulsoxymetrie

Die Pulsoxymetrie ist ein Verfahren zur nicht-invasiven Ermittlung der arteriellen Sauerstoffsättigung über die Messung der Lichtabsorption bzw. der Lichtemission bei Durchleuchtung der Haut. Die Messung erfolgt mit einem Sättigungsaufnehmer (Clip - Nonin Onyx, Nonin Medical, Inc., Plymouth, Minnesota, USA) an einem leicht zugänglichen Körperteil, vorzugsweise an einem Finger. Im Clip befinden sich zwei in einem definierten Bereich leuchtende Lichtquellen und ein Fotosensor. Durch die unterschiedliche Färbung des mit Sauerstoff gesättigten Hämoglobins entsteht für das durchstrahlende Rotlicht eine unterschiedliche Absorption, die der Fotosensor misst. Über den Clip wird neben der Sättigung auch der Puls in den Kapillaren erfasst. Gemessen werden drei Werte: die Absorption des Lichts im 660 nm-Bereich, im 940 nm-Bereich und ohne die Strahlung der Messlichtquellen. Die unterschiedliche Absorption des Lichtes ergibt eine Differenz. Anhand eines Vergleichs des Messergebnisses mit einer Referenztabelle ermittelt das Gerät, welcher prozentuale Anteil der roten Blutkörperchen gesättigt ist (Sauerstoffsättigung).

2.9 Flexible Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL)

2.9.1 Material

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1. Flexibles Bronchoskop | [OLYMPUS, Hamburg, D] |
| 2. Bronchoskopie – Arbeitsplatz WM-N60 | [OLYMPUS, Hamburg, D] |
| 3. Tracheal-Saugsets | [UNOMEDICAL, Hamburg, D] |
| 4. Spritzen BD Discardit II® (5 und 10 ml) | [B. DICKINSON, Heidelberg, D] |
| 5. Isotonische Kochsalzlösung 0,9% | [B. BRAUN, Melsungen, D] |
| 6. Sauerstoffbrille | [ASID BONZ, Herrenberg, D] |
| 7. Pari-Inhalierboy | [PARI-WERK GMBH, Starnberg, D] |
| 8. Inhalat: Lidocain – Hydrochlorid 4%ig +
Salbuhexal® – Fertiginhalat | [HEXAL, Holzkirchen, D] |
| 9. Xylocain® – Pumpspray | [ASTRAZENECA, Wedel, D] |
| 10. Xylocain® – Viskös 2%ig | [ASTRAZENECA, Wedel, D] |

11. Schleimhautanästhesie:

Lidocain – Hydrochlorid 2 und 4%ig

[ZENTRALAPOTHEKE Uniklinik Rostock]

12. Midazolam – ratiopharm 5mg/5ml

[RATIOPHARM, Ulm, D]

2.9.2 Methode und Durchführung

Die Methode der flexiblen Bronchoskopie inklusive der bronchoalveolären Lavage (BAL) ist eine Routineuntersuchung in der Abt. für Pneumologie. Es stehen moderne Bronchoskopiegeräte und eine vollständig ausgestattete Bronchoskopie-Abteilung mit spezifisch geschultem Assistenzpersonal zur Verfügung [siehe **Abbildung 15**]. Vor der Bronchoskopie wird eine Venenverweilkanüle am Arm des Patienten angelegt und der Patient inhaliert 15 Minuten lang 4% Lidocain über Pari-Boy zur Betäubung der Schleimhäute. Während der Bronchoskopie wird der Patient mittels Monitor (Pulsoxymetrie und Blutdruckmessung) ständig überwacht. Das Bronchoskop wird über die Nase in die rechte Lunge eingeführt. Es wird danach ein Subsegment des Mittellappens mittels Bronchoskop intubiert und mit insgesamt 100 ml einer vorgewärmten physiologischen Kochsalzlösung schrittweise gespült. Die Spülflüssigkeit (die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit, BALF) wird zur weiteren Diagnostik asserviert. Für die Bodyplethysmographie und Pulsoxymetrie von Rauchern sind in der Literatur und in der Abt. für Pneumologie keine Risiken bekannt. Die Technik der BAL mittels Bronchoskopie ist bei Rauchern mit ausreichender Lungenfunktion ($FEV_1 > 30\%$ vom Soll oder $> 1,5$ Liter) eine sichere und komplikationsfreie Methode ⁹². Schwere oder vital bedrohliche Beeinträchtigungen der Studienteilnehmer sind bei alleiniger BAL (ohne Biopsie und ohne Deposition von Wirkstoffen oder Allergenen) nicht beschrieben. Während der Bronchoskopie können Hustenreiz und Brennen in Pharynx auftreten, dies wird jedoch meist als wenig beeinträchtigend empfunden. Unverträglichkeiten bei der Inhalation des Lokalanästhetikums sind selten. Diese Unverträglichkeiten werden bereits vor der Bronchoskopie erkannt (Atemwegsverschleimung, selten: zunehmende Atemnot) und werden durch Abbruch der Inhalation und der anschließenden Untersuchung behandelt. Eventuell auftretende Bronchialobstruktionen während der Bronchoskopie können durch die Gabe von Beta-2-Mimetika, Theophyllin i.v. oder

erforderlichenfalls einmalige intravenöse Applikation eines Corticoidderivates rasch behoben werden. Sollte eine Sedierung bei ausgeprägter Ängstlichkeit oder Unruhe des Probanden notwendig sein, können bis zu 5 mg Midazolam i.v. appliziert werden. Diese Maßnahme erfordert jedoch eine klinische Verlaufsbeobachtung über 2 Stunden nach Bronchoskopie (anstatt von 30 min.).



Abbildung 15: Durchführung einer flexiblen Bronchoskopie.
(OÄ Dr. Bier, Schwester Grit Wentzien und Schwester Gesine Fastnacht)

2.10 Aufbereitung der BALF inklusive Zellzählung

2.10.1 Material

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Zellsieb 70 µm BD Falcon | [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D] |
| 2. Sterile Falcon-Röhrchen 50ml | [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D] |

-
- | | |
|---|--------------------------------------|
| 3. Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R | [KENDO LAB. PRODUCTS, Hanau, D] |
| 4. Arbeitspuffer (Puffer mit Fetalem Kälberserum) | |
| 5. Hemacolor-Färbekit | [MERCK, Darmstadt, D] |
| 6. Türk'sche Lösung | [MERCK, Darmstadt, D] |
| 7. Objektträger | [ENGELBRECHT MLT GmbH, Edermünde, D] |
| 8. Neubauer-Zählkammer | [ROTH, Karlsruhe, D] |
| 9. Durchlichtmikroskop | [CARL-ZEISS, Jena, D] |
| 10. Heraeus Multifuge 1L-R Centrifuge | [THERMOSCIENTIFIC] |

2.10.2 Methode und Durchführung

Die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurde zunächst durch ein 2-Schicht-Zellsieb filtriert zur Entfernung von Verunreinigungen bzw. größeren Partikeln. Nachfolgend wurde die BALF in sterile Falconröhrchen gefüllt. Für die Zelldifferenzierung wurden hiervon 5 ml abpipettiert und 2 Tropfen 30%iger Rinderalbuminlösung hinzugegeben. Es schloss sich die Sedimentation auf Objektträger an. Nach Trocknung dieser Objektträger erfolgte die Fixierung und Färbung mittels eines kommerziellen Hemacolor-Färbekits. Die Zelldifferenzierung wurde mittels Mikroskop anhand von standardisierten morphologischen Kriterien für Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten (eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten) durchgeführt. Die sterilen Falconröhrchen mit der BALF wurden bei Raumtemperatur mit 320 x g (g = Erdbeschleunigung) für 10 min. zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 50 ml Waschpuffer resuspendiert, bevor eine erneute Zentrifugation (Raumtemperatur, 320 x g, 10 min.) und abschließend eine Resuspendierung in 1 ml Waschpuffer erfolgten. Ein geringer Teil (10 µl) der resultierenden Zellsuspension wurde zu 90 µl Türk'scher Lösung gegeben und für die Zellzählung (Neubauer - Zählkammer) verwendet, der Rest wurde für die durchflusszytometrischen Untersuchungen asserviert. Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer [siehe **Abbildung 16**]. Die Ergebnisse der Zellzählung wurden als Gesamtzellzahl pro Milliliter der gewonnenen Lösung angegeben.

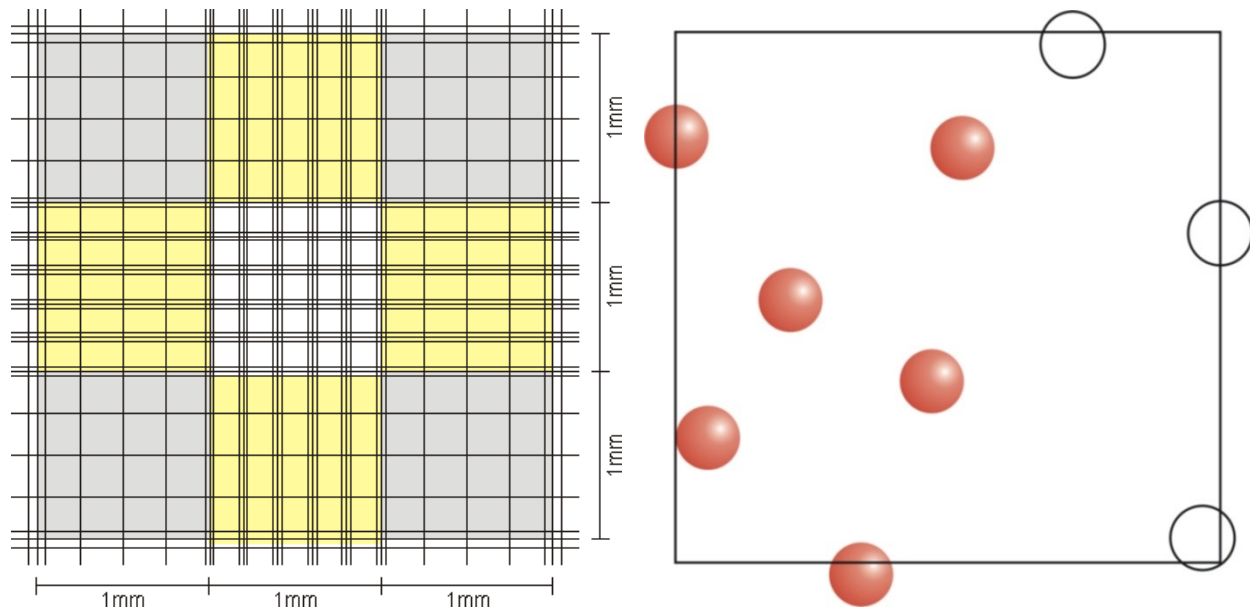


Abbildung 16: Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer.

In der linken Abbildung ist die gesamte Neubauer-Zählkammer (mit 3 x 3 Quadraten) dargestellt. Die Zellsuspension wird auf die Kammer aufgetropft, diese Suspension verteilt sich unter das aufgelegte Deckglas durch Kapillarkräfte. Zwischen Zählnetz und Deckglas besteht ein Abstand von 0,1 mm (Kammertiefe). Das erfasste Volumen entspricht bei einem großen Quadrat 0,1 μ l. In allen 4 Eckquadraten werden die Zellen ausgezählt. Hierbei werden die Felder von links nach rechts ausgezählt, Reihe für Reihe. In der rechten Abbildung ist gezeigt, dass dabei die Zellen gezählt werden, die auf der linken oder unteren Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren. Zellen, die auf der oberen oder rechten Grenzlinie liegen oder diese gerade noch berühren, werden nicht mitgezählt. Gefüllte Kreise (●) werden mitgezählt, nicht gefüllte (○) nicht. Aus der Summe der gezählten Zellen wird für alle 4 Eckfelder der Mittelwert errechnet, dieser Wert multipliziert mit 10000 ergibt die Zellzahl / ml Zellsuspension.

2.11 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

2.11.1 Material

1. Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R [KENDO LAB. PRODUCTS, Hanau, D]
2. Tischzentrifuge MiniSpin [EPPENDORF, Hamburg, D]
3. Durchflusszytometer FACSCalibur [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D]
4. FACS – Software CellquestPro [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D]
5. Pipette Research 100 – 1000 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
6. Pipette Research 20 – 200 µl [EPPENDORF, Hamburg, D]
7. Pipettenspitzen blau 1000 µl [GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, D]
8. Pipettenspitzen gelb 20 µl [GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, D]
9. Reaktionsgefäße 1,0 ml [SARSTEDT, Nümbrecht, D]
10. Falcon – Röhrchen FACS 5 ml [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D]
11. PBS (phosphate buffered saline) [INVITROGEN GmbH, Karlsruhe, D]
12. FCS (Fetales Kälberserum) [INVITROGEN GmbH, Karlsruhe, D]
13. FACS Lysing Solution [BECTON DICKINSON, Heidelberg, D]
14. Antikörper – Verdünnungslösung:
49,5 ml FACS - Puffer + 0,5 ml NaN_3 - Stammlösung
(FACS - Puffer: PBS + 2% FCS, NaN_3 - Stammlösung [10%]: 1 g NaN_3 - Pulver aufgelöst in 10 ml Aquadest)
15. Antikörper-Gebrauchslösung:
980 µl Antikörper-Verdünnungslösung + 20 µl Stammlösung des Herstellers
16. Monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper [siehe Tabelle 4]

2.11.2 Methode

Die Methode der Durchflusszytometrie von DCs in der BALF ist eine etablierte Untersuchung in der Abt. für Pneumologie der Universität Rostock ^{86,93,94}. Durch fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (sogenannte FACS-Analyse) können DCs und deren Oberflächenmoleküle (Marker) quantitativ bestimmt werden. Grundlage der Methode ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern

durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Über Photodetektoren kann die Ablenkung des Strahles senkrecht zur Bewegungsachse (Seitwärtsstreuung, sideward scatter, SSC) gemessen werden, wodurch sich Informationen über die innere Struktur der Zellen (unter anderem Granularität des Zytoplasmas) ermitteln lassen. Die gemessene Absorption des Lichtes entlang des Strahlenganges (Vorwärtsstreuung, forward scatter, FSC) gilt als ein Maß für die Größe der Zellen [**siehe Abbildung 17**].

Durch Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist eine Analyse mehrerer Oberflächenmarker auf einer Zelle möglich. Drei der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Phytoerythrin (PE), Cytochrom-5 (Cy5) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Auf Anregungen durch Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert Cy5 tiefrotes Licht der Wellenlänge 650 nm, PE orangefarbenes Licht der Wellenlänge 585 nm und FITC grünes Licht einer Wellenlänge von 530 nm. Durch Darstellung der gespeicherten Daten in Koordinatensystemen (Dotplots) können sowohl die Informationen über Größe und Granularität (FSC, SSC) als auch die spezifischen Oberflächenmarker ausgewertet werden. Die Achsen des Diagramms werden durch zwei der gemessenen Parameter gebildet und jede Zelle gemäß den bei ihr gemessenen Größen als Punkt eingetragen. Die sich daraus ergebenden Punktwolken repräsentieren die unterschiedlichen Populationen in der analysierten Zellgesamtheit [**siehe Abbildung 18**]. Eine Negativkontrolle mit unmarkierten Kontroll-Antikörpern führt zum Ausschluss derjenigen Zellen bzw. Zelltrümmer, die die Kontroll-Antikörper unspezifisch gebunden haben. Mithilfe der Software ist es möglich, eine Auswahl bestimmter Zellpopulationen durch sogenannte „Gates“ zu treffen. Der prozentuale

Anteil der im Gate eingekreisten Zellen an der Gesamtpopulation aller Zellen lässt sich dann genau quantifizieren.

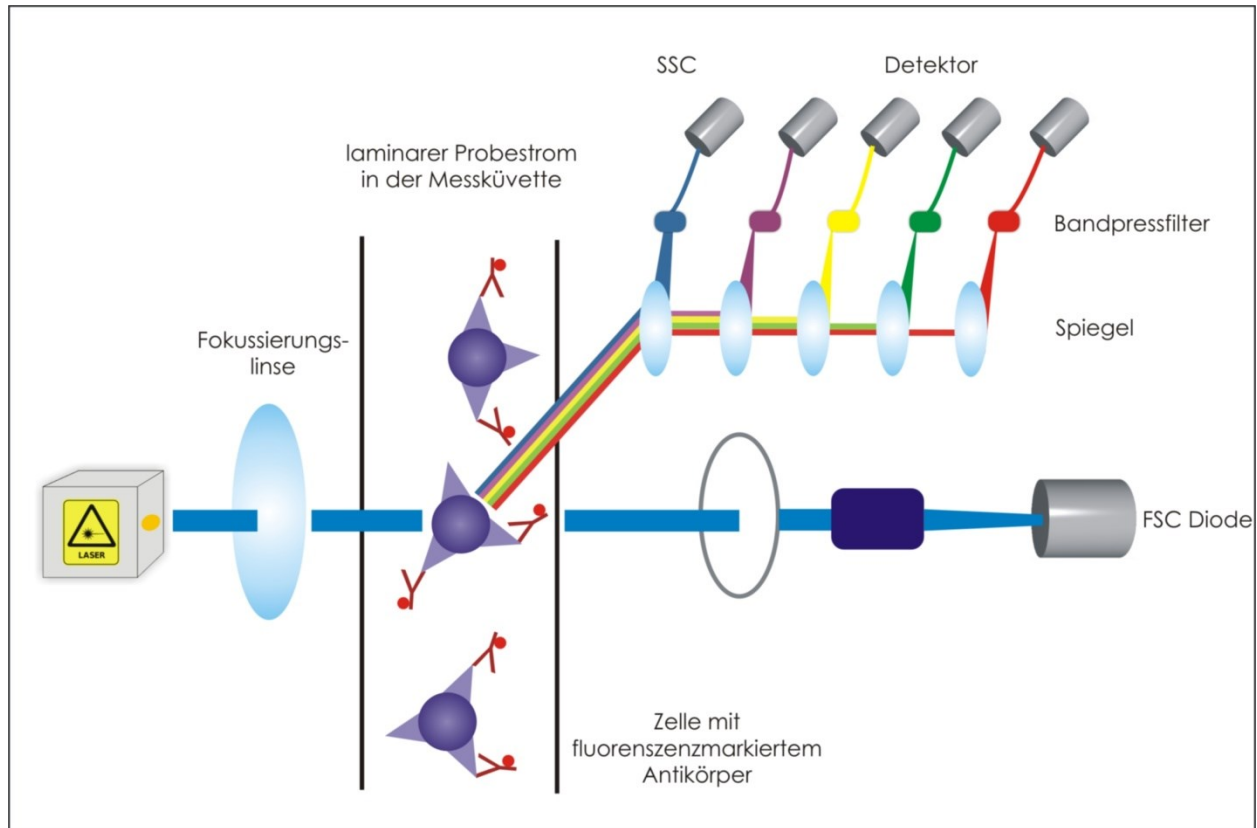


Abbildung 17: Das Optische System eines Durchflusszytometers.

