

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Methodische Untersuchung zur Diagnostik der bronchialen
Hyperreagibilität mit Hilfe eines inhalativen
Methacholin-Provokationstests**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Beatrice Voß
aus Mainz

Mainz, 2009

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 25. Februar 2010

*Im Atemholen sind zweierlei Gnaden:
Die Luft einziehen, sich ihrer entladen;
Jenes bedrängt, dieses erfrischt;
So wunderbar ist das Leben gemischt.*

Johann Wolfgang von Goethe
West-östlicher Divan, Buch des Sängers

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Ziel der Untersuchung	6
3. Materialien und Methoden	8
3.1. Definition der Kollektive und Studiendesign	8
3.1.1. Lungengesunde	8
3.1.2. Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale	10
3.2. Lungenfunktionsmessung	10
3.2.1. Lungenfunktionsmessplatz	10
3.2.2. Lungenfunktionsprüfung	10
3.3. Inhalativer Methacholin-Provokationstest	11
3.3.1. ZAN 200 ProvAir II	11
3.3.2. DeVilbiss 646 Vernebler	16
3.3.3. Vorversuche zur Kalibrierung der Verneblerleistung	18
3.3.4. Provokationssubstanz	22
3.3.5. Provokations-Protokoll	24
3.4. Auswertung	26
3.5. Statistik	27
4. Ergebnisse	29
4.1. Vergleich der Untersuchungskollektive	29
4.2. Ergebnisse der Methacholin-Provokation	31
4.3. Einsekundenkapazität FEV1	32
4.3.1. FEV1 - Ausgangsbefunde	32
4.3.2. FEV1 - Verlauf während der Provokation	34
4.4. Flusswerte	37
4.4.1. Peak Expiratory Flow (PEF)	37
4.4.2. Maximale expiratorische Flusswerte (MEF)	38

4.5. Atemwegswiderstand und Atemwegsleitfähigkeit	41
4.5.1. Totaler Atemwegswiderstand R_{tot}	41
4.5.2. Spezifische Atemwegsleitfähigkeit sG_{tot}	42
4.6. Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{\text{tot}} \geq 0,5$	44
4.6.1. Lineare Regressionen	44
4.6.2. Provokationsdosen - Aufstellung der individuellen Ergebnisse . . .	51
4.6.3. Auswertung der Provokationsdosen - deskriptive Statistik	53
4.6.4. Kaplan-Meier-Kurven	55
4.6.5. ROC-Kurven bei Berücksichtigung bis 2000 μg	57
4.6.6. ROC-Kurven bei Berücksichtigung bis 1000 μg	63
4.6.7. Korrelation zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{\text{tot}} \geq 0,5$	70
5. Diskussion	72
5.1. Material und Methoden	72
5.2. Ergebnisse	76
5.3. Vergleich mit anderen Protokollen	81
5.4. Ausblick	87
6. Zusammenfassung	88
Literaturverzeichnis	90
Abbildungsverzeichnis	101
Tabellenverzeichnis	102
A. Anhang	104
B. Danksagung	107
C. Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
äquiv.	äquivalent
ATS	American Thoracic Society
AZ	Atemzug / Atemzüge
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
d.h.	das heißt
ε	Epsilon (hier als Abkürzung für die Klasse des Immunglobulins IgE)
ECP	Eosinophilic Cationic Protein
engl.	englisch
ERV	Expiratorisches Reservevolumen
expir.	expiratorisch
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde = Absolute Einsekundenkapazität
FEV1.0	FEV1 nach Inhalation von 0 μg Methacholinchlorid, entsprechend FEV1.20 nach 20 μg usw.
FEV1 % PN	FEV1 % Predicted Normal
FEV1 % VC IN	Relative Einsekundenkapazität
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte / Monocyte Colony-Stimulating Factor
IgE	Immunglobulin E
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-13	Interleukin-13
ITGV	Intrathorakales Gasvolumen
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Kilogramm

Konz.	Konzentration
kPa	Kilopascal
l	Liter
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
Lsg.	Lösung
M ₂ -Rezeptor	Mukarinischer Acetylcholinrezeptor des Parasympathikus Subtyp 2
M ₃ -Rezeptor	Mukarinischer Acetylcholinrezeptor des Parasympathikus Subtyp 3
MBP	Major Basic Protein
MCH	Methacholinchlorid
MEF25	Maximaler expiratorischer Fluss bei 25 % ausgeatmeter Vitalkapazität
MEF50	Maximaler expiratorischer Fluss bei 50 % ausgeatmeter Vitalkapazität
MEF75	Maximaler expiratorischer Fluss bei 75 % ausgeatmeter Vitalkapazität
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteasen
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
PAF	Platelet Activating Factor
p	p-Wert (Wahrscheinlichkeit der Übertragung falsch-positiver Unterschiede von der Studie auf die Grundgesamtheit)
PC	Provokationskonzentration
PD	Provokationsdosis
PD Minimal	Provokationsdosis Minimal (niedrigste Provokationsdosis)
PD $R_{tot} \geq 0,5$	Provokationsdosis, bei der R_{tot} auf 0,5 kPa*s/l angestiegen ist
PD 100 R_{tot}	Provokationsdosis, bei der sich der Atemwegswiderstand verdoppelt hat
PD 20 FEV1	Provokationsdosis 20 FEV1, d.h. Dosis, bei der die FEV1 um 20 % abgefallen ist
PEF	Peak Expiratory Flow = Expiratorischer Spitzenfluss
PN	Predicted Normal
®	geschütztes Warenzeichen
R ²	Bestimmtheitsmaß (Statistisches Maß für die Qualität einer Approximation)
RIST	Radio-Immuno-Sorbens-Test zur Bestimmung des Gesamt-IgE im Serum

