

Forschungsinstitut für Lungenkrankheiten
und Tuberkulose, Berlin-Buch, Poliklinik

EINFLUSS VON ASCORBINSÄURE AUF DEN KLINISCHEN VERLAUF DES
INFEKTBEDINGTEN ASTHMA BRONCHIALE UND DIE BILDUNG VON
REAKTIVEN SAUERSTOFFMETABOLITEN DURCH BAL-ZELLEN

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Akademie für Ärztliche Fortbildung der DDR

von

Dipl.-Med. Margit Schertling

geboren am 28. 10. 1950 in Arnstadt

Berlin 1989

1. Gutachter: Prof. MR Dr. sc. med. Gudowski
2. Gutachter: Prof. MR Dr. sc. med. Löwe
3. Gutachter: Prof MR Dr. sc. med. Sjöpkve

Datum des Beschlusses : 28. 11. 89 = Prom

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Funktionen der neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen (AM) im Rahmen der Infektion	1
1.2. Biosynthese von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (RSM) durch Granulozyten und Alveolarmakrophagen	2
1.3. Zellen und Mediatoren des Entzündungsprozesses	6
1.4. Bedeutung der RSM bei der Pathogenese des infektbedingten Asthma bronchiale	7
1.5. Neue Aspekte in der Pathogenese des Asthma bronchiale, Infektionen als Wegbereiter	9
1.6. Effekt von Ascorbinsäure als Antioxidans	12
1.7. Bedarf, Katabolismus und Toleranz von Ascorbinsäure	14
2. Ziel der Untersuchungen	15
2.1. Prüfplan	16
2.1.1. Patientenauswahl und Einschlußkriterien	
2.1.2. Ausschlußkriterien	16
2.2. Studiendesign	16
3. Material und Methoden	18
3.1. Symptomenscore	18
3.2. Peak-flow	19
3.3. Die Testung der bronchialen Hyperreaktivität (BHR) mittels Histaminprovokation	19
3.4. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	20
3.4.1. Bedeutung der BAL	20

3.4.2.	Technik der Bronchoskopie und BAL bei Patienten mit infektbedingtem Asthma bronchiale	21
3.4.3.	Aufarbeitung der BAL	22
3.4.4.	Chemilumineszenzmessung	23
3.4.5.	INT-Test zur Bestimmung der Superoxid-Bildung durch polymorphkernige Leukozyten (PMN) und BAL-Zellen	24
3.4.6.	Bakteriologische Untersuchung der Spülflüssigkeit	25
3.5.	Messung des zeitlichen Verlaufes der Ascorbinsäurekonzentration im Serum	25
3.6.	Globale Beurteilung der Verträglichkeit und Wirksamkeit durch Arzt und Patient	25
3.7.	Statistische Analyse der Meßdaten	26
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit	26
4.1.1.	Tagebuchparameter (Peak-flow- und Symptomenscore)	26
4.1.2.	Verlauf der bronchialen Hyperreaktivität während der Studie	27
4.1.3.	Korrelation zwischen Verbesserung der Peak-flow-Werte und Senkung der bronchialen Hyperreaktivität	29
4.1.4.	Auswertung der BAL	29
4.1.4.1.	Zelldifferenzierung in der bronchoalveolären Lavage	29
4.1.4.2.	Korrelation Tagebuchparameter - alveoläres Differentialzellbild	33
4.1.4.3.	Beziehung zwischen alveolärem Differentialzellbild und dem Verlauf der bronchialen Reaktivität während der Studie	33
4.1.4.4.	Erfassung der Aktivität der BAL-Zellen	33

4.1.4.5.	Vergleich der Parameter CL - Peak-flow, Symptomen- score bzw. bronchiale Hyperreaktivität	37
4.1.4.6.	Zusammenhang zwischen alveolärem Differentialzell- bild und dem oxidativen Metabolismus der BAL- Zellen beim infektbedingten Asthma bronchiale	38
4.1.4.7.	O ₂ ⁻ -Bildung durch neutrophile Granulozyten und BAL-Zellen	38
4.1.4.8.	Bakteriologische Befunde	41
4.1.4.9.	Die globale Beurteilung der Wirksamkeit durch Arzt und Patient	41
4.2.	Sicherheitsparameter	41
4.2.1.	Konzentration von Ascorbinsäure im Serum	41
4.2.2.	Nebenwirkungen	42
4.2.2.1.	Allgemeine Verträglichkeit	42
4.2.2.2.	Nebenwirkung der bronchoalveolären Lavage	42
5.	Diskussion	42
6.	Zusammenfassung	49
7.	Literaturverzeichnis	52