Ein Laser sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge aus (z.B. 488nm). Nach Fokussierung trifft es in einer Messküvette auf den Probestrom, wird gestreut und reflektiert. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht verschiedener Wellenlänge. Ein System aus verschiedenen Spiegeln und Filtern trennt die abgehende Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen. Der jeweilige Anteil wird über Detektoren registriert. Die Größe der Partikel (FSC-Diode), deren Granularität (SSC) sowie bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können mit dem hier dargestellten Setup bestimmt werden.

2.11.3 Durchführung

Die Durchflusszytometrie erfolgte im Immunologischen Labor der Abt. für Pneumologie. Das entnommene EDTA-Blut und die aufbereiteten BALF-Zellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern [siehe Tabelle 4] für 20 min. inkubiert (5 µl Antikörper - Lösung pro 50 µl Zellsuspension). Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml FACS Lysing Solution für 10 min. mit nachfolgender Zentrifugation der Zellen über einen Zeitraum von 5 min.

(420 x g, Raumtemperatur). Nach dem Verwerfen des Überstands erfolgte eine Waschung: Zugabe von 1 ml Antikörper – Verdünnungslösung, mit nachfolgender Zentrifugation der Zellen über einen Zeitraum von 5 min. (420 x g, Raumtemperatur). Schließlich wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Die resultierende Lösung wurde dann mittels 4-Farben-Durchflusszytometer gemessen.

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie.

	Antigen	Farbstoff	Klon	Hersteller
Lineage Cocktail	CD3	FITC	SK7	BD Biosciences
	CD14	FITC	MφP9	BD Biosciences
	CD16	FITC	3G8	BD Biosciences
	CD19	FITC	SJ25C1	BD Biosciences
	CD20	FITC	L27	BD Biosciences
	CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences
Andere Antikörper	HLA-DR	PerCP	NA1/34	BD Biosciences
	Maus IgG 1	PE	S-HCL-3	BD Biosciences
	Maus IgG 1	APC	DCGM4	BD Biosciences
	Maus IgG2a	XPE	L243	BD Biosciences
	Maus IgG2a	APC	AD5-8E7	BD Biosciences
	CD1a	PE	AD5-14H12	Dako
	CD11c	PE	AD5-17F6	BD Biosciences
	CD11c	APC	HI149	BD Biosciences
	CD40	APC	S-HCL-3	Invitrogen
	CD80	APC	MEM-233	ImmunoTools
	CD83	APC	HB15e	BD Biosciences
	CD86	APC	BU63	BD Biosciences
	CD123	PE	2D7	BD Biosciences
	CD207/Langerin	PE	150503	Beckman Coulter
	BDCA-1	APC	19.2	Miltenyi
	BDCA-3	APC	DCN46	Miltenyi
	BDCA-4	APC		Miltenyi
	CCR5/CD195	APC		BD Biosciences
	CCR6	APC		R+D Systems
	CCR7	APC		R+D Systems
	CXCR3/CD183	APC		BD Biosciences
	CXCR4/CD184	APC		BD Biosciences

2.11.4 Analyse der Zellen

Zunächst wurden mittels SSC-FSC-Darstellung alle Zellen der Lösung dargestellt und alle Zellen in ein sogenanntes „Gate“ eingegrenzt **[siehe linke Spalte in Abbildung 18]**. Da DCs sich dadurch auszeichnen, dass bei ihnen die Oberflächenmarker CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 (sogenannte „Lineage Marker“ für T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen, Monozyten und Granulozyten) kaum oder gar nicht detektiert werden können, konnten mittels eines handelsüblichen „Lineage Cocktails“ **[siehe Tabelle 4]** zunächst die Zellen mit geringer oder fehlender Expression der Lineage Marker (sogenannte $\text{lin}^{\text{neg/dim}}$ Zellen) abgegrenzt werden **[siehe mittlere Spalte in Abbildung 18]**. In der Population der $\text{lin}^{\text{neg/dim}}$ Zellen konnten dann durch die Marker HLA-DR und CD11c die myeloiden DCs (mDCs) identifiziert werden. Die mDCs zeichnen sich durch eine starke Expression sowohl von HLA-DR als auch CD11c aus und sind daher im rechten oberen Quadranten eingrenzbar und analysierbar **[siehe rechte Spalte in Abbildung 18]**.

Die Quantifizierung der Expression der Oberflächenmarker (entweder in % der positiven mDCs oder als mediane Fluoreszenzaktivität, MFI) erfolgte anhand von Histogramm-Plots, bei denen die Fluoreszenzintensität von Kontroll-Antikörpern mit der Fluoreszenzintensität von spezifischen Antikörpern (gegen die ausgewählten Oberflächenmarker) miteinander verglichen wurde ⁷¹.

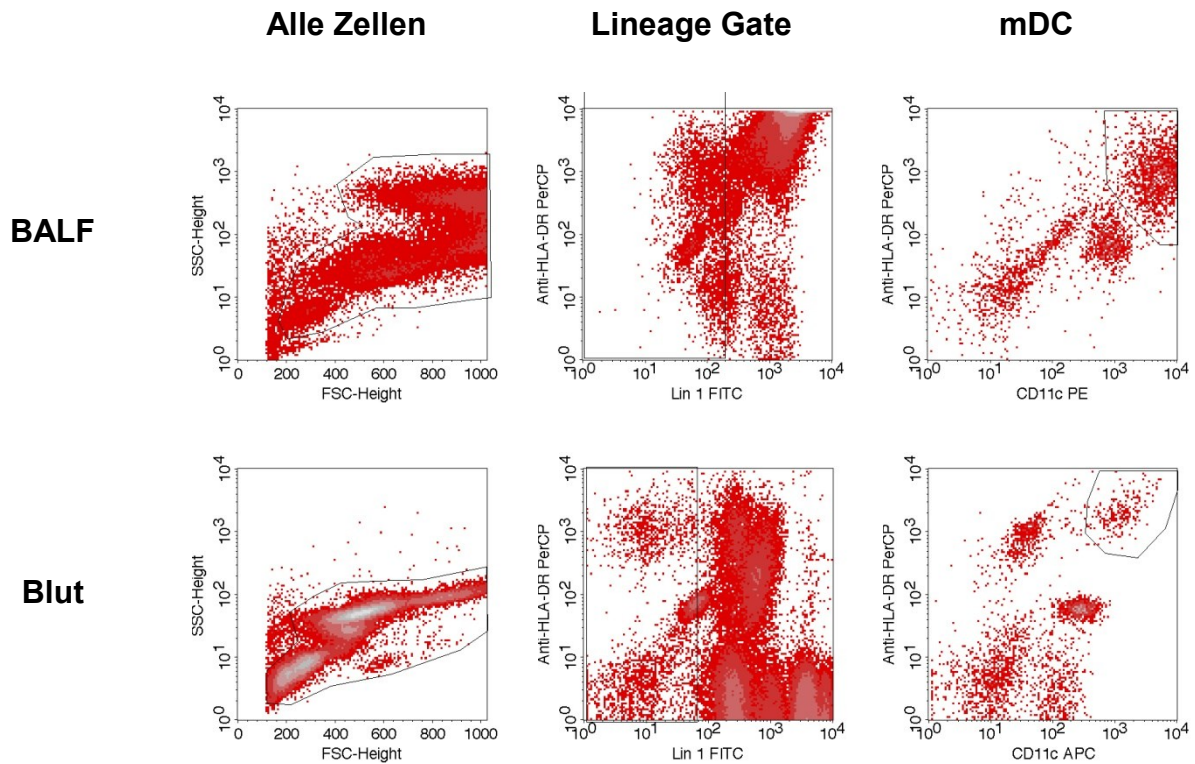


Abbildung 18: Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Parameter.

2.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 20.0.0 SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Fast alle Parameter waren nicht normal verteilt (nach Kolmogorov-Smirnov), daher erfolgte die Darstellung der Parameter mittels der Medianwerte (Minimum-Maximum). Unterschiede in den Ausgangswerten zwischen den drei Studienarmen wurden mittels Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben untersucht. Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten (A und B) in den Studienarmen wurden mittels des Wilcoxon Tests für abhängige Stichproben bei nicht-normal verteilten Daten (Wilcoxon signed ranks test) untersucht. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Als graphische Darstellung wurde der Box-Whisker-Plot gewählt um einen möglichst übersichtlichen Eindruck über die Lage der Daten zu vermitteln. Dabei entsprechen die mittleren 50% der Daten dem Bereich der Box, welche durch das untere Quartil und das obere Quartil begrenzt wird. Die Ausdehnung der Box wird

somit auch als Interquartilsabstand beschrieben. Die schwarze Linie innerhalb der Box zeigt den Median zu den jeweiligen Zeitpunkten A und B für die einzelnen Studienmedikationen an (schwarze Punkte am Rand). Auf der vertikalen Verbindungslinie befinden sich die Daten, die weniger als 1,5 Interquartilsabstände vom oberen Quartil nach oben bzw. vom unteren Quartil nach unten entfernt liegen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Während der Durchführung der klinischen Studie im Zeitraum von April 2009 bis Juli 2009 wurden insgesamt 45 Probanden, welche die Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, eingeschlossen. Die Studienteilnehmer wurden durch öffentliche Aushänge und Zeitungsanzeigen auf die Studie aufmerksam gemacht und stammen aus dem Kreis Rostock und Umgebung.

Die teilnehmenden Probanden wurden mittels Randomisierung, vollzogen durch den verantwortlichen Biometriker Prof. Dr. Günther Kundt, gleichmäßig auf die drei Studienpopulationen verteilt. Mit der zusätzlich durchgeführten Verblindung wurde eine optimale Grundlage für die Vergleichbarkeit der Studiengruppen geschaffen.

Für 3 Teilnehmer musste die Studie aufgrund von leichten Nebenwirkungen und Non-Compliance abgebrochen werden. Daraus ergab sich eine Anzahl von 14 Probanden in jeder Studienpopulation [**Abbildung 19**]. Hinsichtlich der Körpergröße, des Körpergewichts, der Pack Years und der pro Tag gerauchten Zigaretten fanden sich im Vergleich der drei Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede [**siehe Tabelle 5**].

Bezüglich Blutdruck, Puls, Temperatur, Sauerstoffsättigung und Atemfrequenz fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen [**siehe Tabelle 5**]. Das Alter der Probanden zwischen der Fluticason-Gruppe und Fluticason+Salmeterol-Gruppe ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,034$).

Nach der 4-wöchigen Inhalationsperiode ergab die Analyse der Dosiszähler der Disci, dass die Probanden einen Median von 55 (98%) der 56 Dosen inhaliert hatten, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen.

Fünf Studienteilnehmer nahmen regelmäßig Medikamente zur Senkung des Blutdruckes ein [**siehe Tabelle 6**]. Drei Probanden litten an Adipositas, einer an großen Tonsillen und einer wies Exantheme an den Füßen auf [**siehe Tabelle 6**].

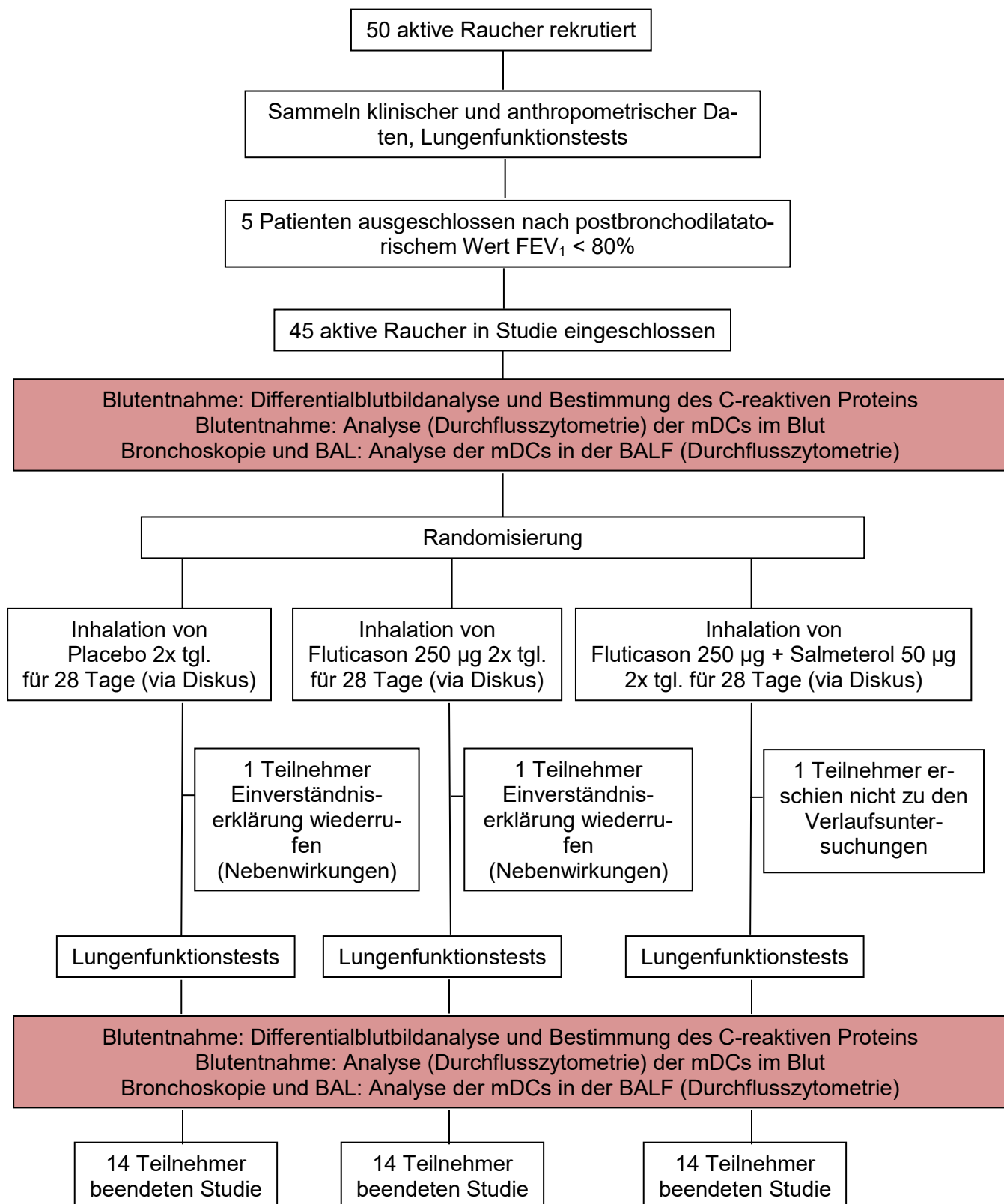
**Abbildung 19:** Der Studienablauf.

Tabelle 5: Klinische und anamnestische Daten der Probanden: Median (Min. - Max.).

	Parameter		Placebo	Flutide®	Viani®
Allgemein	Anzahl der Probanden		14	14	14
	Alter (Jahre)		45 (30 - 61)	35 (30 - 55)	44 (34 - 60)
	Körpergröße (cm)		179 (166 - 188)	180 (168 - 190)	179 (164 - 183)
	Gewicht		76 (60 - 103)	83 (60 - 108)	79 (60 - 120)
	Pack Years		30 (7.5 - 70)	23 (11.3 - 61.5)	25 (7.5 - 77.5)
	Zigaretten / Tag		17 (10 - 30)	19 (12 - 30)	17 (10 - 50)
Vitale Parameter	Zeitpunkt A	Blutdruck	130/90 (110/70 - 170/110)	135/90 (120/80 - 180/110)	140/90 (120/80 - 180/110)
		Puls	73 (51 - 87)	70 (63 - 91)	70 (52 - 94)
		Temperatur (C°)	35.7 (34.7 - 36.4)	35.4 (34.0 - 36.2)	35.7 (34.9 - 36.4)
		Sauerstoffsättigung (%)	97.5 (96 - 99)	97 (96 - 100)	97.5 (96.0 - 100)
		Atemfrequenz (min ⁻¹)	14 (14 - 18)	15 (14 - 16)	16 (14 - 16)
	Zeitpunkt B	Blutdruck	130/90 (110/70 - 155/100)	135/90 (120/80 - 180/110)	135/90 (120/80 - 180/110)
		Puls	71 (59 - 99)	70 (63 - 91)	70 (63 - 91)
		Temperatur (C°)	35.4 (34.8 - 36.0)	35.4 (34.0 - 36.2)	35.4 (34.0 - 36.2)
		Sauerstoffsättigung (%)	97 (94 - 99)	97 (96 - 100)	97 (96 - 100)
		Atemfrequenz (min ⁻¹)	15 (14 - 17)	15 (14 - 16)	15 (14 - 16)

Tabelle 6: Dauermedikation, Diagnosen und klinische Auffälligkeiten der Probanden.