RAST	Radio-Allergo-Sorbens-Test zur Bestimmung des Allergen-spezifischen IgE im Serum
ROC	Receiver Operating Characteristic (Statistische Methode)
RV	Residualvolumen
R_{tot}	Totaler Atemwegswiderstand
s	Sekunde
s.	siehe
σ	Standardabweichung SD
SD	Standarddeviation = Standardabweichung = σ
sG_{tot}	Spezifische Leitfähigkeit der Atemwege
Tab.	Tabelle
TLC	Totale Lungkapazität
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
u.	und
u.a.	unter anderem
V	Volumen
VC	Vitalkapazität
VC IN	Inspiratorische Vitalkapazität
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
\bar{x}	Mittelwert
\tilde{x}	Median

1. Einleitung

„Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion charakterisiert ist“ (Buhl *et al.*, 2006); so lautet die Definition des Asthma bronchiale in der Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma, herausgegeben von der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Die epidemiologische und sozioökonomische Bedeutung des Asthma bronchiale hat in den vergangenen Jahrzehnten vor allem in den hochentwickelten westlichen Ländern stark zugenommen. In der Bundesrepublik Deutschland gehört das Asthma zu den häufigsten chronischen Erkrankungen; ca. zehn Prozent der kindlichen (Beasley *et al.*, 1998; Mutius *et al.*, 1994) und vier bis fünf Prozent der erwachsenen Bevölkerung sind aktuell betroffen (Heinrich *et al.*, 2002; Nowak *et al.*, 1996a, 2004; Nowak und Mutius, 2004). Volkswirtschaftlich heißt das, dass bzgl. der Krankheitskosten ein Gesamtbetrag von ungefähr 2,6 Milliarden Euro pro Jahr anfällt (Nowak *et al.*, 1996b). Für die Zunahme der Prävalenz des Asthma bronchiale wird vor allem die Zunahme der Prävalenz allergischer Erkrankungen verantwortlich gemacht (Beasley *et al.*, 1998). Der Grund für die Zunahme atopischer Sensibilisierungen ist dabei bisher nur unzureichend verstanden (Hopkin, 1997). Es scheint sich jedoch abzuzeichnen, dass sich sowohl der Anstieg in der Prävalenz von allergischen Erkrankungen als auch des Asthma bronchiale augenblicklich etwas verlangsamt (Weiland und Pearce, 2004).

Dass die bronchiale Hyperreagibilität einen zentralen Punkt im Krankheitsverständnis des Asthmas darstellt, darauf verweist bereits die oben angeführte Definition. Im Gegensatz zur bisher wenig erfolgreichen Ursachenforschung bzgl. der Steigerung der Allergieprävalenz gab es in den letzten Jahren deutliche Fortschritte im Hinblick auf die Pathogenese des Asthmas und damit auch der Pathogenese der bronchialen Hyperreagibilität. Diese Erkenntnisse haben die Bedeutung der bronchialen Hyperreagibilität für die Krankheitsentstehung noch weiter in den Vordergrund treten lassen (NIH, 1998; Wettengel *et al.*, 1999). Man weiß heute, dass vor allem immunologische Vorgänge auf molekularer und zellbiologischer Ebene neben genetischer Disposition (z.B. der Existenz eines Genlocus für bronchiale Hyperreagibilität auf Chromosom 5 (Postma *et al.*, 1995)

und Umwelteinflüssen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Asthmas spielen (Beeh und Buhl, 2001). Dabei handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Teilen des Immunsystems. Für die Initiierung der allergischen Reaktion, also der allergischen Typ-I-Sofortreaktion, sind Immunglobulin E-Antikörper (IgE), die bei entsprechender Sensibilisierung aus B-Lymphozyten freigesetzt werden, verantwortlich. Sie verursachen die Mediatorfreisetzung (Histamin, Leukotriene, IL-5, TNF- α) aus Mastzellen und Basophilen, was zu einem akuten Bronchospasmus führt (Beeh und Buhl, 2001; Durham, 1998). Die erhöhte Bereitschaft zur IgE-Synthese bei Atopikern wird durch T_{H2}-spezifische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) induziert. Daher interpretiert man das Asthma auch weitgehend als T_{H2}-Helfer-Zell-dominierte Immunantwort mit IgE-Isotypen-Wechsel in B-Zellen (ϵ -Switch) und eosinophil dominierter Entzündungsantwort (Walker *et al.*, 1991).