Abkürzungsverzeichnis

AM	Alveolarmakrophagen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHR	Bronchiale Hyperreaktivität
CL	Chemilumineszenz
HZW	Hefezellwand
INT	Jodphenyl-Nitrophenyl-Phenyltetrazolium- chlorid-Test
LT	Leukotriene
O ₂ ⁻	Superoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
Peak-flow	Maximale Ausatemungsgeschwindigkeit
PG	Prostaglandine
RSM	Reaktive Sauerstoffmetabolite
R _{VP}	Verschlußdruckmethode
TX	Thromboxane

2.1. Prüfplan

2.1.1. Patientenauswahl und Einschlußkriterien

29 Patienten mit einem infektbedingten Asthma bronchiale, 18 Männer und 11 Frauen im Alter von 18 - 60 Jahren, wurden für die Studie unter poliklinischen Bedingungen rekrutiert.

2.1.2. Ausschlußkriterien

Inhalative und systemische Kortikosteroide, Nierenerkrankungen und darüber hinaus akute und schwere purulente Infektionen galten als kontraindiziert; des weiteren Schwangere, Patienten mit Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts und mit cardialen Erkrankungen.

2.2. Studiendesign

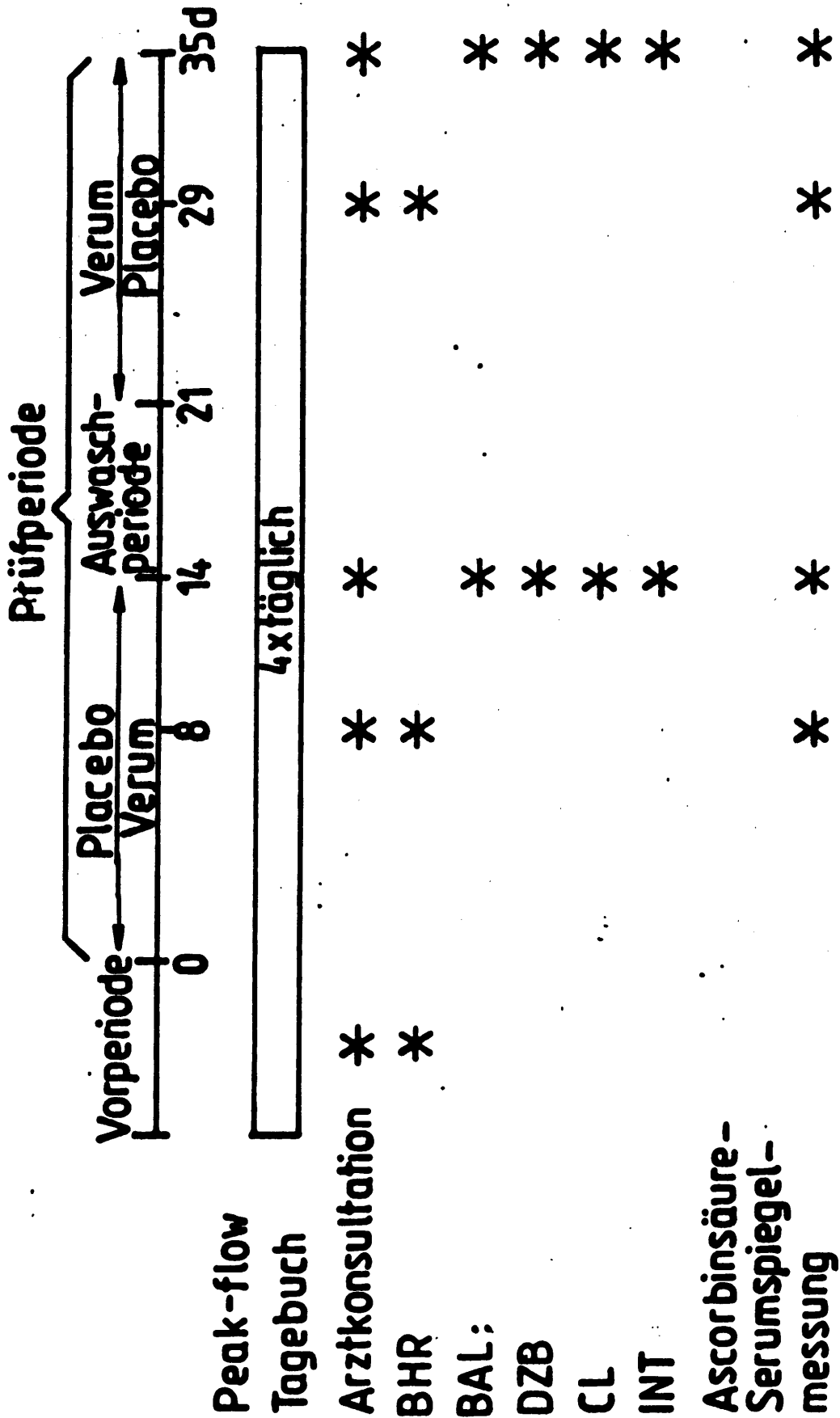
Die Dauer der Doppelblindstudie im Cross-over-design wurde über einen Zeitraum von 35 Tagen geführt. Die Studie gliederte sich in 2 Wochen Placeboperiode, 1 Woche Auswaschtest und 2 Wochen Ascorbinsäureperiode auf. Die Reihenfolge der Prüfperioden war zufällig gewählt (Abb. 5).