Patientennummer	Medikamente	Diagnosen	Klinische Auffälligkeiten
1	-	-	-
2	-	-	-
3	Delix®, Bisolich comp	Hypertonus	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	Große Tonsillen
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	Adipositas
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	Beloc-Zok® Herz	Hypertonus	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	Adipositas
30	-	-	-
31	-	-	Adipositas
32	-	-	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	Exanthem an Füßen bds.
39	-	-	-
40	Delix®, Aspirin® protect, Baymycard®, Sulpirid®	Hypertonus	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	Beloc®	Hypertonus	-
45	Bisoprolol dura®	Hypertonus	-

3.2 Charakterisierung der Lungenfunktion

Tabelle 7 beinhaltet die Daten der Bodyplethysmographie zu den jeweiligen Zeitpunkten A und B. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen sowie zwischen den Zeitpunkten A und B gefunden werden.

Tabelle 7: Lungenfunktion zu den Zeitpunkten A und B.

VC IN = inspiratorische Vitalkapazität, FVC = forcierte Vitalkapazität, FEV₁ = Menge an Luft, die in der ersten Sekunde bei forcierter Expiration ausgeatmet wird, FEV₁/FVC= Tiffeneau-Index, MEF 25 = maximaler expiratorischer flow bei 25% der VC, RV = Residualvolumen, TLC = totale Lungenkapazität.

		Parameter	Placebo	Flutide®	Viani®
Lungenfunktion	Zeitpunkt A	VC IN (% / Soll)	96.8 (42.8 - 124)	99.7 (79.2 - 121.8)	91.2 (77.4 - 119.5)
		FVC (% / Soll)	103.3 (88.6 - 121.1)	97.7 (80.3 - 119.6)	97.1 (80.9 - 125.9)
		FEV ₁ (% / Soll)	93.9 (82.3 - 110.3)	91 (80.2 - 123.6)	90 (80 - 120.5)
		FEV ₁ / FVC (%)	74.1 (65 - 81.4)	79.9 (66.2 - 89.8)	76.1 (70.1 - 84.9)
		MEF 25 (%)	47.5 (26.3 - 97.3)	57.4 (16.1 - 137.9)	44.2 (29.3 - 102.3)
		RV (% / Soll)	113.2 (65.6 - 147.4)	87.8 (13.5 - 106.9)	92.5 (62.3 - 136.7)
		TLC (% / Soll)	103.9 (84.5 - 130.8)	95.4 (55.7 - 114)	95 (87.8 - 114.6)
		RV / TLC (% / Soll)	106.4 (74.9 - 119.9)	89.9 (58.3 - 116.9)	90.6 (59.3 - 125)
	Zeitpunkt B	VC IN (% / Soll)	98.3 (89.1 - 121.6)	95.7 (72.9 - 118.5)	94 (81.3 - 123.4)
		FVC (% / Soll)	100.3 (83.3 - 122.3)	99.3 (79.5 - 114.5)	96.7 (83.5 - 128.7)
		FEV ₁ (% / Soll)	92.8 (71.7 - 107.1)	87.6 (80.7 - 116.6)	90.9 (81.6 - 123.5)
		FEV ₁ / FVC (%)	74.2 (66.2 - 85)	77.7 (65.9 - 86.8)	76.5 (71.2 - 86.6)
		MEF 25 (%)	41.9 (15.9 - 92.8)	46.6 (11.9 - 122.9)	43.5 (33.1 - 128.1)
		RV (% / Soll)	107.5 (83.3 - 163.7)	95.4 (11.3 - 151.5)	93.8 (63.1 - 123.8)
		TLC (% / Soll)	98.1 (91.7 - 134)	99.8 (75.2 - 112.3)	97.5 (84.2 - 123.1)
		RV / TLC (% / Soll)	100.7 (78.9 - 121.6)	87.6 (68.7 - 128.3)	96 (55.8 - 114.4)

3.3 Differenzierung der BALF

Die nachfolgende **Tabelle 8** zeigt die erhobenen Daten aus der BALF zum Zeitpunkt A und Zeitpunkt B (vor und nach der Behandlung). Dabei ist zu erkennen, dass das Volumen der Proben (Recovery) zwischen den drei Studienpopulationen keinen signifikanten Unterschied aufweist. Hinsichtlich der Anzahl von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen in der BALF gab es keine signifikante Veränderung vor und nach Behandlung in der Placebo- und Fluticason-Studiengruppe [**siehe Tabelle 8**]. In der Studiengruppe, die mit Viani® (Fluticason+Salmeterol) behandelt wurden, konnte ein signifikanter Abfall der Gesamtleukozytenzahl ($p=0,038$), der absoluten Anzahl an Makrophagen ($p=0,035$) und neutrophilen Granulozyten ($p=0,022$) nachgewiesen werden. Die Anzahl der Eosinophilen und Lymphozyten der Fluticason+Salmeterol-Studiengruppe hingegen wies keine signifikanten Unterschiede vor und nach Behandlung auf [**siehe Tabelle 8, Abbildung 20, Abbildung 21**].

Tabelle 8: Charakteristika der gewonnenen BALF.

Median (Min.-Max.) Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Zeitpunkten sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

		Parameter	Placebo	Flutide®	Viani®
BALF	Zeitpunkt A	Recovery (ml)	62 (45 - 67)	63 (56 - 70)	62 (55 - 65)
		Zellen (10 ³ /ml BALF)	121 (17 - 487)	81 (38 - 284)	125 (36 - 409)
		Makrophagen (10 ³ /ml BALF)	114 (15 - 447)	75 (32 - 263)	119 (32 - 397)
		Lymphozyten (10 ³ /ml BALF)	7.2 (0.5 - 34.1)	2.7 (0.6 - 13.1)	3.0 (1.0 - 39.1)
		Neutrophile (10 ³ /ml BALF)	2.1 (0.3 - 12.0)	1.6 (0.6 - 5.1)	2.9 (0.1 - 5.4)
		Eosinophile (10 ³ /ml BALF)	0.4 (0.0 - 5.1)	0.5 (0.0 - 2.8)	0.1 (0.0 - 3.0)
	Zeitpunkt B	Recovery (ml)	64 (48 - 71)	65 (37 - 72)	62 (54 - 70)
		Zellen (10 ³ /ml BALF)	190 (35 - 469)	93 (6 - 217)	97 * (25 - 339)
		Makrophagen (10 ³ /ml BALF)	181 (34 - 459)	86 (5 - 205)	88 * (22 - 315)
		Lymphozyten (10 ³ /ml BALF)	5.6 (0.7 - 28.2)	4.1 (0.6 - 7.8)	3.2 (0.7 - 14.2)
		Neutrophile (10 ³ /ml BALF)	1.4 (0.0 - 5.0)	1.2 (0.2 - 6.1)	0.7 * (0.0 - 6.1)
		Eosinophile (10 ³ /ml BALF)	0.3 (0.0 - 4.2)	0.2 (0.0 - 1.2)	0.2 (0.0 - 3.4)

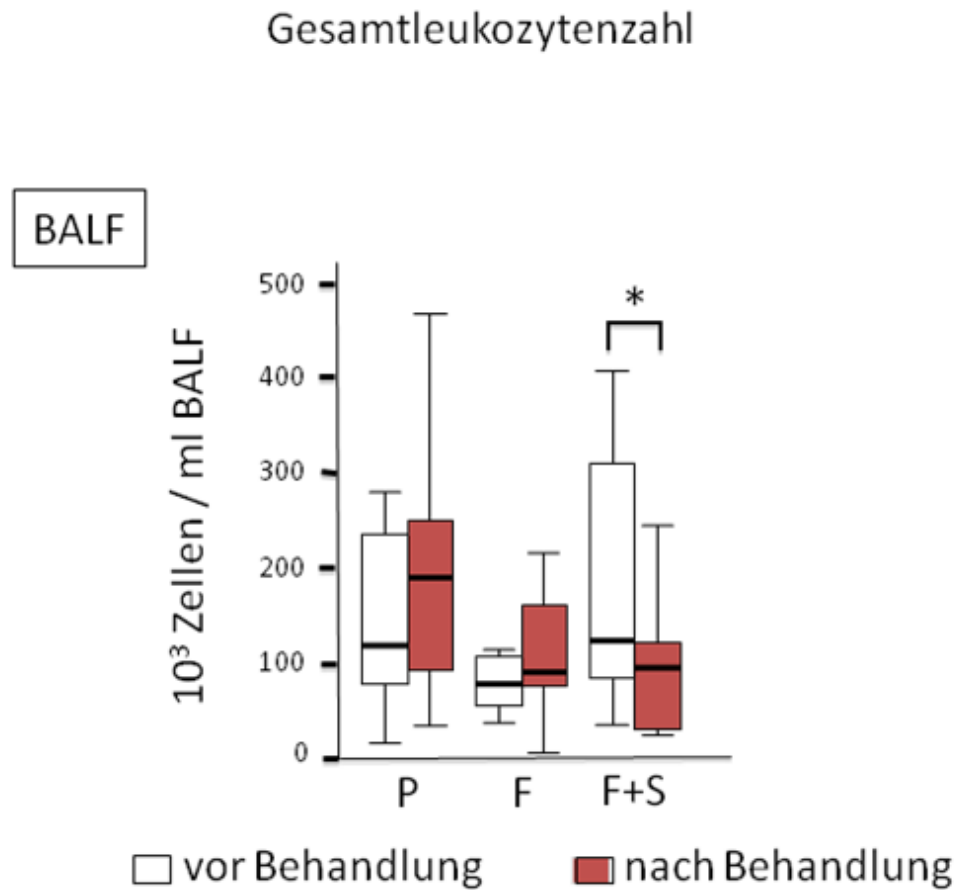


Abbildung 20: Vergleich der Gesamtleukozytenzahl in der BALF vor und nach Behandlung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) vor und nach der Behandlung sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

BALF-Differenzierung

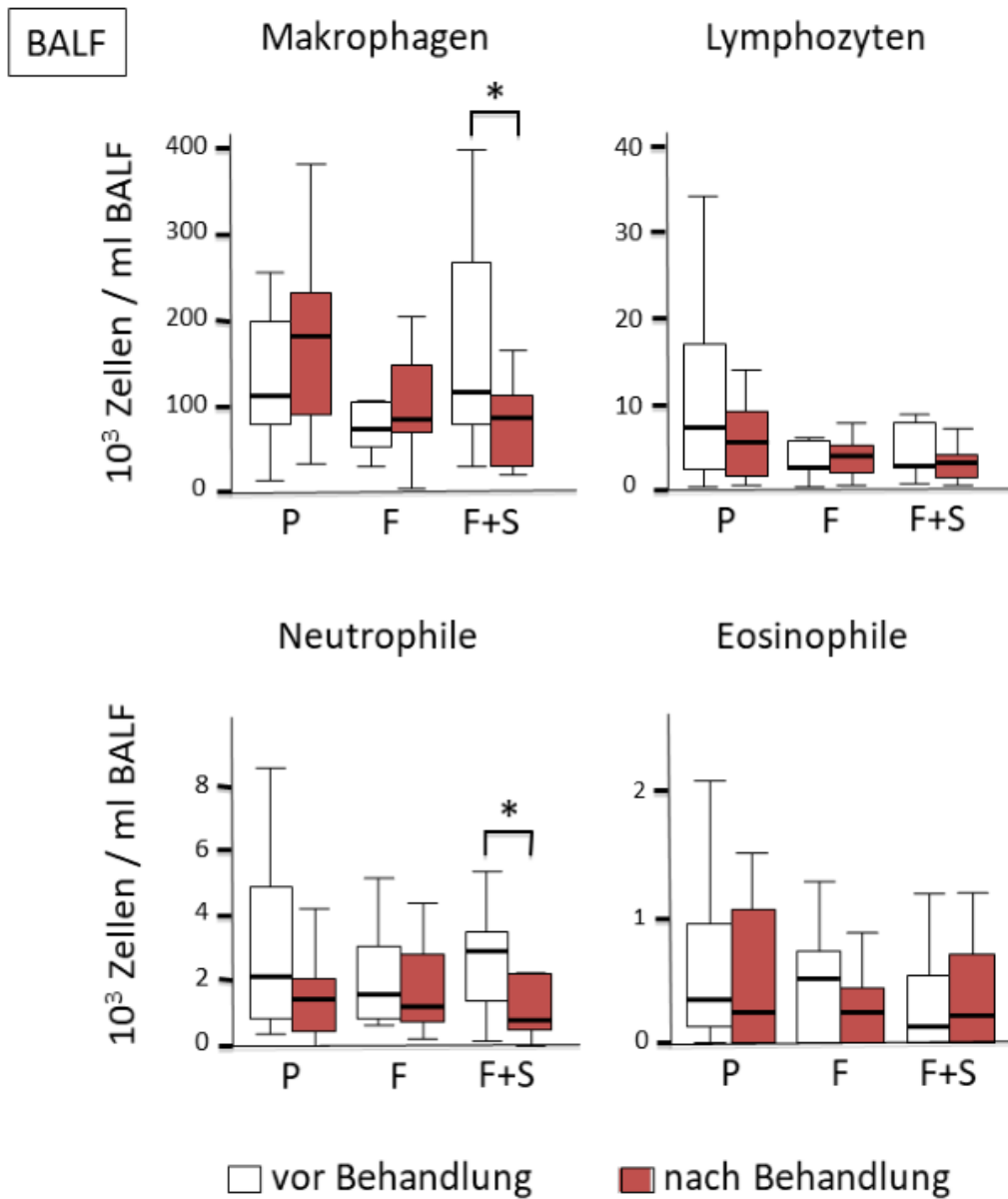


Abbildung 21: Vergleich der verschiedenen Leukozytenuntergruppen in der BALF. In den einzelnen Studiengruppen zeigten sich vor und nach der Behandlung signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), welche mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet sind. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason-Salmeterol-Gruppe.

3.4 Blut-Parameter

In **Tabelle 9** sind die Blut-Parameter der Probanden zum Zeitpunkt A und Zeitpunkt B (vor und nach der Behandlung) mit dem jeweiligen Medikament der einzelnen Studiengruppen dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zeitpunkten in den drei Studiengruppen festgestellt werden [**Tabelle 9**, **Abbildung 22**, **Abbildung 23**]. Die Gesamtleukozytenzahl vor und nach der Behandlung weist ebenso wie die Anzahl der Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Blut keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Studiengruppen auf [**Abbildung 22**, **Abbildung 23**].

Tabelle 9: Charakteristika der gewonnen Blutproben.