Sowohl durch die T_{H2}-spezifischen Zytokine als auch durch Mastzellmediatoren kommt es zum Einstrom von proinflammatorischen Effektorzellen, v.a. eosinophilen Granulozyten, in die Bronchialschleimhaut, woraus nach vier bis sechs Stunden das Vollbild der asthmatischen Spätreaktion resultiert. Nach heutigem Kenntnisstand ist diese Spätreaktion die Hauptursache für die Persistenz und die Chronifizierung der Erkrankung (Beeh und Buhl, 2001). Dabei besteht ein klarer Zusammenhang zwischen Gewebeseosinophilie, asthmatischer Entzündung und klinischen Parametern wie Hyperreagibilität (z.B. im unspezifischen Methacholinprovokationstest) und Grad der Atemwegsobstruktion (Griffin *et al.*, 1991; Kroegel, 1990). Wesentlich mitverantwortlich für die Aktivierung der Myelopoese im Knochenmark zugunsten der Eosinophilen, deren Rekrutierung, Proliferation, Differenzierung, Aktivierung und Apoptoseinhibition scheint dabei neben GM-CSF das während der allergischen Sofortreaktion vor allem von Mastzellen freigesetzte IL-5 zu sein (Clutterbuck *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1998). Aufgrund dieser mannigfaltigen Wirkungen des IL-5 erklärt sich auch mitunter die klinische Beobachtung, dass sich bei topischer nasaler Corticoidtherapie einer allergischen Rhinitis als Nebeneffekt häufig auch eine begleitende bronchiale Hyperreagibilität bessert (Corren *et al.*, 1992). Um aus dem Gefäßsystem in die Lunge übertreten zu können, exprimieren Eosinophile in den ersten Stunden der allergischen Spätreaktion, getriggert durch Zytokine aus T-Zellen und TNF- α , vermehrt Adhäsionsmarker (z.B. LFA-1, L-Selectin); gleichzeitig kommt es zur Expression von deren Liganden (z.B. ICAM-1, VCAM-1) sowie zur Bildung von hochpotenten chemotaktischen Faktoren wie Eotaxin auf bzw. in pulmonalen Endothelien (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996; Gundel *et al.*, 1991; Kyan Aung *et al.*, 1991; Rothenberg *et al.*, 1995). Interessanterweise konnte im Tierexperiment die allergische Spätreaktion und die allergeninduzierte bronchiale Hyperreagibilität durch

Gabe von ICAM- bzw. Antiselectinantikörpern ausgeschaltet werden (Wegener *et al.*, 1993). Ihre vielfältigen biologischen Wirkungen am Zielort entfalten die Eosinophilen dann über eine Vielzahl von proinflammatorischen und zytotoxischen Substanzen, darunter die granulären kationischen Proteine MBP (Major Basic Protein), ECP (Eosinophilic Cationic Protein), MMP (Matrixmetalloproteasen) sowie Phospholipide wie PAF (Platelet Activating Factor) und Leukotriene. Man weiß z.B., dass Konzentrationen von MBP, eigentlich ein potentes Helminthotoxin, in der bronchoalveolären Lavage mit der bronchialen Hyperreagibilität gegenüber Methacholin korrelieren (Frigas *et al.*, 1981). Die Matrixmetalloproteasen werden hingegen eher für das langfristige Atemwegsremodelling mitverantwortlich gemacht (Beeh und Buhl, 2001), PAF induziert eine Bronchokonstriktion und erhöht die Endothelpermeabilität (Henderson, 1991), während Leukotriene vorwiegend relevante Mediatorfunktionen erfüllen (Dahlen *et al.*, 1980). Auch IgE scheint in der allergischen Spätreaktion eine Rolle zu spielen. So ist die eosinophile Schleimhautinfiltration der allergischen Spätreaktion im allergischen Mausmodell IgE-abhängig (Coyle *et al.*, 1996). Außerdem haben tierexperimentelle Studien gezeigt, dass sich bei der Übertragung von atopischem Serum sowohl die allergenspezifische (Watson *et al.*, 1997) als auch die unspezifische (Lambert *et al.*, 1998) bronchiale Hyperreagibilität mitüberträgt. Zur Zeit wird untersucht, ob vielleicht sogar unspezifisches polyklonales IgE allergenunabhängig eine bronchiale Hyperreagibilität induzieren kann (Beeh *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1999). Abbildung 1.1 fasst die wichtigsten Zusammenhänge der Immunpathogenese des Asthma bronchiale zusammen:

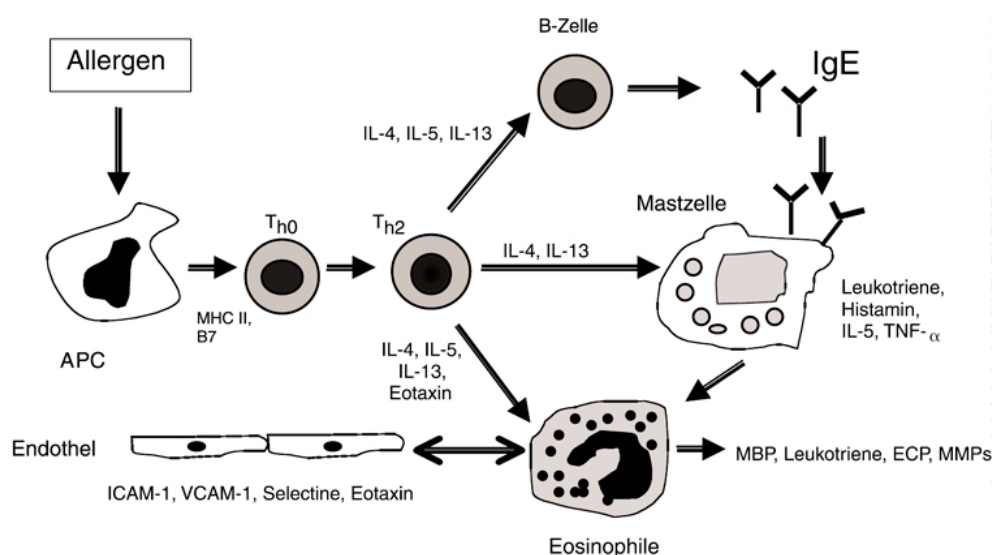


Abbildung 1.1.: Immunpathogenese des Asthma bronchiale (Beeh und Buhl, 2001)

Doch nicht alle Aspekte des Asthmas sind allein durch entzündliche Prozesse zu erklären, etwa die starke Variabilität in der Atemwegsobstruktion. Für letzteres wird u.a. der Einfluss von hypertrophierten und hyperplasierten glatten Muskelzellen mitverantwortlich gemacht, ein Mechanismus, der auch das langfristige Atemwegsremodelling erklären könnte (Beeh und Buhl, 2001; Ebina *et al.*, 1993). Weiterhin spielen Wechselwirkungen zwischen autonomen Nervenfasern und inflammatorischen Prozessen offensichtlich eine Rolle, und zwar sowohl bei der Initiierung der entzündlichen Vorgänge durch nervale Stimulation (neurogene Inflammation) als auch durch nervale Dysfunktion als Folge der chronischen Entzündung (Barnes, 1992a,b). Der parasympathische Neurotransmitter Acetylcholin entfaltet seine bronchokonstriktorische Wirkung über muskarinerge M_3 -Rezeptoren. Über negative Feedbackmechanismen regulieren hingegen M_2 -Rezeptoren die Transmitterfreisetzung (John *et al.*, 1997). Im Tiermodell kommt es nach Allergenprovokation zu einer M_2 -Rezeptor-Dysfunktion mit Verlust der regulatorischen Aktivität und damit zu einer verstärkten Bronchokonstriktion und unspezifischen bronchialen Hyperreagibilität (Costello *et al.*, 1998b). Diese Dysfunktion scheint jedoch wiederum von der Präsenz Eosinophiler abzuhängen, insbesondere von der Anwesenheit von IL-5 und MBP, deren Einfluss auf die bronchiale Hyperreagibilität bereits erläutert wurde (Elbon *et al.*, 1995). Darüber hinaus greifen afferente sensorische C-Fasern durch die Sezernierung von potenten Neuropeptiden wie Substanz P und Neurokinin A und B auch aktiv in den Entzündungsprozess ein, denn diese Neuropeptide bewirken ihrerseits Bronchokonstriktion, Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität, Mukusproduktion und die weitere Rekrutierung von proinflammatorischen Effektorzellen (Barnes, 1992b; Costello *et al.*, 1998a).

Dieser Exkurs in die Genetik und die Immunologie des Asthma bronchiale soll zeigen, dass fast allen diesen Pathomechanismen eines gemein ist, nämlich die Induktion einer bronchialen Hyperreagibilität als zentrales Element der Krankheitsentstehung beim Asthma bronchiale. Unter bronchialer Hyperreagibilität versteht man eine übersteigerte Empfindlichkeit der unteren Atemwege auf unspezifische Atemwegsirritanzen, die zu einer Atemwegsobstruktion führen kann. Zu diesen Stimuli zählen zum Beispiel körperliche Belastung, forcierte Atemmanöver, Kaltluft- und Nebelexposition, Inhalation von Stäuben, Autoabgasen, Schwefeldioxid und Ozon sowie manche Medikamente und pharmakologische Substanzen wie z.B. Histamin, Acetylcholin und Methacholin (Benson, 1979; Boushey *et al.*, 1980; Klein und Matthys, 1986; Konietzko, 1982; Schlegel, 1988). Zur Diagnose eines Asthma bronchiale bedarf es daher nach Leitlinien (Buhl *et al.*, 2006) definitionsgemäß des Nachweises einer bronchialen Hyperreagibilität in Kombination mit einer entsprechenden klinischen Symptomatik. In der Diagnostik, insbesondere bei leicht-