Für die vorliegende Studie wurde neben der Basismedikation eine Tagesdosis von 5 g Ascorbinsäure (Ascorvit à 500 mg) im Vergleich zu Placebo oral in 3 Einzeldosen festgelegt. Eingesetzt wurden Dragees des VEB Jenapharm, Abteilung Klinische Forschung, der Chargennummern 150485 und 050886.

Die Patienten erhielten Packungen versehen mit Chargennummern, die entsprechend den Doppelblindbedingungen codiert waren. Der Code wurde während der Studie nicht gebrochen.

In einer Vorperiode von 2 Wochen sollten unter der bisherigen antiasthmatischen Therapie die Ausgangswerte der Lungenfunktions-

Abb. 5 Ablaufplan der Doppelblindstudie



parameter bestimmt werden. Gleichzeitig sollten die Patienten in dieser Zeit lernen, das Tagebuch korrekt auszufüllen und selbst den maximalen expiratorischen Spitzenfluß (Peak-flow) mit dem Peak-flow-Meter zu bestimmen. Während der 35tägigen doppelblinden Behandlungsperiode wurden die Patienten 4mal und zwar am 8., 14., 29. und 35. Tag nach Beginn der Behandlung einbestellt. In der Mitte der Verum- und Placeboperiode wurden erneut Messungen der bronchialen Hyperreaktivität durchgeführt und am Ende der Prüfperioden erfolgte die bronchoalveoläre Lavage mit zytologischer Untersuchung, Chemilumineszenz und INT-Test.

3. Material und Methoden

3.1. Symptomenscore

Die Wirksamkeit eines Antiasthmatikum läßt sich grundsätzlich nicht durch einen einzigen Zielparameter erfassen. Auch die Asthmasymptomatik äußert sich individuell verschiedenartig. Zur Erfassung der Symptome wurden die Beschwerden getrennt in einem Tagebuch aufgeführt (Tab. 2).

Tab. 2 Symptomenscore

Bewertung der asthmatischen Beschwerden:

- 0 = keine Beschwerden
- 1 = leichte oder kurzzeitige Beschwerden, die keinen zusätzlichen Einsatz von Arzneimitteln erfordern
- 2 = stärkere Beschwerden, die durch zusätzliche Arzneimittel innerhalb von 15 Minuten aufgehoben werden
- 3 = stärkere Beschwerden, die auf zusätzliche Arzneimittel ungenügend oder verzögert ansprechen oder wiederholte Anwendung erfordern

Beschwerden können sein: anfallsweise Atemnot, pfeifende Atmung, morgendliches Engegefühl oder trockener Reizhusten.