		Parameter	Placebo	Flutide®	Viani®
Blut	Zeitpunkt A	Hämoglobin (mmol / l)	9.1 (8 - 9.8)	9.5 (8.1 - 10.5)	9.4 (8.5 - 10.8)
		Thrombozyten (10 ⁶ / ml)	234 (146 - 338)	211 (176 - 391)	204 (142 - 320)
		Leukozyten (10 ⁶ / ml)	6.7 (5.4 - 9.8)	7 (3.5 - 9)	7.24 (4.61 - 13.1)
		Monozyten (%)	8.9 (6 - 10.6)	9.2 (6.4 - 13)	7.15 (4 - 12.4)
		Lymphozyten (%)	32.7 (16.6 - 47.5)	32.9 (23.3 - 40.4)	24.9 (10.3 - 37.2)
		Neutrophile (%)	56.6 (39.1 - 72.6)	54.7 (47.1 - 65.2)	63.95 (6 - 81.1)
		Eosinophile (%)	2.2 (0.4 - 11)	3.2 (1.3 - 4.9)	2.35 (0.4 - 7.4)
		CRP	1.3 (1 - 12.3)	2 (1 - 9.4)	1.98 (1 - 7.58)
		Natrium (mmol / l)	139 (136 - 142)	139 (135 - 142)	141 (134 - 144)
		Kalium (mmol / l)	3.9 (3.2 - 5.5)	3.9 (3.5 - 4.2)	3.9 (4.3 - 4.2)
	Zeitpunkt B	Hämoglobin (mmol / l)	9.1 (8.6 - 9.9)	9.3 (5.4 - 10.5)	9.25 (8.6 - 10.2)
		Thrombozyten (10 ⁶ / ml)	238 (157 - 341)	218 (178 - 312)	216 (147 - 341)
		Leukozyten (10 ⁶ / ml)	6.3 (4.7 - 13.9)	6.7 (4.6 - 16.1)	7.2 (3.74 - 11.5)
		Monozyten (%)	8.9 (6 - 14)	8.3 (6.2 - 13.8)	7.7 (5 - 11)
		Lymphozyten (%)	29.1 (22 - 44.1)	33.3 (25 - 39.7)	27.6 (15 - 38.6)
		Neutrophile (%)	54.8 (41.9 - 69)	54.5 (46.3 - 62)	61.8 (47.8 - 71)
		Eosinophile (%)	2.9 (1.1 - 9.9)	2.8 (1.1 - 6.3)	1.95 (0.9 - 6.2)
		CRP	1.6 (1 - 5.3)	2 (1 - 9.5)	1 (1 - 11.9)
		Natrium (mmol / l)	140 (136 - 145)	139 (136 - 141)	138.5 (134 - 141)
		Kalium (mmol / l)	3.9 (3.4 - 4.3)	4 (3.6 - 4.5)	3.9 (3.4 - 4.9)

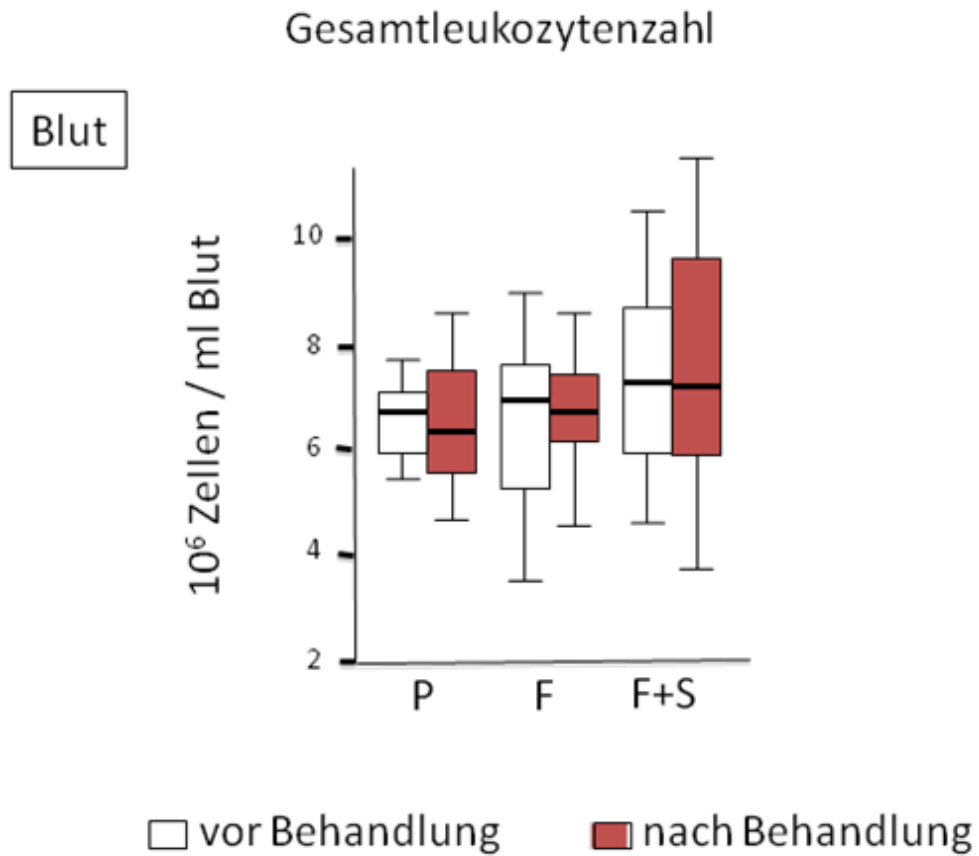


Abbildung 22: Gesamtleukozytenzahl im Blut vor und nach der Behandlung.

Es befinden sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Leukozyten vor und nach der Behandlung. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

Differentialblutbild

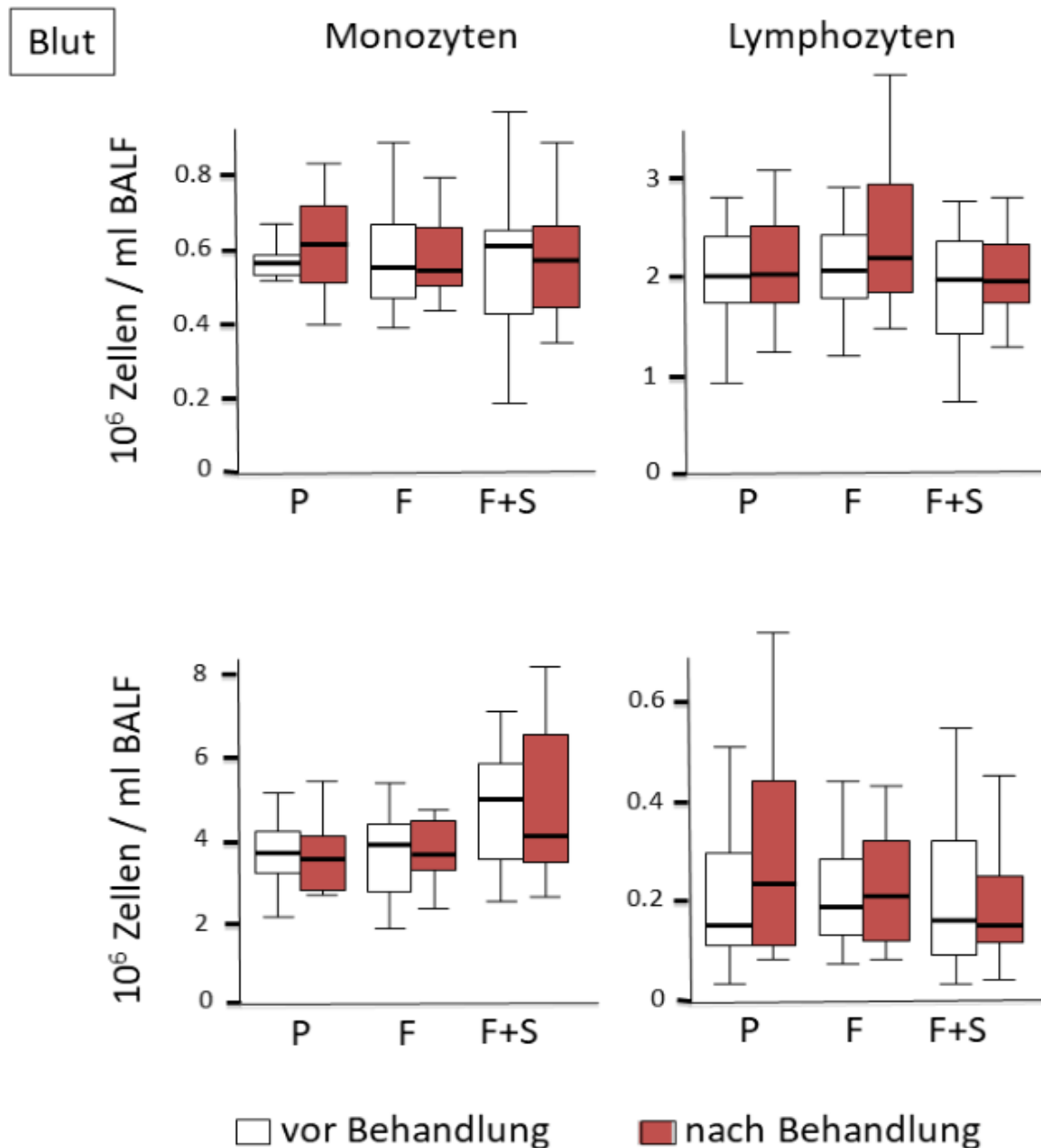


Abbildung 23: Vergleich der verschiedenen Leukozytenuntergruppen im Blut.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Blut vor und nach der Behandlung zwischen den jeweiligen Studiengruppen. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

3.5 Anzahl der mDCs in der BALF und im Blut

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Anzahl der mDCs in der BALF und im Blut zum Zeitpunkt A und Zeitpunkt B in den jeweiligen Studiengruppen. Dabei konnte ein hochsignifikanter Unterschied mit $p = 0,009$ im Vergleich der absoluten Anzahl der mDCs in der BALF der Fluticason+Salmeterol-Studiengruppe vor und nach Behandlung festgestellt werden. In der Placebo- und Fluticason-Gruppe ließ sich diesbezüglich keine Signifikanz nachweisen. Im Blut fanden sich in allen drei Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der mDCs zu den jeweiligen Zeitpunkten A und B [**siehe Tabelle 10, Abbildung 24**].

Beim Vergleich der absoluten und prozentualen Anzahl der mDCs in der BALF und im Blut zwischen der Placebo-Gruppe und der gemeinsamen Gruppe aller mit Fluticason behandelten Probanden fanden sich keine signifikanten Unterschiede [**siehe Abbildung 25**].

Tabelle 10: mDCs in der BALF und im Blut.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Zeitpunkten A und B sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

		Parameter	Placebo	Flutide®	Viani®
BALF	Zeitpunkt A	mDC ($10^3/\text{ml}$)	1.035 (0.12 - 3,67)	0.635 (0.26 - 1.51)	1.08 (0.25 - 2.86)
		mDC (%)	0.8 (0.43 - 1.3)	0.755 (0.39 - 1.37)	0.755 (0.46 - 1.8)
	Zeitpunkt B	mDC ($10^3/\text{ml}$)	1.165 (0.21 - 5.09)	0.75 (0.05 - 1.0)	0.81785 (0.16 - 2.41)
		mDC (%)	0.785 (0.35 - 1.45)	0.69 (0.34 - 1.58)	0.965 * (0.37 - 1.69)
Blut	Zeitpunkt A	mDC ($10^3/\text{ml}$)	9.8515 (6.516 - 20.755)	11.521 (0 - 23.56)	8.0475 (4.155 - 16.454)
		mDC (%)	0.155 (0.11 - 0.35)	0.17 (0 - 0.31)	0.115 (0.04 - 0.22)
	Zeitpunkt B	mDC ($10^3/\text{ml}$)	12.99 (5.751 - 22.36)	12.8695 (3.976 - 23.808)	8.946 (4.779 - 13.585)
		mDC (%)	0.185 (0.09 - 0.37)	0.17 (0.08 - 0.32)	0.105 (0.06 - 0.25)

Myeloide DCs

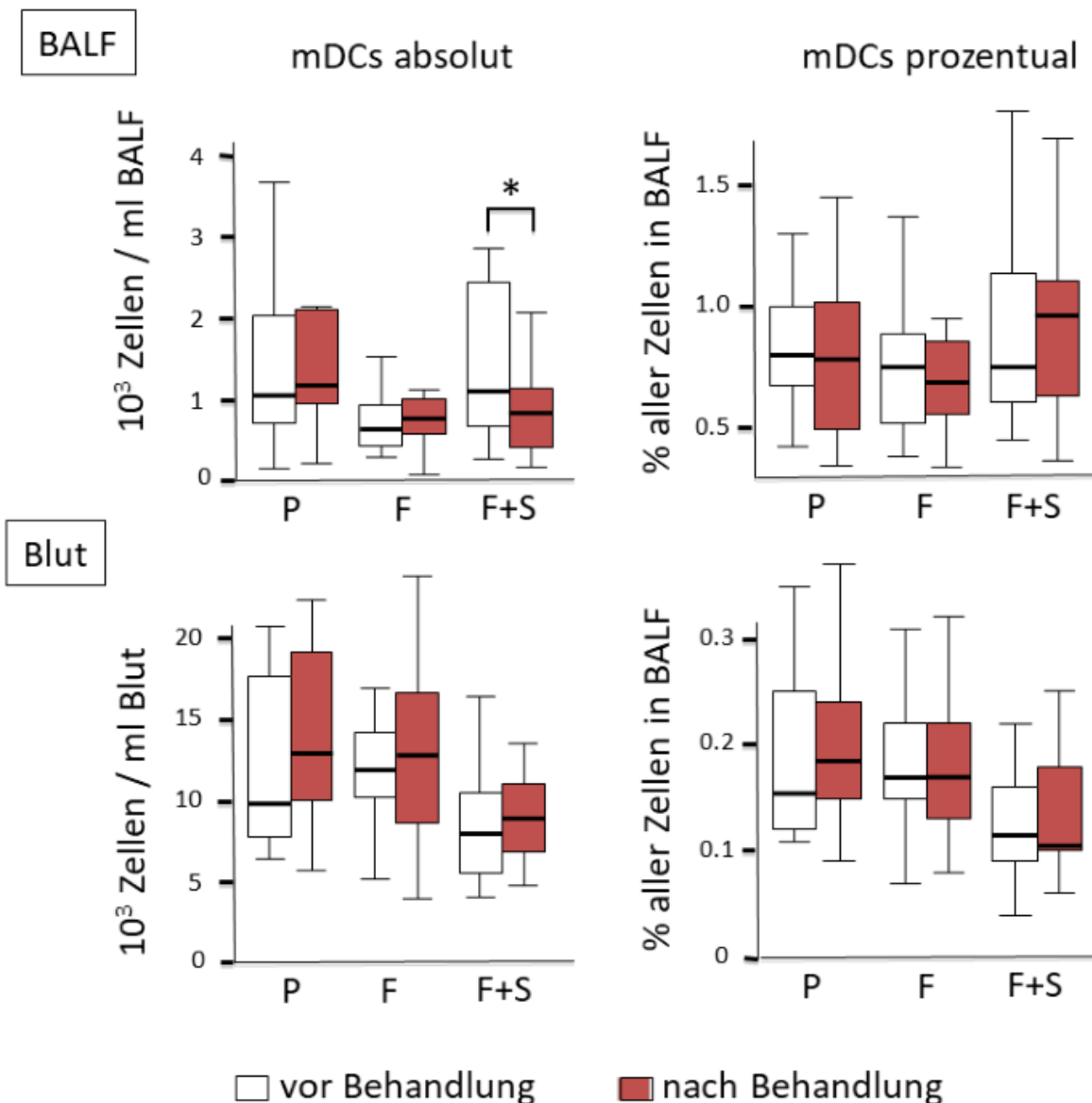


Abbildung 24: Anzahl der mDCs in der BALF und im Blut für die einzelnen Studiengruppen. In den einzelnen Studiengruppen zeigten sich vor und nach der Behandlung signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), welche mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet sind. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason-Salmeterol-Gruppe.

Myeloide DCs: Placebo vs. Fluticason alle

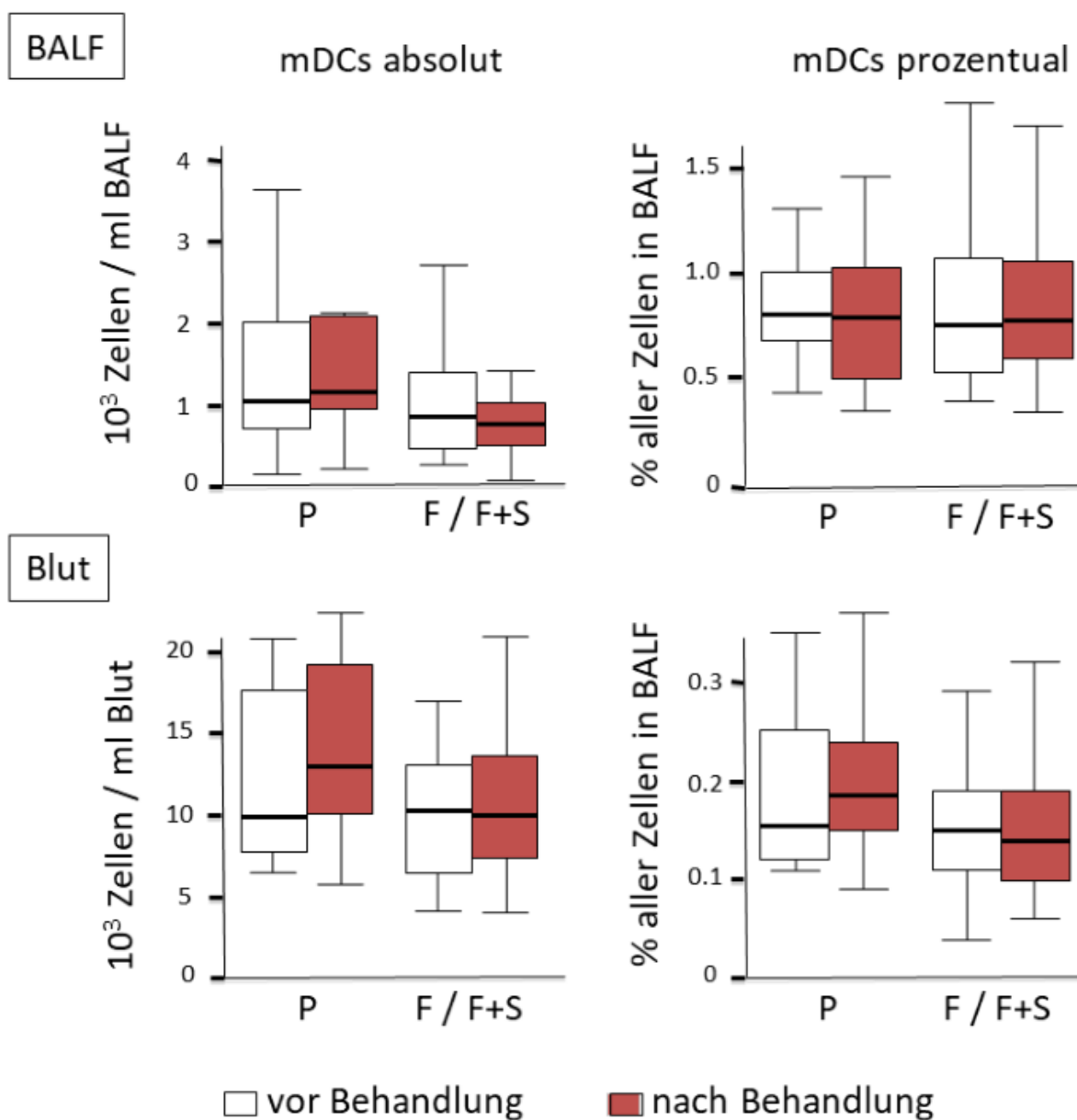


Abbildung 25: Vergleich der Anzahl der mDCs zwischen der Placebo-Gruppe (P) und der gemeinsamen Gruppe aller mit Fluticason behandelten Probanden (F/F+S). Es befinden sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der mDCs zwischen den beiden Populationen vor und nach der Behandlung. P = Placebo-Gruppe, F = Fluticason-Gruppe, F+S = Fluticason+Salmeterol-Gruppe.