bis mäßiggradigen, evtl. auch nur saisonalen Verläufen mit intermittierend völlig normwertiger Lungenfunktion, und der Therapiekontrolle bei Asthmapatienten sowie in klinischen Studien spielt die Diagnostik der bronchialen Hyperreagibilität eine zentrale Rolle (Klein *et al.*, 1998). Hierzu hat sich in vielen Untersuchungen der unspezifische Provokationstest mit Methacholinchlorid als eine geeignete Methode erwiesen, die daher auch weltweit als Standard zur Untersuchung der bronchialen Hyperreagibilität anerkannt ist (Crapo *et al.*, 2000). Allerdings ist es bisher nicht gelungen, ein einheitliches Protokoll zu etablieren (Benson, 1979; Klein *et al.*, 1998; Schlegel, 1988). Dies liegt in verschiedenen Problemen begründet. Zum einen erschwert die große inter- und intraindividuelle Schwankungsbreite der bronchialen Reaktion auf die Provokationstestung den Vergleich verschiedener Methoden und Protokolle. Zum anderen gibt es nach wie vor keine zufriedenstellende Methode der präzisen Dosisapplikation in die Atemwege. Trotz neuer technischer Entwicklungen, z.B. von inspirationsgetriggerten Dosimetersystemen, ist die Dosisapplikation noch zu ungenau. Auch begibt man sich in der klinischen Routine in den Spagat zwischen Sicherheit und Genauigkeit der Methode einerseits, die beide eine Steigerung der Dosis in kleinen Stufen erfordern, und zeitökonomischen Gründen andererseits. Der Zeitfaktor ist dabei nicht nur hinsichtlich der klinischen Praktikabilität von Bedeutung, sondern auch aufgrund des Abklingverhaltens der Methacholinwirkung. Bereits nach ca. 120 Sekunden beginnt die Wirkung des Methacholins wieder nachzulassen, nach durchschnittlich 45 Minuten besteht keine Wirkung der Erstgabe im Sinne eines positiven Tests mehr, so dass das Testverfahren in diesem Zeitfenster zur Berechnung einer korrekten Quasi-Kumulativedosis abgeschlossen sein sollte (Cartier *et al.*, 1983; Chai *et al.*, 1975; Klaustermeyer *et al.*, 1979; Lourenco, 1982; Schlegel, 1988). Im Hinblick auf die immense Bedeutung der bronchialen Hyperreagibilität als zentraler Parameter der Krankheitsentstehung, der Schwere der Erkrankung und des Therapieerfolges ist es daher zwingend notwendig, die Provokationstestung kontinuierlich weiterzuentwickeln, sei es mittels verbesserter technischer Methoden und Protokolle mit bewährten Substanzen wie dem Methacholin oder sei es mit Hilfe neuer Substanzen wie z.B. dem Mannitol. Ersterem Ziel ist daher auch die hier vorliegende Studie unterstellt.

2. Ziel der Untersuchung

Trotz zahlreicher Bemühungen um ein weltweit anerkanntes, standardisiertes und reproduzierbares Methacholin-Provokationsprotokoll in der Diagnostik der bronchialen Hyperreagibilität ist es bis jetzt nicht gelungen, ein solches zu etablieren. Daher gilt nach wie vor, dass jedes Lungenfunktionslabor eine eigene Validierung des Methacholin-Provokationsprotokolls durchführen muss (Britton und Tattersfield, 1986; Hargreave *et al.*, 1985; Klein *et al.*, 1998; Klein und Matthys, 1986; Prätter und Irwin, 1984; Schultze-Werninghaus, 1985). Der Grund hierfür liegt neben zahlreichen nicht-technischen Faktoren, die zu inter- und intraindividuellen Schwankungen führen können, wie z.B. Medikation, Atemwegsinfekte und Allergenkontakt (Benson, 1979; Cheung *et al.*, 1995; Cockcroft und Swystun, 1997; Crapo *et al.*, 2000; Derom *et al.*, 1992; Empey *et al.*, 1976; Freezer *et al.*, 1995; Greenspon und Morrissey, 1986; Jensen *et al.*, 1998; Juniper *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1998; Lemièrre *et al.*, 1996; Magnussen *et al.*, 1995; Schlegel, 1988; Wilson *et al.*, 1987), vor allem auch in der Methodik selbst. Zahlreiche Einflüsse wie z.B. apparative Voraussetzungen, Art der Vernebelung, Wahl der Provokationssubstanz und deren Verarbeitung, Partikelgröße, Messung der Lungenfunktionsparameter und deren Auswertung können das Ergebnis beeinflussen (Crapo *et al.*, 2000; Schlegel, 1988). Dennoch ist der unspezifische inhalative Provokationstest mit Methacholin der am weitesten verbreitete Standard in der Diagnosestellung der bronchialen Hyperreagibilität (Crapo *et al.*, 2000).