3.2. Peak-flow

Jedem Patienten wurde zu Studienbeginn ein Peak-flow-Monitor (Vitalograph) zur Messung der maximalen Ausatemungsgeschwindigkeit während des Studienverlaufs ausgehändigt. Die Messung erfolgte 4mal täglich (6, 9, 12, 18 Uhr) durch den Patienten im Sitzen. Der höchste Wert (l/min) aus jeweils 3 Messungen wurde im Tagebuch vermerkt.

3.3. Die Testung der bronchialen Hyperreaktivität (BHR) mittels Histaminprovokation

Die bronchiale Hyperreaktivität unterliegt außerordentlich starken quantitativen Schwankungen. In den Nachtstunden wird der höchste Wert von Bronchialtonus und Reaktivität nachgewiesen.

Wegen der zirkadianen Reaktivitätsschwankungen wählten wir bei unseren vergleichenden Meßwiederholungen dieselbe Tageszeit und forderten zur Vermeidung von Fehlerquellen die Durchführung der Testungen vom gleichen geschulten Personal.

Die Messung der unspezifischen BHR erfolgte am Bronchoscreen-Meßplatz (Jaeger, Würzburg/BRD) unter Einsatz von Histamindihydrochlorid in einer Konzentration von 1 mg/ μ l als pharmakodynamische Provokationssubstanz [73]. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß gegenüber den konventionellen Meßverfahren eine bessere Quantifizierbarkeit der bronchialen Reaktion bei deutlicher Einsparung der Untersuchungszeit erreicht wird.

Die Histaminaerosolapplikation erfolgte Atemzug um Atemzug in der Inspirationsphase während der Spontanatmung (Verneblerleistung pro Atemzug 5 μ mol). Gleichzeitig wurde die bronchiale Reaktion am selben Gerät mit der Verschußdruckmethode (R_{VD}) bestimmt. Als Zielkriterien der BHR wurde ein 50ziger Anstieg

des Atemtraktwiderstandes (R_{VD}) im Vergleich zum Ausgangswert bei gleichzeitigem Überschreiten des R_D -Wertes von 0,3 kPa/(l/s) post provocationem definiert.

Folgende Lungenfunktionsparameter vor inhalativer Provokation gelten als Ausschlußkriterien für die Untersuchung:

$R_D > 0,5$ kPa/(l/s) oder $FEV_1 < 80\%$ des Sollwertes. Des weiteren galten mangelnde Reproduzierbarkeit durch Probanden oder eine signifikante Reaktion auf die Verdünnungslösung (am Beginn der Provokation bereits fällt FEV_1 um 20% ab) als Kontraindikationen.

Durch Vortestungen wurde bei allen 29 Patienten eine BHR auf eine kumulative Histamindosis von ≤ 8 μ mol nachgewiesen.

Um eine semiquantitative Bewertung im Hyperreaktivitätsbereich zu ermöglichen, wurde während der Prüfperiode die Schwellendosis für die BHR auf 1 μ mol Histamin festgelegt, das entspricht 40 Atemzügen.

Die BHR ($PD_{50} R_{VD}$) wurde bei einer kumulativen Provokationsdosis von ≤ 1 μ mol Histamin als positiv, bei > 1 μ mol Histamin als negativ deklariert.

3.4. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

3.4.1. Bedeutung der BAL

Seit 1979 wird die diagnostische bronchoalveoläre Lavage als relativ neuartiges Untersuchungsverfahren durchgeführt und wurde von Hunninghake entsprechend den klinischen Erfordernissen weiter modifiziert.

Die diagnostische bronchoalveoläre Lavage erreicht als Zielorte die terminalen Bronchien und Alveolen.

Diese Methode ermöglicht es, humorale und zelluläre Verände-

rungen ohne bioptischen Eingriff am Ort der Atemwegserkrankung direkt zu erfassen [15,22,33,45,47,50].