3.6 Oberflächenmarker der myeloiden DCs

Bei der Auswertung der Expression der verschiedenen charakteristischen Oberflächenmarker der mDCs ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Zeitpunkt A und Zeitpunkt B in den jeweiligen Studiengruppen [**siehe Tabelle 11**].

Tabelle 11: Oberflächenmarker auf mDCs

	Placebo		Fluticasone		Fluticasone/Salmeterol	
Zeitpunkt	A	B	A	B	A	B
n	14	14	14	14	14	14
BDCA-1 [%]	89 (58 - 94)	89 (60 - 94)	88 (59 - 91)	85 (71 - 94)	89 (67 - 94)	88 (46 - 94)
BDCA-3 [%]	73 (38 - 91)	74 (42 - 90)	71 (44 - 92)	68 (43 - 91)	63 (24 - 90)	56 (29 - 78)
BDCA-4 [%]	51 (21 - 89)	46 (29 - 80)	43 (11 - 69)	51 (10 - 79)	47 (16 - 79)	41 (19 - 81)
CD40 [MFI]	1620 (1189 - 3091)	1733 (1238 - 3005)	1676 (865 - 2482)	1887 (1149 - 2430)	1603 (1173 - 2832)	1382 (919 - 3289)
CD80 [%]	73 (44 - 85)	65 (36 - 80)	63 (35 - 76)	63 (42 - 79)	60 (43 - 81)	58 (39 - 84)
CD83 [%]	17 (6 - 29)	14 (6 - 24)	13 (9 - 23)	14 (5 - 32)	13 (8 - 31)	12 (8 - 22)
CD86 [%]	75 (54 - 96)	68 (53 - 92)	61 (39 - 94)	65 (40 - 91)	68 (30 - 88)	59 (37 - 93)
CCR5 [%]	26 (6 - 56)	23 (3 - 48)	13 (0 - 61)	15 (2 - 45)	17 (1 - 44)	17 (0 - 44)
Langerin [%]	67 (33 - 76)	64 (33 - 82)	61 (44 - 75)	62 (41 - 73)	61 (41 - 76)	60 (33 - 75)
CD1a [%]	84 (44 - 87)	80 (42 - 90)	73 (58 - 85)	76 (65 - 83)	74 (47 - 91)	77 (48 - 91)

4 Diskussion

Myeloide DCs sind entscheidende Akteure in der Initiierung und Aufrechterhaltung von entzündlichen Lungenerkrankungen, die in Verbindung mit Tabakrauch stehen. Da insbesondere die mDCs zur Antigenaufnahme und -präsentation befähigt sind, sind sie nach aktuellem Wissensstand die potentesten Auslöser einer antigenspezifischen Immunantwort. Es sind die einzigen Zellen im Atemwegsepithel, die MHC Klasse II-Moleküle exprimieren. In Abhängigkeit ihres Reifezustandes können sie verschiedene Chemokine und Zytokine produzieren sowie unterschiedliche Oberflächenmoleküle exprimieren ^{60, 61, 95}.

Bereits ältere Studien postulieren eine erhöhte Anzahl einer Subpopulation der mDCs, welche durch die Expression von CD1a und Langerin gekennzeichnet ist, sog. Langerhans-Zellen, in der BALF und im Lungenparenchym von Rauchern und COPD-Patienten ^{80, 96, 97}. Weiterhin konnte ein Anstieg Langerin-positiver Zellen in den Atemwegen von COPD-Patienten im Vergleich zu Rauchern ohne COPD und Nichtrauchern nachgewiesen werden. Dabei steigt die Anzahl der mDCs im Epithel und Adventitia mit der Schwere der COPD-Erkrankung ⁹⁸.

Als eine der ersten Studien lieferte Bratke et al. Daten über die Rolle und die Charakteristika der Atemwegs-mDCs von Rauchern ⁵⁸.

In der Asthma-Therapie sind ICS die Mittel der 1. Wahl, bei der Therapie der COPD, in der heute Bronchodilatoren (LAMA und LABA) eine zentrale Rolle spielen, sind sie hingegen stets umstritten. Passend dazu ist auch das bisherige Wissen über die pharmakologische Modulation der in den Atemwegen lokalisierten mDCs durch ICS bei Rauchern und Patienten mit COPD sehr gering.

Diese Studie untersuchte erstmalig den Einfluss ICS und ICS in Kombination mit LABA auf mDCs in den Atemwegen von Rauchern mit COPD im spirometrischen Stadium 0 oder 1 nach GOLD. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur eine Kombinationstherapie von dem ICS Fluticason mit dem LABA Salmeterol, nicht jedoch eine ICS-Monotherapie, die Anzahl der Atemwegs-mDCs bei Rauchern reduziert. Auffällig ist, dass weder die alleinige Inhalation von Fluticason noch eine Kombinationstherapie die Expression der Oberflächenmarker der Atemwegs-mDCs moduliert. Somit liefern die

Ergebnisse dieser Studie wichtige neue Erkenntnisse zur anhaltenden Diskussion über den Einsatz von ICS bei der Behandlung von Rauchern und Patienten mit COPD.

4.1 Methodische Stärken und Schwächen

Die vorliegende Studie weist mehrere methodische Stärken auf:

- (1) Mit der Durchführung einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie wurde das derzeit nachgewiesene beste Studiendesign gewählt. Somit wurde die Grundlage für eine möglichst hohe Aussagekraft der Ergebnisse und deren medizinische Anwendung geschaffen.
- (2) Eine weitere methodische Stärke der Studie stellt die gut validierte Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung der mDCs in der humanen BALF dar [**siehe 2.11**] ^{58, 86, 87}.
- (3) Weiterhin ergibt sich eine Stärke der Studie aus der Tatsache, dass humanes Material ex vivo aus der Lunge untersucht wurde. Die in der Forschung oft genutzten Mauslungen unterscheiden sich sowohl in der Lungen-Anatomie als auch der Immunologie deutlich vom Menschen ⁹⁹. Dass in der Studie ausschließlich Material aus humanen Atemwegen untersucht wurde, ist somit ebenfalls als methodische Stärke zu werten, da diese Daten in der Literatur fehlen.
- (4) Um einen Einfluss des unterschiedlichen Hormonhaushaltes zwischen Männern und Frauen zu minimieren, wurden für die Studie nur Männer rekrutiert ⁴.

Folgende Schwächen lassen sich auffinden:

- (1) In der BALF wurden nur endoluminale mDCs erfasst und untersucht. Somit wurde ein Großteil der DCs, die sich in der Submucosa der Atemwege befinden, in den Auswertungen nicht berücksichtigt. Es kann daher auch keine Aussage über den Einfluss der Studienmedikation auf die mDCs in der Mucosa getroffen werden ⁶.
- (2) Die Einnahme der Medikamente über einen Zeitraum von 4 Wochen war relativ kurz gewählt. Es besteht die Möglichkeit, dass bei einer Therapie über einen längeren Zeitraum (z.B. 1 Jahr) andere Effekte, beispielsweise eine Modulation der Oberflächenmarker, zu sehen wären.

- (3) Desweiteren wurden nur Raucher mit einer normalen Lungenfunktion (Grad 0 oder 1 nach GOLD) in die Studie aufgenommen. Der ursprüngliche Studienplan sah vor, Probanden mit einem höheren COPD-Grad zu rekrutieren, was voraussichtlich aussagekräftiger gewesen wäre. Jedoch wurde eine Behandlung von Patienten mit COPD (ab dem spirometrischen Stadium II) von der Ethikkommission in Rostock grundsätzlich abgelehnt. Da wir eine Placebo-Gruppe als unerlässlich für die Beurteilung der Wirkung ansahen, wurde die Entscheidung getroffen, Raucher mit normaler Lungenfunktion zu untersuchen.
- (4) Auf eine vierte Studiengruppe mit alleiniger Salmeterol-Therapie musste verzichtet werden, da der Hersteller (GlaxoSmithKline KG Co. GmbH) zum Zeitpunkt der Studie keine verblindbaren Salmeterol-Diski zur Verfügung stellen konnte.

4.2 Einfluss ICS und ICS/LABA auf die Zellpopulationen der Leukozyten in der BALF und im Blut

In unserer Studie wurden die verschiedenen Zellpopulationen vor und nach 4-wöchiger Inhalationszeit der jeweiligen Studienmedikation in der BALF und im Blut untersucht. Bei der Auswertung der BALF konnte für die Studiengruppe mit Fluticason+Salmeterol ein signifikanter Abfall der Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zur Placebo-Gruppe dokumentiert werden. Ebenso war eine Reduktion der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten unter der Kombinationstherapie zu verzeichnen. Bei alleiniger Fluticason-Inhalation war keine signifikante Zellreduktion nachweisbar.

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Leukozyten-Klassen, die jeweils ihre eigene spezifische Aufgabe bei der Immunabwehr besitzen. Der Abfall der Gesamtleukozytenzahl unter der Kombinationstherapie ICS+LABA kann als antiinflammatorische Wirkung gewertet werden.

Makrophagen sind die vorherrschenden Leukozyten in der Lunge und patrouillieren als Wächterzellen der Atemwege an der Lungenoberfläche. So sind sie in der Lage, alle inhalierten Partikel und Krankheitserreger abzufangen sowie apoptotische Zellen und andere Verunreinigungen zu entfernen ¹⁰⁰. Diese Funktion legt nahe, dass Makrophagen ein Hauptziel für inhalierbare pharmazeutische Präparate sein können. Mit der Re-

duktion der Makrophagen unter der Kombinationstherapie ICS+LABA konnten wir erstmals den in vivo Beweis am Menschen liefern, dass ausschließlich die Kombinationstherapie und nicht das ICS allein die Makrophagenanzahl bei Rauchern signifikant beeinflusst. Diese Ansicht wurde zuvor lediglich durch eine in vitro-Studie von Donnelly et al. postuliert. Dabei wurde die Zytokin-Freisetzung aus den von Makrophagen abgeleiteten Monozyten unter Einfluss von zwei LABA (Formeterol und Salmeterol) und einem ICS (Budesonid) untersucht. Es konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass LABA synergistisch und additiv mit Budesonid die Freisetzung inflammatorischer Zytokine aus den Makrophagen hemmt ¹⁰¹.

In einer weiteren in vitro-Studie konnte die durch Zigarettenrauch konzentrationsabhängige Freisetzung von Interleukin-8 aus menschlichen Monozyten durch Koinkubation von Salmeterol und Fluticason unterdrückt werden ¹⁰². Somit hat die Kombination von ICS+LABA nachweislich eine hemmende Wirkung auf den chemotaktischen Botenstoff für Neutrophile. Ergänzt wurde diese Studie durch Mortaz et al., welche die additiv suppressive Wirksamkeit der Kombinationstherapie auf Neutrophile bestätigten ¹⁰³.

Neutrophile Granulozyten, als größte Gruppe der Leukozyten im peripheren Blut, identifizieren und zerstören schädliche Mikroorganismen. Ihre Reduktion im Sputum von Patienten mit COPD konnte auch von Barnes et al. nach 13-wöchiger ICS+LABA-Therapie festgestellt werden. Jedoch war in dieser Studie keine signifikante Wirkung der Kombinationstherapie auf die Makrophagen nachweisbar ⁷². Eine Reduktion von neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen von Rauchern konnte auch in unserer Studie unter der Kombinationstherapie ICS/LABA bestätigt werden.

Diese Daten bestätigen die klinische Erfahrung, dass ICS in Kombination mit LABA, nicht jedoch eine alleinige ICS-Therapie, bei Patienten mit COPD wirksam ist. Jedoch liefert die Kombination mehrerer Wirkstoffe auch ein Potential für erhöhte Nebenwirkung. So könnte die Reduktion der Zellanzahl der oben beschriebenen Leukozytenpopulationen auch eine womöglich erhöhte Infektanfälligkeit der Patienten erklären ¹⁰⁴.

Die Anzahl der Leukozyten und deren Untergruppen im Blut wiesen in unserer Studie zwischen den drei Studienarmen keine signifikanten Unterschiede auf. Dies spricht für eine überwiegend lokale Wirkung der Studienmedikation bzw. zu geringe Dosierung für eine systemisch relevante Beeinflussung der Leukozytenzahlen im Blut.

4.3 Einfluss ICS und LABA auf die mDCs in den Atemwegen

Eindrucksvoll zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der mDCs in den Atemwegen von Rauchern unter der Kombinationstherapie Fluticason+Salmeterol im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe. Die alleinige ICS-Gabe hingegen konnte die Anzahl der mDCs nicht signifikant beeinflussen.

Schon früh wurde der Einfluss von Corticosteroiden als bekannte Inhibitoren von Immun- und Entzündungsreaktionen auf humane DCs in der Fachliteratur diskutiert.

Ihre stark suppressive Wirkung auf die Immunreaktion begründet sich v.a. durch die molekulare Modulation der mDCs, insbesondere deren Differenzierung, Reifung und Funktion sowie deren Induktion primärer T-Zellantworten ^{105,106}.

Mehrere Studien bei gesunden Probanden und Probanden mit allergischem Asthma konnten nach kurzfristiger niedrig dosierter Fluticason-Behandlung zeigen, dass CD1a+ DCs verringert werden ^{88,89}. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde erstmals der Einfluss von ICS auf mDCs in den Atemwegen von Rauchern untersucht. Im Gegensatz zu den Befunden aus den zuvor beschriebenen Studien bei Patienten mit Asthma ^{88,89}, gab es keine Reduktion der endobronchialen mDCs nach Fluticason-Monotherapie. Eine mögliche Theorie zur Erklärung dieses Ergebnisses könnte sein, dass mDCs in den Atemwegen von Rauchern eine Resistenz gegenüber ICS aufweisen ¹⁰⁷. Weitere mögliche Ursachen könnten sein, dass der 4-wöchige Inhalationszeitraum zu kurz oder die ICS-Dosis zu gering gewählt wurde, um Auswirkungen auf die endobronchialen mDCs bei Rauchern zu haben. Allerdings wurden in der Studie von Bocchino et al., die eine Reduktion der mDCs bei gesunden Probanden und Patienten mit Asthma zeigte, die gleiche Fluticason-Dosis und ein vergleichbarer Zeitraum gewählt ⁸⁸. Daraus lässt sich schließen, dass die fehlende Wirkung der Fluticason-Monotherapie auf mDCs bei Rauchern eher auf eine Kortison-Resistenz als auf die Dauer und Dosis der Kortison-Einnahme zurückzuführen ist.

Bisher gibt es nur sehr wenige Informationen über die lokalen Effekte der Kombination Fluticason+Salmeterol auf die Immunzellen in den Atemwegen von Rauchern. Die Er-

gebnisse dieser Arbeit liefern erstmals den Nachweis, dass bei gemeinsamer Gabe des ICS mit LABA die Anzahl der mDCs bei Rauchern deutlich gesenkt wird.

Bisher wurde nur in einer tierexperimentellen Studie verdeutlicht, dass die Kombination aus Fluticason und Salmeterol Aspekte des allergen-induzierten Atemwegumbaus verbessert ¹⁰⁸. Auch in der Asthmatherapie wird davon ausgegangen, dass ein ICS mit einem LABA in einem Inhalator neben der bronchokonstriktiven auch die Behandlung der entzündlichen Komponente erlaubt ¹⁰⁹. Eine Metaanalyse zur medikamentösen Behandlung von COPD-Patienten unterstützt ebenfalls diese Aussage und beschreibt eine Verbesserung der Lebensqualität und Lungenfunktion unter Anwendung von Kombinationsinhalatoren ¹⁰⁴. Da mDCs Schlüsselfaktoren in den mit Zigarettenrauch assoziierten Lungenerkrankungen sind ^{79, 84}, stellen wir die Hypothese auf, dass die mDC-Reduktion durch ICS/LABA-Inhalation zu einer nachhaltigen Besserung der Entzündung in den Atemwegen bei Rauchern führen kann.

Es wurde postuliert, dass bestimmte Subpopulationen der mDCs eine besondere Rolle in der Pathogenese rauchbedingter Erkrankungen spielen ⁸¹. In unserer Arbeit konnte eine Änderung der Oberflächenmarker der mDCs weder durch Fluticason allein noch durch die Kombination Fluticason+Salmeterol nachgewiesen werden. Wir gehen daher davon aus, dass die Kombinationstherapie keinen Einfluss auf eine spezifische Untergruppe der mDCs (wie CD1a+ mDCs oder BDCA-1+ mDCs) ausübt, sondern vielmehr eine generelle Senkung aller mDCs (bsp. durch Apoptose) herbeiführt. Somit würde die Kombinationstherapie nicht nur die Anzahl mDCs senken, die in Zusammenhang mit der Pathologie Zigarettenrauch-bedingter Lungenerkrankungen stehen, sondern auch alle anderen mDC-Untergruppen, welche möglicherweise protektive Effekte vermitteln. So ist z.B. zu beachten, dass mDCs auch eine wichtige Rolle beim Schutz gegen Infektionen spielen ¹¹⁰. Die Reduktion der mDCs in den Atemwegen könnte daher mit einer erheblichen Schwächung der Immunabwehr einhergehen und für Infektionen prädisponieren.