Die vorliegende Untersuchung hat das Ziel, ein verbessertes Provokationsprotokoll mittels Dosimetermethode zu validieren und in der klinischen Routine zu etablieren. Dabei sollten möglichst viele aus verschiedenen Publikationen und eigenen Erfahrungen bekannte Ungenauigkeiten und Fehlerquellen der Methode minimiert, die Sicherheit des Patienten und die Praktikabilität in der klinischen Routine gewährleistet werden und klar zwischen pathologischer und physiologischer Reaktion getrennt werden können. Als Grundlage diene die Dosimetermethode nach Chai (Chai *et al.*, 1975), bei der die Konzentrationen der zu inhalierenden Lösung von Schritt zu Schritt verdoppelt werden. Dies hat jedoch den Nachteil, aufgrund der verschiedenen Konzentrationen aufwendig und potentiell fehlerträchtig zu sein und im klinischen Alltag die Gefahr falscher Anfangs-

konzentrationen zu bergen. In Anlehnung daran erfolgte die Dosissteigerung in der hier vorliegenden Untersuchung nicht über eine Verdopplung der Konzentrationen, sondern nur über eine Erhöhung der Anzahl der Atemzüge bei gleichbleibender Konzentration der Methacholinchloridlösung. Schlegel et al. hatten diese Vorgehensweise hinsichtlich der Dosisapplikation bereits erfolgsversprechend an gesunden Versuchsteilnehmern getestet (Schlegel *et al.*, 1994a). Schließlich stellt sich die Frage, ob die ermittelte Schwellendosis zwischen physiologischer und pathologischer Reaktion sowie die Sensitivität und Spezifität der Methode mit Ergebnissen anderer Labors und Publikationen vergleichbar sind.

3. Materialien und Methoden

3.1. Definition der Kollektive und Studiendesign

Ziel der Validierung eines inhalativen Methacholin-Provokationsprotokolls ist es, einen Schwellenwert zwischen physiologischer und pathologischer Reaktion zu definieren, um Personen mit bzw. ohne bronchiale Hyperreagibilität sicher voneinander trennen zu können. Obwohl es im Bereich klinischer Studien üblich ist, neue Testmethoden primär an gesunden Probanden zu erproben, ist es daher für diese Fragestellung notwendig, ein Kollektiv von lungengesunden Patienten als Kontrollgruppe mit einem Kollektiv von Patienten mit klinisch und lungenfunktionstechnisch gesicherter bronchialer Hyperreagibilität zu vergleichen. Dieses Verfahren beinhaltet zwangsläufig insbesondere für den Asthmatiker als individuelle Testperson eine für ihn zum Untersuchungszeitpunkt weder diagnostisch noch therapeutisch indizierte Intervention mit Gefährdungspotential durch die Provokationssubstanz. Es bedarf daher einer ausdrücklichen Genehmigung durch die zuständige Ethik-Kommission, welche für die hier vorliegende Untersuchung bei der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz eingeholt wurde (s. Anhang).

3.1.1. Lungengesunde

Alle als lungengesund eingestuften Probanden erfüllten folgende Einschlusskriterien:

- Keine bronchopulmonalen Vorerkrankungen in der Anamnese
- Nieraucher
- Negative spezielle allergische Anamnese
- Negativer Prick-Hauttest
- Normwertiges Gesamt-IgE (RIST)
- Kein Nachweis allergospezifischer IgE-Antikörper (RAST)

- Infektfreiheit zum Untersuchungszeitpunkt
- Keinerlei auf einen Atemwegsinfekt hinweisende Symptomatik innerhalb der letzten sechs Wochen vor der Untersuchung
- In der Ausgangsmessung normale Lungenfunktion (Spirometrie, Fluss-Volumen-Kurve, Bodyplethysmographie)

Im Prick-Hauttest wurden dabei folgende Allergene getestet:

- Kontrolllösungen: NaCl, Histamin
- Gräser/Getreide: Gräsermischung, Roggen
- Frühblüher: Birke, Hasel, Erle
- Kräuter: Beifuß, Spitzwegerich
- Milben: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*
- Tierhaare: Hundehaare, Katzenhaare, Meerschweinchenhaare, Pferdehaare
- Pilze: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*
- Vogelfedern

Auf folgende allergospezifische IgE-Antikörper (RAST) wurde getestet:

- Gräser/Getreide: Lieschgras
- Frühblüher: Birke
- Kräuter: Beifuß
- Milben: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*
- Tierhaare: Hundepithelien, Katzenschuppen
- Pilze: *Alternaria alternata/tenuis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*
- Nussmischung
- Milcheiweiß

3.1.2. Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale

Folgende Einschlusskriterien mussten Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale erfüllen:

- Ärztlich diagnostiziertes exogen allergisches Asthma bronchiale
- Keine akute Exazerbation des Asthma bronchiale zum Untersuchungszeitpunkt
- Infektfreiheit zum Untersuchungszeitpunkt
- In der Ausgangsmessung (weitgehend) normale Lungenfunktion (Spirometrie, Fluss-Volumen-Kurve, Bodyplethysmographie)
- Bereitschaft, innerhalb der letzten 24 Stunden vor der Messung auf inhalative Corticoide und langwirksame Betasympathomimetika sowie innerhalb der letzten 12 Stunden auf kurzwirksame Betasympathomimetika zu verzichten

3.2. Lungenfunktionsmessung

3.2.1. Lungenfunktionsmessplatz

Die Lungenfunktionsprüfung erfolgte mit Hilfe des Bodyplethysmographiesystems MasterScreen Body der Firma Jaeger, Würzburg. Das System wurde vor jeder Messung den Herstellerangaben gemäß kalibriert.