Als Indikation für eine BAL bei Asthma bronchiale sind vorwiegend klinische und wissenschaftliche Fragestellungen zu nennen, mit dem Ziel, die Eigenschaften der Zellen und der Spülflüssigkeit bei Patienten mit Asthma bronchiale zu analysieren [69,74,92,115].

3.4.2. Technik der Bronchoskopie und BAL bei Patienten mit infektbedingtem Asthma bronchiale

Die BAL wurde unter ambulanten Bedingungen mittels Fiberbronchoskop in Lokalanästhesie durchgeführt. Um Flüssigkeitsverluste und Verunreinigungen der Lavageflüssigkeit durch Blut zu vermeiden, wird eine medikamentöse Hustenblockade gelegt. Überflüssiges Lokalanästhetika muß abgesaugt werden, da Lokalanästhetika die Zellaktivität und Makrophagenfunktion beeinträchtigen können.

Aus anatomischen und technischen Gründen erfolgte die BAL im Mittellappen, der Gewinn an Zellen und zurückgewonnener Flüssigkeit ist hier am größten.

Als Spülflüssigkeit wurde angewärmte sterile physiologische Kochsalzlösung in Einzelportionen (5 - 7mal je 20 ml) instilliert. Nach jeder Instillation wurde sofort wieder vollständig abgesaugt. Der Flüssigkeitsrückgewinn liegt zwischen 30 - 60 % des instillierten Volumens. Bei Asthmatikern ist dieser Anteil signifikant kleiner als bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen [24,34,76,87,90].

3.4.3. Aufarbeitung der BAL

Die Spülflüssigkeiten wurden in einem mit Eiswasser gekühlten, silikonisierten Erlenmeyerkolben gepoolt, anschließend durch ein Drahtsieb (250 μm) filtriert und bei 4 °C zentrifugiert (500g, 10 min). Das Zellsediment wurde 10 min bei 4 °C mit 10 ml sterilem Erythrozyten-Lyse-Puffer (pH = 7,4) behandelt, anschließend 2mal mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und eine Zelldichte von 10^6 AM/ml PBS eingestellt.

Die Gesamtzellzahl und der Anteil von AM in der Zellsuspension wurde im der Zählkammer nach Neubauer an Hand von morphologischen Kriterien und durch den Esterase-Test mit α -Naphthylacetat bestimmt. Die Zelldifferenzierung wurde nach Anfärbung der Zellsuspension mit einer Mischung aus gleichen Teilen von 1 % wäßriger Nilblauschwarz- und Thionin-Weinsäure-Lösung nach Feyrter (1g Thionin + 0,5 g Weinsäure/100 ml destilliertem Wassers) im Verhältnis 1:1 vorgenommen. Für die zytologischen Untersuchungen zur Bestimmung des alveolären Differentialzellbildes erfolgte keine Behandlung der BAL-Zellen mit Erythrozyten-Lyse-Puffer.

Bei der Auswahl der Technik der Zellpräparation ist bisher nicht geklärt, welche Präparationstechnik für die Aufarbeitung der BAL eines Asthmatikers das Optimum bringt.

Da Zellpopulationen mit geringem prozentualen Anteil an der Gesamtzellzahl der BAL, wie z. B. Eosinophile, durch falsche Filterung nicht richtig beurteilt werden können bzw. die Zelldifferenzierung beim Asthma verfälscht sein kann.

3.4.4. Chemilumineszenz (CL)-Messung

Meßtechnik: Die Messung wurde mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler Isocap 300 (Searle Nuclear Chicago Division, Holland) in "out of coincidence"-Schaltung und "recycling"-Arbeitsweise durchgeführt. Die Meßzeit je Probe betrug 0,2 min im Abstand von etwa 6 min. Zur Messung wurden Polypropylen-Röhrchen (sog. Mini-Vials) verwendet (Meßtemperatur 24 °C). Der Arbeitsraum wurde vollständig abgedunkelt und mit einer roten Dunkelkammerbeleuchtung ausgestattet.