4.4 Rolle der Kombinationstherapie ICS und LABA bei COPD

Die aktuelle Leitlinie zur medikamentösen Therapie von COPD-Patienten empfiehlt eine individualisierte Beurteilung der Symptome und des Exazerbationsrisikos, bei dem unter Berücksichtigung des Schweregrades der Erkrankung sowie von Wirksamkeit und Verträglichkeit die Medikamentenwahl und -dosierung getroffen wird.

Ein vorgeschlagenes Modell für die Initiation und das anschließende pharmakologische Management einer Eskalation und / oder Deeskalation ist in **Abbildung 26** dargestellt ⁴⁴.

Jedes Behandlungsschema muss individualisiert werden, da die Beziehung zwischen Schwere der Symptome, Luftstrombegrenzung und Schwere der Exazerbationen zwischen den Patienten variiert. Auffällig im Therapieschema für die COPD ist, dass keine Monotherapie mit Steroiden angeraten wird [**siehe Abbildung 26**]. Dem entspricht auch unser Studienergebnis, dass die Fluticason-Monotherapie keinen Einfluss auf die mDCs und andere inflammatorisch wirkende Zellen in der BALF bei Rauchern hat.

Patienten der Gruppe A sollte als primäre Basistherapie ein Bronchodilatator (Anticholinergika, Beta-2-Sympathomimetika) zur Verringerung der Atemnot angeboten werden. Als Ersttherapie in der Gruppe B werden langwirksame Bronchodilatoren (entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie) empfohlen. Bei Patienten mit anhaltender Atemnot unter der Monotherapie wird die Verwendung von zwei Bronchodilatoren angeraten. Bei Patienten mit schwerer Atemnot kann eine Ersttherapie mit zwei Bronchodilatoren in Betracht gezogen werden ¹¹¹. Da der direkte Studienvergleich eine Überlegenheit der LAMA in Bezug auf die Prävention von Exazerbationen im Vergleich zu LABA feststellte, wird die Therapieeinleitung in der Gruppe C mit einem LAMA empfohlen ¹¹². Patienten mit anhaltenden Exazerbationen können von der Zugabe eines zweiten langwirksamen Bronchodilatators (LABA/LAMA) oder einer Kombination aus einem LABA und einem ICS profitieren. In der Gruppe D erfolgt die Therapieeinleitung aufgrund überlegener Studienergebnisse im Vergleich zu einem einzigen Bronchodilatator mit einer LABA/LAMA-Kombination. Alternativ kann die Ersttherapie bei einigen Patienten auch mit einer LABA/ICS-Kombination präferiert werden. Bei zusätzlichen Exazerbationen ist eine Therapieerweiterung zur Eskalationsprävention auf LABA/LAMA/ICS

möglich. Als weitere Option kann in Betracht gezogen werden, Roflumilast hinzuzufügen oder die Behandlung mit einem Makrolid zu unterstützen. Bei erhöhtem Nebenwirkungs-, speziell Pneumonie-Risiko ist das Stoppen der ICS-Therapie abzuwägen.

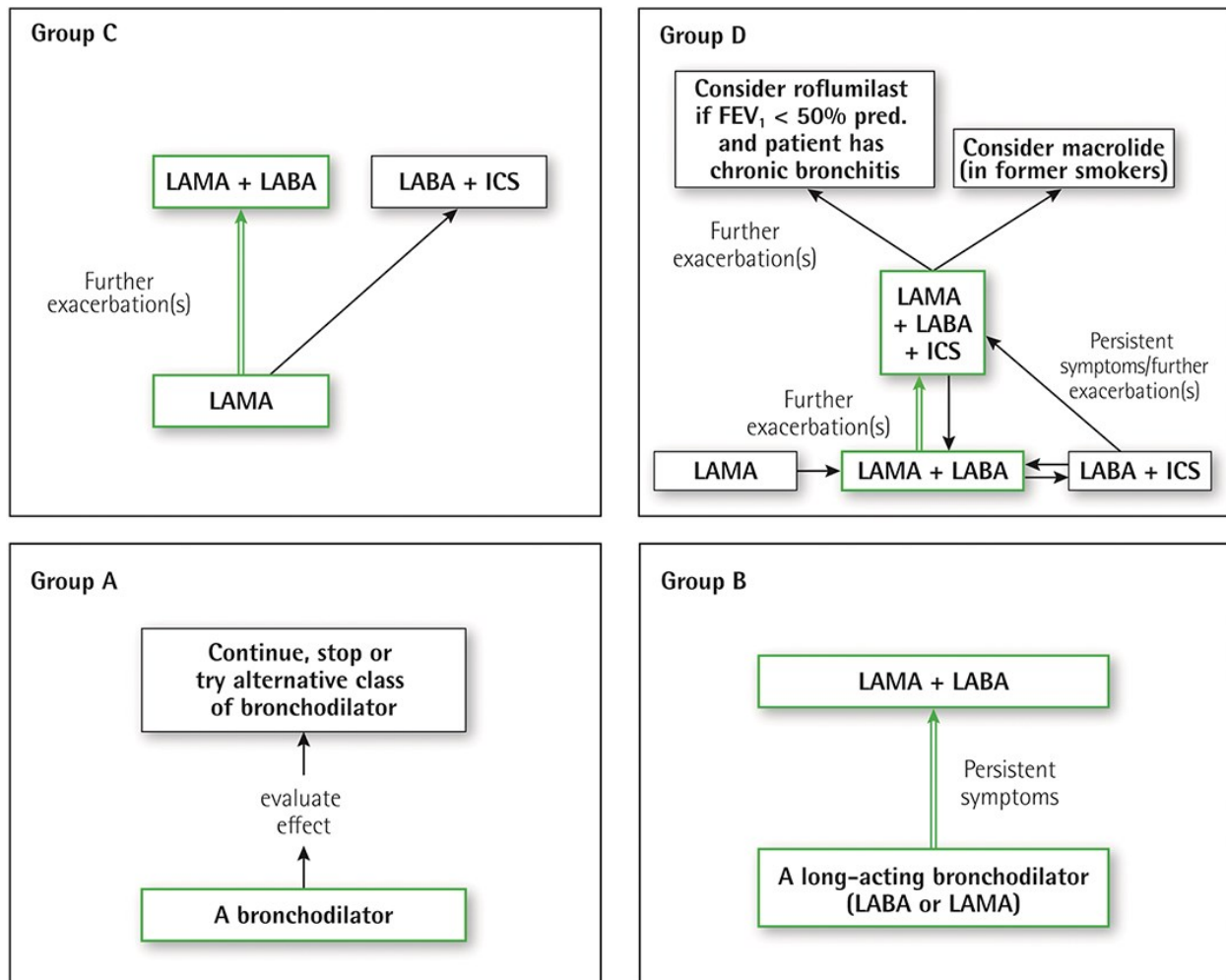


Abbildung 26: Pharmakologische COPD-Therapie nach GOLD.
Die Grafik ist entnommen aus ⁴⁴.

Drei wesentliche Studientypen, bei denen die unterschiedlichen Medikamentengruppen miteinander verglichen wurden, prägen das derzeitige Therapieschema der COPD-Patienten. Der Vergleich der LABA/ICS- versus LABA-Therapie wurde in einer der zwei bekanntesten COPD-Arzneimittelstudien, der TORCH-Studie (Towards a Revolution in COPD Health), untersucht. In dieser Studie von 2007 wurden in einem doppelblinden randomisierten placebokontrollierten Verfahren Daten von COPD-Patienten über drei

Jahre analysiert. Dabei zeigte sich, dass unter der Kombinationstherapie Fluticason+Salmeterol die jährliche Exazerbationsrate, der Gesundheitszustand und die spirometrischen Werte verbessert werden konnten. Die erhoffte Reduktion der Mortalität bei COPD-Patienten konnte jedoch nicht belegt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Pneumonieerkrankung als unerwünschte Nebenwirkung war unter der Fluticason-Behandlung signifikant höher als in der Placebo-Gruppe ¹¹³.

Die FLAME-Studie verglich in einer randomisierten doppelblinden Phase 3-Studie die Kombination LABA/LAMA (Indacaterol / Glykopyrronium) gegenüber der Kombination LABA/ICS (Salmeterol / Fluticason) in Bezug auf die COPD-Exazerbationen während einer 52-wöchigen Behandlungsphase bei Patienten mit mindestens einer Exazerbation innerhalb der letzten 12 Monate. Die jährliche Rate von mäßigen oder schweren Exazerbationen war in der Indacaterol-Glykopyrronium-Gruppe niedriger als in der Salmeterol-Fluticason-Gruppe und die Zeit bis zur ersten mäßigen oder schweren Exazerbation war in der Indacaterol-Glykopyrronium-Gruppe länger als in der Salmeterol-Fluticason-Gruppe, ebenso wie die Zeit bis zur ersten schweren Exazerbation. Die Wirkung von Indacaterol-Glykopyrronium gegenüber Salmeterol-Fluticason auf die Rate der COPD-Exazerbationen war unabhängig vom Ausgangswert der Blut-Eosinophilen-Zahl. Die Inzidenz von unerwünschten Ereignissen und Todesfällen war in den beiden Gruppen ähnlich. Die Inzidenz der Pneumonie betrug 3,2% in der Indacaterol-Glykopyrronium-Gruppe und 4,8% in der Salmeterol-Fluticason-Gruppe. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die LABA/LAMA-Kombination zur Vermeidung von Exazerbationen bei COPD-Patienten mit mindestens einer Exazerbation im letzten Jahr effektiver war im Vergleich zur LABA/ICS-Kombination ¹¹⁴. Verschiedene weitere Studien, wie die ILLUMINATE- und LANTERN-Studie, analysierten die Wirkung der LABA/LAMA-Kombination im Vergleich zur LABA/ICS-Kombination. Die Ergebnisse zeigen zusätzliche Vorteile der LABA/LAMA-Kombination und damit das Potential der doppelten Bronchodilatation als Behandlungsoption bei nicht-exazerbierenden symptomatischen COPD-Patienten ^{115, 116}.

Aus den beschriebenen Studiendaten ergibt sich die Frage, inwiefern ICS einen positiven synergistischen Effekt in der COPD-Therapie ausüben, wenn bereits eine Senkung der Exazerbationsrate unter der LABA/LAMA-Kombination erreicht wird. Hierzu wurden

in der WISDOM-Studie von 2014 (Withdrawal of Inhaled Steroids during Optimized Bronchodilator Management) COPD-Patienten in einer 6-wöchigen Einlaufphase mit einer Dreifach-Therapie aus LABA (Salmeterol), LAMA (Tiotropium) und ICS (Fluticason) behandelt. Im Anschluss wurde die Behandlung für die Hälfte der Patienten wie gehabt fortgesetzt, der anderen Hälfte wurde das Fluticason entzogen und die Therapie mit der Kombination LABA/LAMA weitergeführt. Zwischen den zwei Studiengruppen fand sich bezüglich der Exazerbationsrate kein signifikanter Unterschied. Nach dem vollständigen Rückzug von Glukokortikoiden konnte ein signifikanter und anhaltender Unterschied zwischen den zwei Gruppen in der FEV₁ mit einer größeren Reduktion vom Ausgangswert in der Glukokortikoid-Entzugsgruppe, beobachtet werden ¹¹⁷. Die Daten der WISDOM-Studie verwendeten Watz et al. um in einer Post-hoc-Analyse zu beurteilen, ob bei COPD-Patienten mit einer höheren Blut-Eosinophilenzahl Exazerbationen häufiger auftreten würden nach Abbruch der ICS-Behandlung. Dabei zeigte sich, dass die Exazerbationsrate bei Patienten mit Eosinophilenzahlen von 2% - 5% oder mehr, in der ICS-Entzugsgruppe höher war als in der ICS-Fortsetzungsgruppe. Die Zunahme der Exazerbationsrate war umso ausgeprägter, je höher der Eosinophilen-Wert lag. Die Eosinophilenzahl im Blut bei Patienten mit COPD und Exazerbationen in der Anamnese könnten somit die Reaktion auf ICS vorhersagen. Die Daten legen nahe, dass ein Eosinophilenzählwert von 300 Zellen pro μ l oder mehr auf einen schädlichen Effekt eines ICS-Entzugs hinweisen könnte ¹¹⁸. Ergänzend hierzu erfolgte die Untersuchung der Auswirkung der Exazerbationsvorgeschichte und Blut-Eosinophilenzahl auf die Exazerbationsrate und Lungenfunktion der Patienten in den beiden Gruppen der WISDOM-Studie. Bei Patienten mit zwei oder mehr Exazerbationen im Jahr und einem Eosinophilen Spiegel größer oder gleich 300 Zellen pro μ l wurde eine statistisch signifikante Reduktion der FEV₁ nach ICS-Entzug nachgewiesen ¹¹⁹.

Aktuelle Studien mit Dreifach-Kombinationstherapien aus einem LAMA, LABA und ICS („Single inhaler Triple therapy“) bei Patienten mit COPD und wiederholten Exazerbationen haben bestätigt, dass die Zugabe eines ICS zu einer dualen Bronchodilatation die Exazerbationsrate senken kann ^{120,121}. Allerdings zeigte sich auch hier, zumindest in der Studie mit Fluticasonfuroat, ein erhöhtes Pneumonie-Risiko unter ICS-Therapie ¹²¹.

ICS zielen primär auf die Entzündungskomponente der COPD. Ein wiederkehrendes Diskussionsthema dabei ist die Kortikosteroid-Unempfindlichkeit bei Patienten mit COPD, die auch eine mögliche Erklärung unserer Studienergebnisse sein könnte [siehe 4.3]. Die Zugabe eines LABA zur Therapie mit ICS erhöht die Wirksamkeit der ICS-Effekte ³³. Unsere Studie bestätigt diese Daten insofern, dass allein unter der Fluticason+Salmeterol-Therapie eine Abnahme der endobronchialen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und mDCs verzeichnet werden konnte. Die Auswertung der Bodyplethysmographie ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Lungenfunktion, insbesondere der FEV₁, zwischen Zeitpunkt A und Zeitpunkt B in den drei Studiengruppen. Dabei zu berücksichtigen ist der mit 4 Wochen relativ kurz gewählte Therapiezeitraum und die verhältnismäßig guten Ausgangswerte der Lungenparameter der Probanden.

4.5 Schlussfolgerung

Myeloide dendritische Zellen sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, welche die Polarisierung und die Proliferation antigen-spezifischer T-Zellen steuern. Sie bilden aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Zigarettenrauch bewirkt die Rekrutierung von mDCs in den humanen Atemwegen. Es wird vermutet, dass eine pathologische lokale Aktivierung und Proliferation von mDCs in den Atemwegen zur Pathogenese Rauch-assoziiierter Lungenerkrankungen beiträgt. Der Einfluss ICS auf die mDCs in den Atemwegen von Rauchern war aber bislang unbekannt. Das Ziel dieser prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie war es daher, den Einfluss von ICS auf die mDCs bei Rauchern zu untersuchen. Es wurden dazu 45 Probanden mit entsprechender Raucheranamnese rekrutiert und über einen Zeitraum von 28 Tagen mit Placebo, dem ICS Fluticason oder mit Fluticason in Kombination mit dem LABA Salmeterol inhalativ behandelt. Die Anzahl der mDCs und deren Oberflächenmarker im Blut und in den Atemwegen (gewonnen mittels BAL) wurden mit einer etablierten Methode der Durchflusszytometrie in der Abt. für Pneumologie der Universität Rostock analysiert. Es ergab sich eine signifikante Reduktion neutrophiler

Granulozyten, Makrophagen und mDCs in der BAL-Flüssigkeit nur unter der Kombinationstherapie mit dem ICS Fluticason und dem LABA Salmeterol. Die Expression der Oberflächenmarker der mDCs wurde durch keine der drei Therapien beeinflusst. Die Anzahl und die Charakteristika der mDCs im Blut wurden ebenfalls durch keine der drei Therapiearme verändert. Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass nur die Kombinationstherapie aus einem ICS und LABA, nicht jedoch eine ICS-Monotherapie, die Anzahl der mDCs in den Atemwegen von Rauchern senkt. Dieses Erkenntnis liefert wichtige neue Aspekte in der aktuellen Diskussion über die Rolle und die Nebenwirkungen einer ICS-Therapie bei Patienten mit Rauch-assoziierten Lungenerkrankungen (wie der COPD).