3.2.2. Lungenfunktionsprüfung

Bei jedem Messvorgang wurde eine Spirometrie zur Erhebung der statischen und dynamischen Lungenvolumina und Darstellung der Fluss-Volumen-Kurve sowie eine Bodyplethysmographie zur Messung des Atemwegwiderstandes und des intrathorakalen Gasvolumens durchgeführt. Für die Auswertung wurden folgende Messgrößen berücksichtigt (s. Tab. 3.1):

Tabelle 3.1.: Ausgewertete Lungenfunktionsparameter

Messmethode	Parameter	Einheit	Bedeutung
Spirometrie	FEV1	l	Einsekundenkapazität
	FEV1 % VC IN	%	Relative Einsekundenkapazität
	PEF	l/s	Peak Flow (= Exspir. Spitzenfluss)
	MEF _{75,50,25}	l/s	Maximaler exspir. Fluss bei 75, 50, 25 % noch ausatembarer VC
Bodyplethysmographie	R _{tot}	kPa*s/l	Totaler Atemwegswiderstand
	sG _{tot}	l/kPa*s	Spezifische Atemwegsleitfähigkeit

Die Atemmanöver wurden vor der eigentlichen Provokationstestung mit den Patienten und Probanden geübt, um eine größtmögliche Reproduzierbarkeit und Unabhängigkeit von der Mitarbeit sicherzustellen. Während der Testung wurden die erzielten Lungenfunktionsparameter auf ihre Plausibilität überprüft und gegebenenfalls einzelne Messschritte oder die ganze Messung wiederholt. Alle Messungen wurden den Empfehlungen in der Literatur folgend 1 - 3 Minuten nach dem letzten Inhalationschritt durchgeführt (Cartier *et al.*, 1983; Chai *et al.*, 1975; Crapo *et al.*, 2000; Klaustermeyer *et al.*, 1979; Lourenco, 1982; Schlegel, 1988). Für die Ermittlung der absoluten und relativen alters-, geschlechts- und gewichtsspezifischen Sollmittelwerte wurden die Sollwerte der Europäischen Gemeinschaft für Kohle und Stahl (EKGS) herangezogen.

3.3. Inhalativer Methacholin-Provokationstest

3.3.1. ZAN 200 ProvAir II

Zur Applikation der Methacholin-Dosen wurde der ZAN 200 ProvAir II der Firma ZAN Messgeräte GmbH, Mitglied der nSpire Health Gruppe, verwendet. Bei dem Gerät handelt es sich um ein Dosimetersystem. Dies sind Systeme, die atemzuggetriggert eine definierte Aerosolmenge freisetzen. Ihre Anwendung ist im allgemeinen mit einer besseren Reproduzierbarkeit verbunden als eine vom Patienten selbst aktivierte Vernebelung oder eine Dauervernebelung mit Ruheatmung (Klein *et al.*, 1998). Den exakten, den Herstellerangaben entsprechenden Versuchsaufbau zeigen die Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3. Als Verneblertopf wurde der DeVilbiss 646 Vernebler verwendet (s. Abb. 3.5 und 3.6).



Abbildung 3.1.: ZAN 200 ProvAir II (nSpire Health GmbH, 2008)

Nach Einschalten des Gerätes ist der Kompressor nach wenigen Sekunden betriebsbereit. Vor jeder Vernebelung muss die Start-Taste auf der Fernbedienung betätigt werden. Die Nase des Patienten ist mittels einer Nasenklammer zu verschließen. Wenn der Patient anschließend vertieft einatmet, wird, durch den Atemsensor getriggert, die Vernebelung der Provokationssubstanz während der Inspiration für 0,6 Sekunden automatisch ausgelöst. Am Ende der Inspiration sollte der Patient jeweils für einige weitere Sekunden die Luft anhalten, um eine adäquate Deposition der Provokationssubstanz in den peripheren Atemwegen zu gewährleisten (Crapo *et al.*, 2000). Der Betriebsdruck beträgt 2,4 bar +/- 5%, der Flow 7 l/min +/- 5%. Die Einatmung erfolgt nur über das Verneblersystem. Die Partikelgröße beträgt laut Herstellerangaben 0,3 - 0,5 μm . Vor jeder Vernebelung ist die Start-Taste erneut zu betätigen. Die Anzahl der Vernebelungen wird bis zehn Vernebelungen in der Anzeige auf der Fernbedienung mitgezählt. Aus der ausgeatmeten Luft wird mittels eines Atemfilters, dem ein Einwegventil vorgeschaltet ist, die Provokationssubstanz herausgefiltert, um die Kontamination der Raumluft so minimal wie möglich zu halten. Auch eine Rückatmung durch den Probanden ist somit nicht möglich.