Reagenzien: Als Medium für die CL-Messung wurde Veronal-gepufferte physiologische NaCl-Lösung mit einem Zusatz von Albumin, Glukose, Ca^{2+} und Mg^{2+} entsprechend den Angaben von Wulff und Mitarb. [124] verwendet. Die Hefezellwände für die Stimulation der AM wurden aus Bäckerhefe isoliert [86]. Die Opsonierung der Hefezellwände erfolgte mit Humanserum (Konzentration der Hefezellwand-Dispersion 5 mg/1 ml PBS).

Luminol (CL-Verstärker) wurde in einer Konzentration von 6 mg/3 ml PBS unter Zusatz von 24 μ l Diethylamin durch Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht. Lucigenin (Cl-Verstärker) wurde in PBS gelöst (10,2 mg/2 ml).

Meßansatz: 2 ml Veronal-Puffer, 20 μ l Luminol- bzw. Lucigenin-Lösung und 100 μ l der AM-Suspension ($1 \cdot 10^8$ AM) wurden in einem Meßröhrchen gemischt und etwa 15 min mit Flüssigkeitsszintillationszähler vorinkubiert. Danach wurde die Hefezellwand-Suspension (500 μ g) hinzugefügt und die CL-Messung vorgenommen.

Die Luminol- und Lucigenin-verstärkte CL wurde hierbei paral-

1el gemessen ¹⁾. Zur quantitativen Auswertung der Meßergebnisse wurden die Peakhöhe (IPM) und die Flächen unter den CL-Kurven (IP) innerhalb von 200 min nach Stimulation mit der Hefezellwand-Suspension bestimmt [122].

3.4.5. INT-Test zur Bestimmung der Superoxid-Bildung durch polymorphkernige Leukozyten (PMN) und BAL-Zellen

Zellisolierung: Leukozytenreiches Plasma wurde aus Heparin-Dextran-Blut nach Sedimentation gewonnen (20 U Heparin, 0,25 ml Infukoll 6%). Der Dichtegradienten-Zentrifugation (385 g) mit Ficoll-Visotrast folgte eine Aqua-dest-Behandlung des Sediments zur osmotischen Erythrozytolyse. Nach Einstellen der Isotonie und 3maligem Waschen der Zellen bestand die Suspension zu 94 - 97% aus PMN. Sie wurde danach auf $2 \cdot 10^6$ PMN oder AM/ml mit Eagle-MEM eingestellt.

Stimulatoren: Hitzeaggregiertes Humangammaglobulin (12 Minuten auf 60 °C erhitzt, Arbeitskonzentration 8 mg/ml) und opsoniertes Zymosan (2 mg/ml) wurden bis zur Testdurchführung bei -20 °C gelagert.

Farbstoff: INT = Jodphenyl-Nitrophenyl-Phenyltetrazoliumchlorid (Lachema, Brno, CSSR) wurde in Eagle-MEM bis zur Sättigung gelöst.

Testdurchführung: 100 µl Stimulator- bzw. Eagle-MEM-Lösung für die Kontrolle, 50 µl INT-Lösung und 100 µl Zellsuspension wurden in Polyäthylenröhrchen 30 Minuten inkubiert. Der Reaktionsstop

¹⁾Die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz zeigt die Bildung von Superoxianion (O_2^-) an, während die Luminol-abhängige Chemilumineszenz für Hypohalogenit spezifisch ist.

erfolgte durch Kühlung im Eiswasser und Zentrifugation bei 4 °C. Nach Trocknen des Zellbodensatzes wurde der Formazankomplex mit 1 ml Dioxan unter Schütteln im Dunkeln gelöst. Der rötlich gefärbte abzentrifugierte Oberstand wurde mit einem Photometer 1101 M (Metheler und Hinz, Hamburg) gegen Dioxan bei 492 nm gemessen [42].

3.4.6. Bakteriologische Aufarbeitung der Spülflüssigkeit

Vom Material wird ein Grampräparat angefertigt. Es erfolgt ein Ausstrich auf der Blutagarplatte mit Ammenstrich und ein Kulturansatz zur Resistenzbestimmung.

3.5. Messung des zeitlichen Verlaufes der Ascorbinsäurekonzentration im Serum

Zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von Ascorbinsäure bei dem angewendeten Therapieregime wurde das Tagesprofil des Serumspiegels der Ascorbinsäure mit dem L-Ascorbinsäure-Farbstest (Boehringer, Mannheim, BRD) enzymatisch bestimmt.