5 Zusammenfassung

Myeloide dendritische Zellen sind als einzige Zellen in der Lage eine primäre Immunantwort zu induzieren, indem sie naive T-Lymphozyten aktivieren. Mit ihren charakteristischen bäumchenartigen Zellfortsätzen überwachen sie ihre Umgebung und können extrazelluläre Bestandteile phagozytieren. Als Antigenpräsentierende Zellen induzieren sie spezifische Immunantworten und bilden eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Zigarettenrauch bewirkt die Rekrutierung von mDCs in den humanen Atemwegen und induziert damit eine übermäßig lokale adaptive Immunantwort, welche in ihrer Folge zu einer chronischen Entzündungsreaktion führt. Ebenso ist bekannt, dass die Oberflächenmarker der mDCs in den Atemwegen von Rauchern Veränderungen durchlaufen, wie beispielsweise eine erhöhte Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Bisher liegen jedoch keine Informationen über die Wirkung von ICS auf die mDCs bei Rauchern mit oder ohne Rauch-assoziierte Lungenerkrankung vor. Daher war es das Ziel dieser prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie den Einfluss inhalativer Medikamente auf die mDCs bei Rauchern zu untersuchen. Es wurden dazu 45 Probanden mit entsprechender Raucheranamnese und normaler Spirometrie rekrutiert und über einen Zeitraum von 28 Tagen mit den Inhalativa Placebo (P), Fluticason (F) oder Fluticason+Salmeterol (F+S) behandelt. Zu Beginn (Zeitpunkt A) und nach 4 Wochen (Zeitpunkt B) wurden von jedem Studienteilnehmer Blutproben und eine BALF entnommen. Die Anzahl der mDCs und deren Oberflächenmarker wurden mit der etablierten Methode der Durchflusszytometrie in der Abt. für Pneumologie der Universität Rostock analysiert. Es ergab sich eine signifikante Reduktion neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und mDCs in der BALF allein unter der Kombination mit dem ICS Fluticason und dem LABA Salmeterol. Die ICS-Monotherapie konnte jedoch keine signifikante Veränderung der Zellpopulationen herbeiführen. Die Expression der Oberflächenmarker der mDCs konnte unter keiner der drei Therapien beeinflusst werden.

Aus der vorliegenden Dissertationsarbeit lassen sich neue Erkenntnisse der Wirkung ICS in Kombination mit LABA auf mDCs bei Rauchern gewinnen. Sie sollten beim Ein-

satz ICS im aktuellen Therapieschema der COPD Berücksichtigung finden und einen Anstoß für weitere Studien zur Untersuchung der ICS-Effekte auf mDCs bei Patienten mit Lungenerkrankungen geben.

6 Literaturverzeichnis

1. Dr. rer. nat. Siegmund-Schultze N. Rasterfahndung des Immunsystems. Deutsches Ärzteblatt 2011;14(108 (41)).
2. Nicod L. Lung defenses: an overview. European Respiratory review 2005;14(95):45-50.
3. Schürch S, Gehr P, Im Hof V, Geiser M, Green F. Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli. Respir Physiol 1990;80(1):17-32.
4. Geiser M. Morphological aspects of particle uptake by lung phagocytes. Microsc Res Tech 2002;57(6):512-22.
5. Blank F, Wehrli M, Lehmann A, Baum O, Gehr P, von Garnier C, Rothen-Rutishauser BM. Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. Immunobiology 2011;216(1-2):86-95.
6. Blank F, Rothen-Rutishauser B, Gehr P. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. Am J Respir Cell Mol Biol 2007;36(6):669-77.
7. Holt PG, Sly PD. Interaction between adaptive and innate immune pathways in the pathogenesis of atopic asthma: operation of a lung/bone marrow axis. Chest 2011;139(5):1165-71.
8. Holt PG. Antigen presentation in the lung. Am J Respir Crit Care Med 2000;162(4 Pt 2):S151-6.
9. von Garnier C, Nicod LP. Immunology taught by lung dendritic cells. Swiss Med Wkly 2009;139(13-14):186-92.
10. Lanckacker EA, Robays LJ, Joos GF, Vermaelen KY. A new danger in the air: how pulmonary innate immunity copes with man-made airborne xenobiotics. J Innate Immun 2010;2(2):96-106.
11. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med 2005;172(5):530-51.
12. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu Rev Immunol 2005;23:975-1028.
13. Willart MA, Lambrecht BN. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. Clin Exp Allergy 2009;39(1):12-9.
14. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V and others. Dendritic cell subsets in health and disease. Immunol Rev 2007;219:118-42.
15. Cochand L, Isler P, Songeon F, Nicod LP. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;21(5):547-54.
16. Schäkel K. Dendritic cells--why can they help and hurt us. Exp Dermatol 2009;18(3):264-73.

17. Radhakrishnan S, Cabrera R, Bruns KM, Van Keulen VP, Hansen MJ, Felts SJ, Pease LR. Indirect recruitment of a CD40 signaling pathway in dendritic cells by B7-DC cross-linking antibody modulates T cell functions. *PLoS One* 2009;4(4):e5373.
18. Sheridan BS, Lefrançois L. Regional and mucosal memory T cells. *Nat Immunol* 2011;12(6):485-91.
19. Cokkinides V, Bandi P, McMahon C, Jemal A, Glynn T, Ward E. Tobacco control in the United States--recent progress and opportunities. *CA Cancer J Clin* 2009;59(6):352-65.
20. Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X, Zweier JL. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300(1):H388-96.
21. Khalili P, Nilsson PM, Nilsson JA, Berglund G. Smoking as a modifier of the systolic blood pressure-induced risk of cardiovascular events and mortality: a population-based prospective study of middle-aged men. *J Hypertens* 2002;20(9):1759-64.
22. Chambless LE, Folsom AR, Davis V, Sharrett R, Heiss G, Sorlie P, Szklo M, Howard G, Evans GW. Risk factors for progression of common carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987-1998. *Am J Epidemiol* 2002;155(1):38-47.
23. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(10):1731-7.
24. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L and others. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 2006;368(9536):647-58.
25. Ezzati M, Henley SJ, Thun MJ, Lopez AD. Role of smoking in global and regional cardiovascular mortality. *Circulation* 2005;112(4):489-97.
26. Just-Sarobé M. [Smoking and the skin]. *Actas Dermosifiliogr* 2008;99(3):173-84.
27. Yilmaz G, Caylan ND, Karacan CD. Effects of Active and Passive Smoking on Ear Infections. *Curr Infect Dis Rep* 2012.
28. Pelkonen M. Smoking: relationship to chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease and mortality. *Curr Opin Pulm Med* 2008;14(2):105-9.
29. Pietinalho A, Pelkonen A, Ryttilä P. Linkage between smoking and asthma. *Allergy* 2009;64(12):1722-7.
30. Shields PG. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* 2002;21(45):6870-6.
31. Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR, Gardner PD. From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection. *Oncogene* 2010;29(35):4874-84.
32. <https://www.destatis.de>.
33. Tan JS, Wang JJ, Younan C, Cumming RG, Rochtchina E, Mitchell P. Smoking and the long-term incidence of cataract: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmic Epidemiol* 2008;15(3):155-61.

34. Filoche SK, Cornford E, Gaudie W, Wong M, Heasman P, Thomson WM. Smoking, chronic periodontitis and smoking cessation support: reviewing the role of dental professionals. *N Z Dent J* 2010;106(2):74-7.
35. Lin HH, Murray M, Cohen T, Colijn C, Ezzati M. Effects of smoking and solid-fuel use on COPD, lung cancer, and tuberculosis in China: a time-based, multiple risk factor, modelling study. *Lancet* 2008;372(9648):1473-83.
36. Miki K, Miki M, Nakamura Y, Suzuki Y, Okano Y, Ogushi F, Ohtsuki Y, Nakayama T. Early-phase neutrophilia in cigarette smoke-induced acute eosinophilic pneumonia. *Intern Med* 2003;42(9):839-45.
37. Leung CC, Lam TH, Ho KS, Yew WW, Tam CM, Chan WM, Law WS, Chan CK, Chang KC, Au KF. Passive smoking and tuberculosis. *Arch Intern Med* 2010;170(3):287-92.
38. Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5(4):276-92.
39. Soerjomataram I, de Vries E, Engholm G, Paludan-Müller G, Brønnum-Hansen H, Storm HH, Barendregt JJ. Impact of a smoking and alcohol intervention programme on lung and breast cancer incidence in Denmark: An example of dynamic modelling with Prevent. *Eur J Cancer* 2010;46(14):2617-24.
40. Yeh HC, Duncan BB, Schmidt MI, Wang NY, Brancati FL. Smoking, smoking cessation, and risk for type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010;152(1):10-7.
41. Giampietro PF, McCarty C, Mukesh B, McKiernan F, Wilson D, Shuldiner A, Liu J, LeVasseur J, Ivacic L, Kitchner T and others. The role of cigarette smoking and statins in the development of postmenopausal osteoporosis: a pilot study utilizing the Marshfield Clinic Personalized Medicine Cohort. *Osteoporos Int* 2010;21(3):467-77.
42. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349(9064):1498-504.
43. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3(11):e442.
44. "Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary." Claus F. Vogelmeier, Gerard J. Criner, Fernando J. Martinez, Antonio Anzueto, Peter J. Barnes, Jean Bourbeau, Bartolome R. Celli, Rongchang Chen, Marc Decramer, Leonardo M. Fabbri, Peter Frith, David M.G. Halpin, M. Victorina López Varela, Masaharu Nishimura, Nicolas Roche, Roberto Rodriguez-Roisin, Don D. Sin, Dave Singh, Robert Stockley, Jørgen Vestbo, Jadwiga A. Wedzicha and Alvar Agusti. *Eur Respir J* 2017; 49: 1700214. *Eur Respir J* 2017;49(6).
45. Mannino DM, Braman S. The epidemiology and economics of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(7):502-6.
46. Hansen JG, Pedersen L, Overvad K, Omland Ø, Jensen HK, Sørensen HT. The Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease among Danes aged 45-84 years: population-based study. *COPD* 2008;5(6):347-52.
47. Lindberg A, Bjerg A, Bjerg-Bäcklund A, Rönmark E, Larsson LG, Lundbäck B. Prevalence and underdiagnosis of COPD by disease severity and the attributable

- fraction of smoking Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med* 2006;100(2):264-72.
48. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006;28(3):523-32.
 49. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998;4(11):1241-3.
 50. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C and others. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(6):532-55.
 51. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1968;278(25):1355-60.
 52. Burgel PR, Bourdin A, Pilette C, Garcia G, Chanez P, Tillie-Leblond I. [Structural abnormalities and inflammation in COPD: a focus on small airways]. *Rev Mal Respir* 2011;28(6):749-60.
 53. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(3):469-73.
 54. Braman SS. Chronic cough due to chronic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006;129(1 Suppl):104S-115S.
 55. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22(4):672-88.
 56. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO and others. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350(26):2645-53.
 57. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364(9435):709-21.
 58. Bratke K, Klug M, Bier A, Julius P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M. Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(6):655-60.
 59. Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000;192(12):1775-84.
 60. Novak N, Haberstick J, Geiger E, Bieber T. Dendritic cells in allergy. *Allergy* 1999;54(8):792-803.
 61. Borràs FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol* 2001;113(4):925-31.
 62. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194(6):863-9.

63. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140(1):53-72.
64. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182(2):389-400.
65. Tang Q, Bluestone JA. Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship? *Nat Immunol* 2006;7(6):551-3.
66. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999;45(1):7-17.
67. Lambrecht BN, Hammad H. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annu Rev Immunol* 2011.
68. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406(6797):782-7.
69. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):725-34.
70. Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001;107(1):3-6.
71. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-63.
72. Tsuji T, Matsuzaki J, Kelly MP, Ramakrishna V, Vitale L, He LZ, Keler T, Odunsi K, Old LJ, Ritter G and others. Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+ T cell responses with broad antigen specificity. *J Immunol* 2011;186(2):1218-27.
73. Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuze HJ. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol* 1997;139(3):639-49.
74. Stössel H, Koch F, Kämpgen E, Stöger P, Lenz A, Heufler C, Romani N, Schuler G. Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1990;172(5):1471-82.
75. Ross R, Ross XL, Schwing J, Längin T, Reske-Kunz AB. The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1998;160(8):3776-82.
76. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 2004;305(5687):1153-7.
77. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23(9):445-9.
78. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):351-8.

79. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. Volume 378. England: 2011 Elsevier Ltd; 2011. p 1015-26.
80. Vassallo R, Walters PR, Lamont J, Kottom TJ, Yi ES, Limper AH. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study. *Respir Res* 2010;11:45.
81. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De Rijck K, Reinartz SM, van Drunen CM, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respir Res*. Volume 11. England 2010. p 35.
82. Liao SX, Ding T, Rao XM, Sun DS, Sun PP, Wang YJ, Fu DD, Liu XL, Ou-Yang Y. Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Med Rep* 2015;11(1):219-25.
83. Stoll P, Heinz AS, Bratke K, Bier A, Garbe K, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M. Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respir Res* 2014;15:48.
84. Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(11):1180-6.
85. Vassallo R, Ryu JH. Smoking-related interstitial lung diseases. *Clin Chest Med* 2012;33(1):165-78.
86. Bratke K, Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Kleine HD, Luttmann W, Christian Virchow J. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 2007;62(2):168-75.
87. Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, Julius P, Kuepper M, Luttmann W, Virchow JC. Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* 2007;30(5):878-86.
88. Bocchino V, Bertorelli G, Zhuo X, Grima P, Di Comite V, Damia R, Chetta A, Del Donno M, Foresi A, Casalini A and others. Short-term treatment with a low dose of inhaled fluticasone propionate decreases the number of CD1a+ dendritic cells in asthmatic airways. *Pulm Pharmacol Ther* 1997;10(5-6):253-9.
89. Möller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwsen CG, Van Haarst JM, Prens EP, Mulder PG, Postma DS, Hoogsteden HC. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy* 1996;26(5):517-24.
90. Till SJ, Jacobson MR, O'Brien F, Durham SR, KleinJan A, Fokkens WJ, Juliusson S, Löwhagen O. Recruitment of CD1a+ Langerhans cells to the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis and effects of topical corticosteroid therapy. *Allergy* 2001;56(2):126-31.
91. Vogelmeier C, Buhl R, Criée CP, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Morr H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D and others. [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie* 2007;61(5):e1-40.

92. Busse WW, Wanner A, Adams K, Reynolds HY, Castro M, Chowdhury B, Kraft M, Levine RJ, Peters SP, Sullivan EJ. Investigative bronchoprovocation and bronchoscopy in airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(7):807-16.
93. Lommatzsch M, Bratke K, Bier A, Julius P, Kuepper M, Luttmann W, Virchow JC. Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* 2007;30(5):878-86.
94. Dreschler K, Bratke K, Petermann S, Thamm P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M. Altered Phenotype of Blood Dendritic Cells in Patients with Acute Pneumonia. *Respiration: Basel.*; 2011.
95. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
96. Soler P, Moreau A, Basset F, Hance AJ. Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis* 1989;139(5):1112-7.
97. Casolaro MA, Bernaudin JF, Saltini C, Ferrans VJ, Crystal RG. Accumulation of Langerhans' cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 1988;137(2):406-11.
98. Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(10):998-1005.
99. Curtis JL. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(5):412-6.
100. Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994;7(9):1678-89.
101. Donnelly LE, Tudhope SJ, Fenwick PS, Barnes PJ. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. *Eur Respir J* 2010;36(1):178-86.
102. Sarir H, Mortaz E, Karimi K, Johnson M, Nijkamp FP, Folkerts G. Combination of fluticasone propionate and salmeterol potentiates the suppression of cigarette smoke-induced IL-8 production by macrophages. *Eur J Pharmacol* 2007;571(1):55-61.
103. Mortaz E, Rad MV, Johnson M, Raats D, Nijkamp FP, Folkerts G. Salmeterol with fluticasone enhances the suppression of IL-8 release and increases the translocation of glucocorticoid receptor by human neutrophils stimulated with cigarette smoke. *J Mol Med (Berl)* 2008;86(9):1045-56.
104. Kew KM, Dias S, Cates CJ. Long-acting inhaled therapy (beta-agonists, anticholinergics and steroids) for COPD: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014(3):CD010844.
105. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999;162(11):6473-81.

106. Vanderheyde N, Verhasselt V, Goldman M, Willems F. Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone. *Transplantation* 1999;67(10):1342-7.
107. Jiang Z, Zhu L. Update on molecular mechanisms of corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2016;37:1-8.
108. Vanacker NJ, Palmans E, Pauwels RA, Kips JC. Effect of combining salmeterol and fluticasone on the progression of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(8):1128-34.
109. Kimura T, Adachi M. [Combination treatment with inhaled corticosteroid/long-acting beta 2-adrenergic bronchodilator in the treatment of asthma]. *Nihon Rinsho* 2001;59(10):1992-9.
110. Kim TH, Lee HK. Differential roles of lung dendritic cell subsets against respiratory virus infection. *Immune Netw* 2014;14(3):128-37.
111. Karner C, Cates CJ. Long-acting beta(2)-agonist in addition to tiotropium versus either tiotropium or long-acting beta(2)-agonist alone for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2012(4):CD008989.
112. Decramer ML, Chapman KR, Dahl R, Frith P, Devouassoux G, Fritscher C, Cameron R, Shoaib M, Lawrence D, Young D and others. Once-daily indacaterol versus tiotropium for patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (INVIGORATE): a randomised, blinded, parallel-group study. *Lancet Respir Med* 2013;1(7):524-33.
113. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J, investigators T. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007;356(8):775-89.
114. Wedzicha JA, Banerji D, Chapman KR, Vestbo J, Roche N, Ayers RT, Thach C, Fogel R, Patalano F, Vogelmeier CF and others. Indacaterol-Glycopyrronium versus Salmeterol-Fluticasone for COPD. *N Engl J Med* 2016;374(23):2222-34.
115. Zhong N, Wang C, Zhou X, Zhang N, Humphries M, Wang L, Thach C, Patalano F, Banerji D, Investigators L. LANTERN: a randomized study of QVA149 versus salmeterol/fluticasone combination in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015;10:1015-26.
116. Vogelmeier CF, Bateman ED, Pallante J, Alagappan VK, D'Andrea P, Chen H, Banerji D. Efficacy and safety of once-daily QVA149 compared with twice-daily salmeterol-fluticasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease (ILLUMINATE): a randomised, double-blind, parallel group study. *Lancet Respir Med* 2013;1(1):51-60.
117. Magnussen H, Disse B, Rodriguez-Roisin R, Kirsten A, Watz H, Tetzlaff K, Towse L, Finnigan H, Dahl R, Decramer M and others. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2014;371(14):1285-94.
118. Watz H, Tetzlaff K, Wouters EF, Kirsten A, Magnussen H, Rodriguez-Roisin R, Vogelmeier C, Fabbri LM, Chanez P, Dahl R and others. Blood eosinophil count and exacerbations in severe chronic obstructive pulmonary disease after withdrawal of inhaled corticosteroids: a post-hoc analysis of the WISDOM trial. *Lancet Respir Med* 2016;4(5):390-8.