3.6. Globale Beurteilung der Verträglichkeit und Wirksamkeit des Prüfpräparates durch Arzt und Patient

Die globale Beurteilung der Wirksamkeit des Prüfpräparates durch Arzt und Patient erfolgte mit folgender Abstufung:

- sehr gut
- gut
- schlecht.

Nebenwirkungen wurden gesondert vom Patienten dokumentiert und vom Arzt erfragt oder beobachtet.

Darüberhinaus wurden Veränderungen laborchemischer Meßgrößen, die

als Verträglichkeitsparameter in der Studie untersucht wurden, erfaßt. Dazu wurden folgende Parameter bestimmt:

- BSR
- BB mit Gerinnungsstatus, Blutgruppe
- Bilirubin, ALAT, ASAT, alkalische Phosphatase
- Kreatinin, Harnstoff
- Elektrophorese
- Urinstatus
- EKG
- Thorax-Röntgen.

Während der 35tägigen Behandlungsperiode wurde die Compliance des Patienten z. B. durch die Kontrolle des Medikamentenverbrauches am 14. und 35. Tag erfaßt. Am Ende jeder Prüfperiode mußten die nichtverbrauchten Dragees zurückgegeben werden.

3.7. Statistische Analyse der Meßdaten

Zur statistischen Auswertung der Meßgrößen wurden die arithmetischen Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichung (s) ermittelt. Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte mit dem gepaarten t-Test und Wilcoxon-Test.

4. Ergebnisse

4.1. Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit

4.1.1. Tagebuchparameter (Peak-flow- und Symptomenscore)

Das Gesamtmittel der Peak-flow-Werte für alle Asthmatiker betrug in der Placebophase 410 l/min und in der Verumphase 419 l/min. Dieser geringe Anstieg von durchschnittlich 9 l/min in der Ascorbinsäuregruppe ist zwar statistisch nicht unerheb-

lich ($p = 0,06$, Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, einseitige Fragestellung), dürfte aber klinisch nicht relevant sein.

Ein ähnliches Bild ergab die Analyse des Symptomenscores. Die Mittelwerte lagen in der Placebophase bei 0,72 Punkten und unter Ascorbinsäure bei 0,65 Punkten ($p = 0,06$, Wilcoxon-Test, einseitig). In der Behandlungsperiode mit Ascorbinsäure ist somit eine geringfügige Abnahme der Beschwerden zu beobachten. Die Veränderungen der Symptomenscores korrelieren nicht mit denen der Peak-flow-Werte ($r = - 0,06$).

4.1.2. Verlauf der bronchialen Hyperreaktivität während der Studie

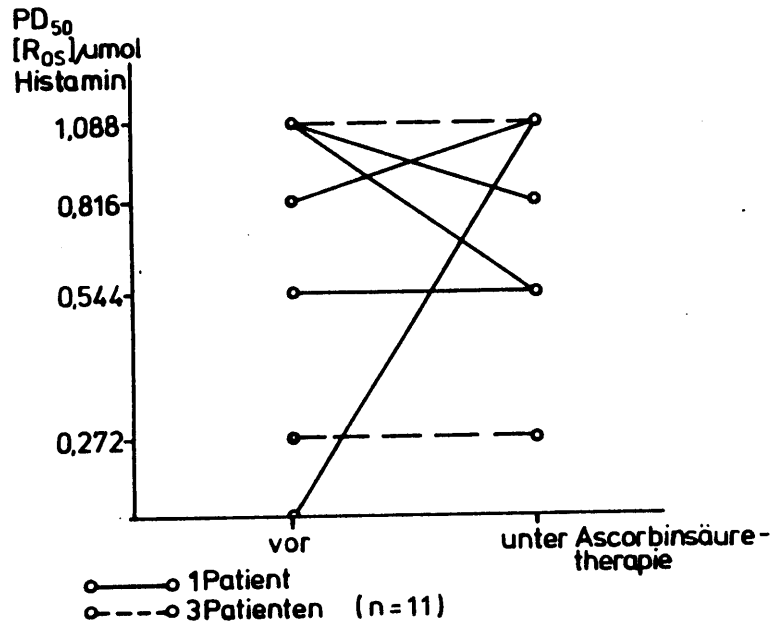
Die Untersuchungen zur bronchialen Hyperreaktivität erfolgten zu 3 Zeitpunkten jeweils in der Vorperiode, nach 8 Tagen und am 29. Tag der Studie. Der Verlauf der bronchialen Hyperreaktivität bei 23 Probanden während der Untersuchungsperiode ist in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3 Verlauf der bronchialen Hyperreaktivität (BHR) mit Ascorbinsäure oral (5 g/die über 35 Tage) im Vergleich zu Placebo ($n = 23$)
Positivkriterien: $PD_{50} R_{50} 1 \mu\text{mol}$ Histamin