-
119. Calverley PMA, Tetzlaff K, Vogelmeier C, Fabbri LM, Magnussen H, Wouters EFM, Mezzanotte W, Disse B, Finnigan H, Asijee G and others. Eosinophilia, Frequent Exacerbations, and Steroid Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196(9):1219-1221.
 120. Papi A, Vestbo J, Fabbri L, Corradi M, Prunier H, Cohuet G, Guasconi A, Montagna I, Vezzoli S, Petruzzelli S and others. Extrafine inhaled triple therapy versus dual bronchodilator therapy in chronic obstructive pulmonary disease (TRIBUTE): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *Lancet* 2018;391(10125):1076-1084.
 121. Lipson DA, Barnhart F, Brealey N, Brooks J, Criner GJ, Day NC, Dransfield MT, Halpin DMG, Han MK, Jones CE and others. Once-Daily Single-Inhaler Triple versus Dual Therapy in Patients with COPD. *N Engl J Med* 2018;378(18):1671-1680.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
AMG	Arzneimittelgesetz
APC	AlloPhycoCyanin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CCR	CC-Chemokin – Rezeptor
CD	Cluster of differentiation, Differenzierungscluster
chron.	chronisch
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
Cy5	Cytochrom 5
DC	Dendritic cell
DCs	Dendritic cells
DC-SIGN	Dendritic Cell–Specific Intercellular-adhesion molecule 3 Grabbing Nonin- tegrin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FEV₁	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FEV₁%FVC	bei forcierter Expiration gemessenen Vitalkapazität
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
Flt-3	fms-like tyrosine kinase receptor-3
Flutide	250 µg Fluticasonpropionat
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreuung
FVC	Forcierte Vitalkapazität

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen-DR
ICS	inhalatives Corticosteroid
IgE	Immunoglobulin E
IL	Interleukin
ILT	Immunoglobulin-like transcript
ITGV	Intrathorakales Gasvolumen
LABA	long-acting beta-receptor agonist
LAMA	long-acting muscarinic antagonist
LDC	Dendritische Zelle vom Langerhans'schen Typ
LPS	Lipopolysaccharid
mDC	Myeloide dendritische Zelle
mDCs	Myeloide dendritische Zellen
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEF	Maximal Expiratory Flow
MEF 25/50/75	Strömungsgeschwindigkeit der ausgeatmeten Luft bei x% der forcierten Vitalkapazität
MHC	Major histocompatibility complex
MMR	Macrophage Mannose Receptor
MVV	Maximal Voluntary Ventilation, maximal erreichbares Atemzeitvolumen
NF-κB	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PE	PhycoErythrin
PEF	Peak Expiratory Flow, maximale expiratorische Atemstromstärke
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PIF	Peak Inspiratory Flow: maximale inspiratorische Atemstromstärke
PS	Polystyrol
R IN	Inspiratorischer Atemwegswiderstand
Reff	Effektiver Atemwegswiderstand
R EX	Expiratorischer Atemwegswiderstand
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach Roswell Park Memorial Institute

Rtot	Totaler Atemwegswiderstand
RV	Residualvolumen
RV%TLC	Residual Volume/Total Lung Capacity
SAE	serious adverse event, schwerwiegende Nebenwirkung
SReff	Spezifischer effektiver Atemwegswiderstand
SRtot	Spezifischer totaler Atemwegswiderstand
SSC	sideward scatter, Seitwärtsstreuung
Tab.	Tabelle
Th1	T-Helferzelle vom Typ I
Th2	T-Helferzelle von Typ II
TNFalpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TLC	Totale Lungenkapazität
TLRs	Toll-like receptors
TORCH	Towards a Revolution in COPD Health
Treg	T-Regulatorzellen
UPLIFT	Understanding Potential Long Term Impacts on Function with Tiotropium
VC	Vitalkapazität
VC IN	Inspiratorische Vitalkapazität
VC EX	Expiratorische Vitalkapazität
Viani[®]	50 µg Salmeterol (als Salmeterolxinafoat) und 250 µg Fluticasonpropionat
VT	Tidal Volume (Atemzugvolumen)

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Antigenpräsentation durch eine myeloide dendritische Zelle.	4
Abbildung 2: Das Immunsystem.	6
Abbildung 3: Abwehrstrukturen in den Atemwegen.....	7
Abbildung 4: Immunologische Kompartimente im respiratorischen System.....	9
Abbildung 5: Wege zur Diagnose einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung.....	13
Abbildung 6: Klassifikation der COPD nach GOLD mit modifiziertem ABCD-Bewertungsinstrument. Die Grafik ist entnommen aus ⁴³	14
Abbildung 7: Pathologische Befunde bei Patienten mit COPD	17
Abbildung 8: Genehmigung des BfArM, Seite 1.....	26
Abbildung 9: Genehmigung des BfArM, Seite 2.....	27
Abbildung 10: Studiendesign laut Studienprüfplan (7.4).....	29
Abbildung 11: Beispieldiskus mit Studienmedikation zur Inhalation.	31
Abbildung 12: Plethysmograph der Fa. Jaeger.	35
Abbildung 13: Originalbefund der Lungenfunktionsprüfung eines Probanden an den Zeitpunkten A und B.	37
Abbildung 14: Blutentnahme. Dargestellt sind Serum-, Li-Heparin- und EDTA-Monovetten.	40
Abbildung 15: Durchführung einer flexiblen Bronchoskopie.	43
Abbildung 16: Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer.	45
Abbildung 17: Das Optische System eines Durchflusszytometers.....	48
Abbildung 18: Dotplot-Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Parameter.	51
Abbildung 19: Der Studienablauf.....	54
Abbildung 20: Vergleich der Gesamtleukozytenzahl in der BALF vor und nach Behandlung.....	60
Abbildung 21: Vergleich der verschiedenen Leukozytenuntergruppen in der BALF.....	61
Abbildung 22: Gesamtleukozytenzahl im Blut vor und nach der Behandlung.	64
Abbildung 23: Vergleich der verschiedenen Leukozytenuntergruppen im Blut.....	65
Abbildung 24: Anzahl der mDCs in der BALF und im Blut für die einzelnen Studiengruppen.....	68
Abbildung 25: Vergleich der Anzahl der mDCs zwischen der Placebo-Gruppe (P) und der gemeinsamen Gruppe aller mit Fluticason behandelten Probanden (F/F+S),	69
Abbildung 26: Stufenplan COPD-Therapie.....	79

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durch Rauchen verursachte oder aggravierte Erkrankungen.	12
Tabelle 2: Oberflächenmarker bei mDCs. Adaptiert nach ⁶²	19
Tabelle 3: Randomisierungsliste der Probanden (Erstellung durch Prof. Kundt, während der Studie war die Zuordnung der Ziffern zu den Präparaten nur Prof. Kundt bekannt).	30
Tabelle 4: Antikörper für die Durchflusszytometrie.	49
Tabelle 5: Klinische und anamnestische Daten der Probanden: Median (Min. - Max.).	55
Tabelle 6: Dauermedikation, Diagnosen und klinische Auffälligkeiten der Probanden.	56
Tabelle 7: Lungenfunktion zu den Zeitpunkten A und B.....	57
Tabelle 8: Charakteristika der gewonnenen BALF.	59
Tabelle 9: Charakteristika der gewonnenen Blutproben.	63
Tabelle 10: mDCs in der BALF und im Blut.....	67
Tabelle 11: Oberflächenmarker auf mDCs.....	71

7.4 Prüfplan der Studie

Der Prüfplan der Studie (Version 6B 06.05.2009) ist im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock hinterlegt.

7.5 Patienteninformationen und Einwilligungen

Alle Einwilligungserklärungen im Original sowie die Patienteninformationsbögen (Version 28.01.2009) sind im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock hinterlegt.

7.6 Untersuchungsunterlagen

Alle Unterlagen im Zusammenhang mit den Untersuchungen (u.a. die Fragebögen zur Erfassung von Nebenwirkungen und das Protokoll zur Erfassung der Anzahl der Hübe pro Diskus pro Proband) sind im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock hinterlegt.

7.7 Weitere Daten

Der vollständige Datensatz ist im Archiv der Abteilung für Pneumologie der Universität Rostock bei Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch hinterlegt.

7.8 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Laura Lux, geb. Tröbs
Geburtsdatum:	08.06.1986
Geburtsort:	Cottbus
Eltern:	Marita und Holger Tröbs
Familienstand:	Verheiratet, drei Kinder
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schul Ausbildung

08/1992 – 06/1998	Grundschule Laubsdorf
08/1998 – 06/2005	Spreeland-Gymnasium Cottbus
06/2005	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4), Großes Latinum

Universitäre Ausbildung

10/2005	Immatrikulation für das Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
09/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2011	Approbation als Ärztin

Klinische Ausbildung

Famulaturen	Innere Medizin, Neurochirurgie, HNO, Radiologie, Pädiatrische Ambulanz
Praktisches Jahr	
1. Tertial:	
08/2010 – 12/2010	Innere Medizin am Tygerberg Academic Hospital in Südafrika
2. Tertial:	
12/2012 – 03/2011	Chirurgie im Gesundheitszentrum Fricktal, Spital Rhein- felden (Schweiz)
3. Tertial:	
03/2011 – 07/2011	Augenheilkunde an der Universitätsklinik Rostock

Facharztausbildung

04/2012 – 03/2015	Schwarzwald-Augenklinik, Schramberg
05/2015 – 10/2017	Augen-MVZ Lausitz GmbH, Hoyerswerda
Seit 10/2017	Carl-Thiem-Klinikum Cottbus, Augenklinik

Mitgliedschaften

DOG – Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft

7.9 Publikation

Fluticasone impact on airway dendritic cells in smokers: a randomized controlled trial

Lommatzsch M, Kraeft U, Troebs L, Garbe K, Bier A, Stoll P, Klammt S, Kuepper M, Bratke K, Virchow JC.

Respir Res. 2013 Oct 29; 14(1):114.

Impact-Factor von Respiratory Research 2013: 3,382

7.10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich außerordentlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. habil. Marek Lommatzsch für die Bereitstellung des Themas, für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation sowie die stetige Motivation auf den Weg zur Fertigstellung bedanken.

Ebenso gilt mein Dank seiner Frau Mandy Lommatzsch für ihre Ausdauer und Geduld und die liebevolle Betreuung daheim während der Besprechungen zur Studienarbeit.

Weiterhin danke ich Oberärztin Dr. med. Andrea Bier und Prof. Dr. habil. Marek Lommatzsch für die Durchführung der zahlreichen Bronchoskopien und den Assistentinnen Jana Brandt, Gesine Fastnacht und Christiane Beil für ihre unermüdlichen Hilfestellungen bei den klinischen Untersuchungen der Studienteilnehmer.

Ein außerordentliches Dankeschön gilt Petra Thamm, die mir bei den Laborarbeiten stets mit Rat und Tat zur Seite stand und neben den langwierigen immunhistochemischen Messungen und Zellzählungen eine nahezu heimische Atmosphäre kreierte. Auch die vielen nicht-wissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit unterstützt. Auch den anderen Labormitarbeitern, insbesondere Katharina Dreschler und Dr. rer. nat. Kai Bratke, danke ich für ihre fachlichen Ratschläge und Anmerkungen.

Vielen herzlichen Dank auch an meine Kommilitonin und Weggefährtin Dr. med. Ulrike Schlüter, geb. Kräft. Die Zusammenarbeit bei der Erhebung der klinischen Parameter, Rekrutierung der Probanden sowie den vielen gemeinsamen Stunden im Labor war eine Freude und ermöglichte durch gegenseitige Motivation und Unterstützung diese aufwendige Studie.

Weiterhin danke ich meiner Freundin Anja Pfeiffer für das Einbringen ihres technischen Knowhows zur Optimierung und Gestaltung der graphischen Darstellungen.

An dieser Stelle möchte ich besonders meinen Eltern danken für ihre selbstlose Unterstützung, ihr stets offenes Ohr, ihre Ausdauer und Geduld, ihren Verzicht und ihre Liebe, die mich im Leben und durch das gesamte Studium begleitet haben. Ebenso

danke ich meinen Schwestern, Lisa und Vivien, die mir mit ihrem Fleiß und Engagement stets ein Vorbild sind. Meinen Großeltern danke ich für ihre vielen weisen Ratschläge und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein persönliches Dankeschön geht an meinen Mann für sein grenzenloses Vertrauen in mein Können und den nötigen Rückhalt, um die Dissertation fertig zu schreiben. Ganz liebevoll danke ich auch unseren bezaubernden drei Kindern, Mila, Odin und Valerie, die immer brav neben meinem Arbeitsplatz schlummerten.

Zum Schluss möchte ich noch allen Probanden, die sich bereit erklärt haben an dieser Studie teilzunehmen, danken.

All denjenigen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, jedoch am Gelingen dieser Arbeit mitgewirkt haben, sei auch mein herzlicher Dank gewiss.

Laura Lux

7.11 Thesen zur Dissertationsschrift

1. Myeloide dendritische Zellen (mDCs) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, welche die Proliferation und Differenzierung naiver T-Lymphozyten steuern.
2. Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), welche häufig durch Zigarettenrauchen ausgelöst wird, ist durch eine überschießende lokale Entzündung in den Atemwegen gekennzeichnet. Die mDCs spielen hierbei wahrscheinlich eine zentrale pathogenetische Rolle.
3. Zigarettenrauch-Exposition bewirkt die Rekrutierung von mDCs in humane Atemwege. Diese Akkumulation von mDCs kann zu einer gesteigerten lokalen adaptiven Immunantwort und zu einer chronischen Entzündung in den Atemwegen beitragen. Zigarettenrauch-Exposition führt auch zu charakteristischen Veränderungen der Expression von mDC-Oberflächenmarkern, welche zur Entwicklung einer chronischen Entzündung beitragen können.
4. Inhalative Steroide (ICS) sind die wichtigste Säule der Asthma-Therapie, die Bedeutung der ICS in der COPD-Therapie ist jedoch umstritten. Der Einfluss von ICS auf die Zahl und die Oberflächenmarker-Expression der mDCs in den Atemwegen von Rauchern wurde bislang nicht untersucht.
5. In der vorliegenden prospektiven, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie wurde der Einfluss von ICS auf die mDCs in der Bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) und im Blut von Rauchern ohne höhergradige Obstruktion untersucht. Es wurden 45 Probanden über einen Zeitraum von 28 Tagen inhalativ mit Placebo (P), dem ICS Fluticason (F) oder dem ICS Fluticason in Fixkombination mit dem langwirksamen Beta-Mimetikum Salmeterol (F+S) behandelt.

-
6. Die Anzahl der mDCs und deren Oberflächenmarker wurden in der BALF und im Blut vor und nach Behandlung mit der etablierten Methode der Durchflusszytometrie in der Abt. für Pneumologie der Universität Rostock analysiert.
 7. Es ergab sich eine signifikante Reduktion neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und der mDCs in der BALF unter der Fluticason-Salmeterol-Kombinationstherapie, nicht jedoch bei der Fluticason-Monotherapie oder der Placebo-Therapie. Bezüglich der Blut-mDCs fanden sich keine signifikanten Änderungen unter Therapie.
 8. Keine der Therapien hatte einen signifikanten Einfluss auf die Expression der mDC-Oberflächenmarker im Blut oder in der BALF.
 9. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass ICS nur in Kombination mit Beta-Mimetika eine Reduktion der mDCs in den Atemwegen von Rauchern bewirken und hierbei keinen Einfluss auf die mDC-Oberflächenmarker-Expression haben.
 10. Studien mit COPD-Patienten unterschiedlicher Schweregrade sind nun indiziert, ob sich dieser Effekt auch bei höhergradiger COPD findet und ob dieser Effekt mit dem ICS-Ansprechen der Patienten korreliert.

7.12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe. Ich habe keine Hilfsmittel außer den genannten verwendet.

Die klinische Studie wurde in Kooperation mit Frau Dr. med. Ulrike Schlüter (geb. Kräft) durchgeführt.

Dr. med. Schlüter befasste sich mit dem Einfluss von Fluticason auf die plazmazytoiden DCs, während sich meine Promotionsarbeit mit dem Einfluss von Fluticason und Salmeterol auf myeloide DCs auseinandersetzt. Aufgrund des gleichen Studiendesigns und der Übereinstimmung der Methoden wurde der Methodenteil der Dissertation gemeinsam mit Dr. med. Ulrike Schlüter erstellt.

Laura Lux

Rostock, Juni 2018