		BHR in der Ascorbinsäure-Periode		
		positiv	negativ	
BHR in der Placebo- periode	positiv	9	12	21
	negativ	0	2	2
		9	14	23

Bei 11 Asthmatikern trat keine Veränderung in beiden Perioden auf. Die Dosis-Wirkungskurven dieser Patienten sind in Abb. 6 veranschaulicht.

Abb. 6 Dosis-Wirkungskurve der Asthmatiker (n = 11), bei denen die BHR unverändert positiv in beiden Prüfperioden verläuft



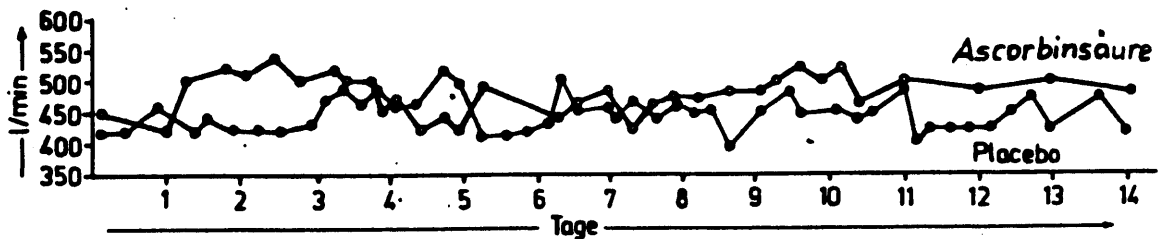
Der Verlauf der BHR bei den Asthmatikern, bei denen keine Veränderung in beiden Prüfperioden zu beobachten war, zeigt bei 2 Patienten eine Tendenz der Anhebung der Schwellendosis zur Auslösung der BHR in der Ascorbinsäureperiode. 7 Patienten reagierten unverändert bei gleicher Histaminprovokationsdosis.

Bei 12 Probanden war in der Placebophase eine bronchiale Hyperreaktivität nachweisbar, während in der Ascorbinsäurephase eine negative Reaktion beobachtet wurde. Der umgekehrte Fall trat nicht auf. Diese Asymmetrie ist signifikant ($p \leq 0,0003$; Test auf der Basis der Binomialverteilung). Demzufolge konnte bei 52 % der Patienten mit Asthma bronchiale die bronchiale Hyperreaktivität wirkungsvoll gesenkt werden.

4.1.3. Korrelation zwischen Verbesserung der Peak-flow-Werte und Senkung der bronchialen Hyperreaktivität

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde versucht, jene Patienten näher zu charakterisieren, bei denen deutliche therapeutische Effekte nachgewiesen werden konnten (Abb. 7)

Abb. 7 Peak-flow-Verlaufskurve während des gesamten Studienablaufes



Es gelang jedoch nicht, "responder"-typische Gemeinsamkeiten zu finden.

4.1.4. Auswertung der BAL

4.1.4.1. Zelldifferenzierung in der bronchoalveolären Lavage

In der Literatur liegen sehr unterschiedliche Angaben zu Normwerten der BAL-Differentialzytologie vor. Die Angaben über Normwerte sowie Muster pathologischer Zellverteilungen in der Lavageflüssigkeit bei verschiedenen Erkrankungen sind uneinheitlich. Zur Orientierung ist eine Tabelle aus der Literatur angegeben (s. Tab. 4) [30].