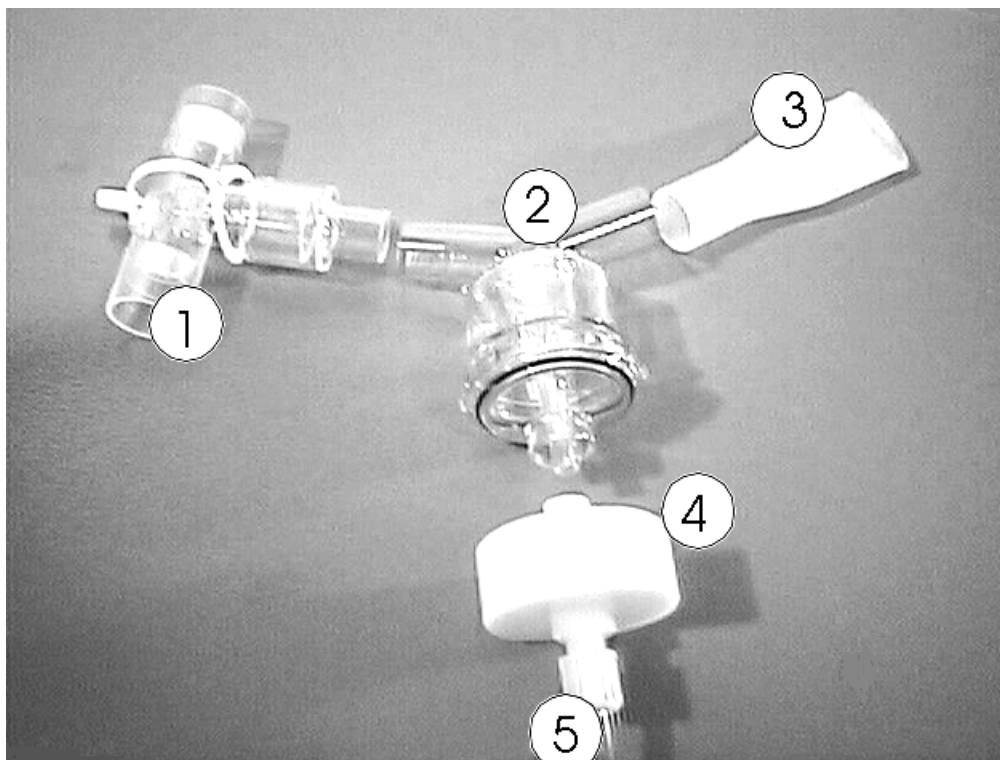


Abbildung 3.2.: ZAN 200 ProvAir II (nSpire Health GmbH, 2008)

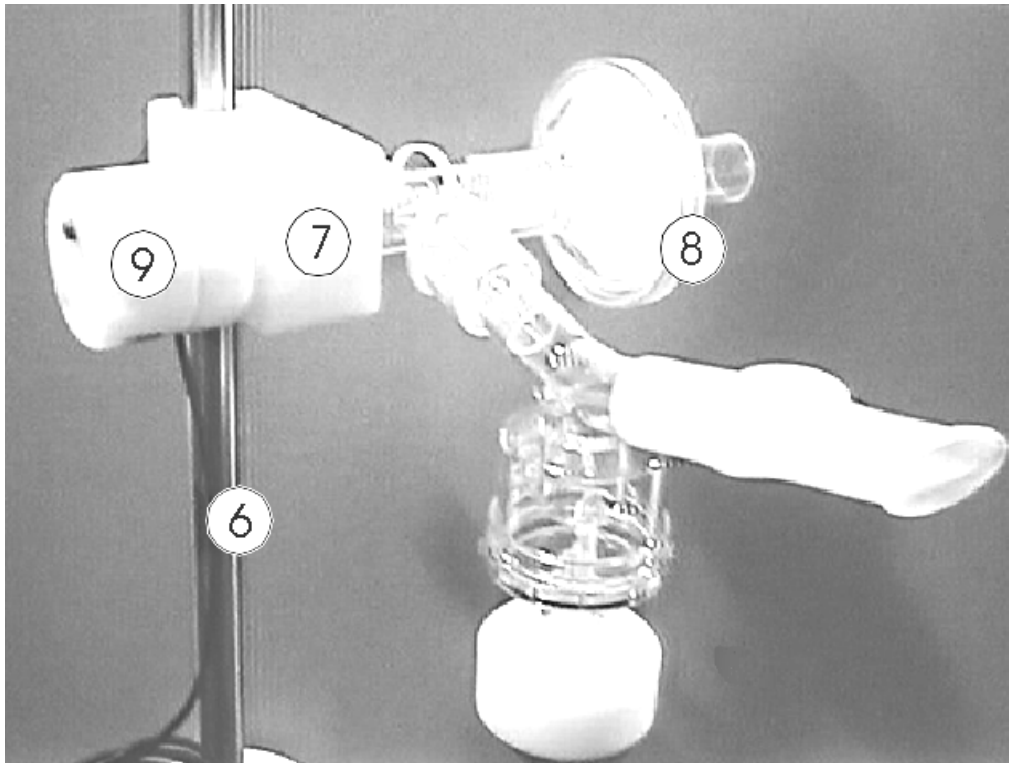


Abbildung 3.3.: ZAN 200 ProvAir II (nSpire Health GmbH, 2008)

Technische Erläuterung:

1. T-Ventil
2. Vernebler DeVilbiss 646
3. Patientenmundstück
4. Schnelladapter für Druckschlauch
5. Druckschlauch
6. Stativstange
7. Klemmhalter
8. Atemfilter
9. Atemerkennung

Das Pneumatikschema in Abbildung 3.4 veranschaulicht die technische Funktionsweise des Systems.

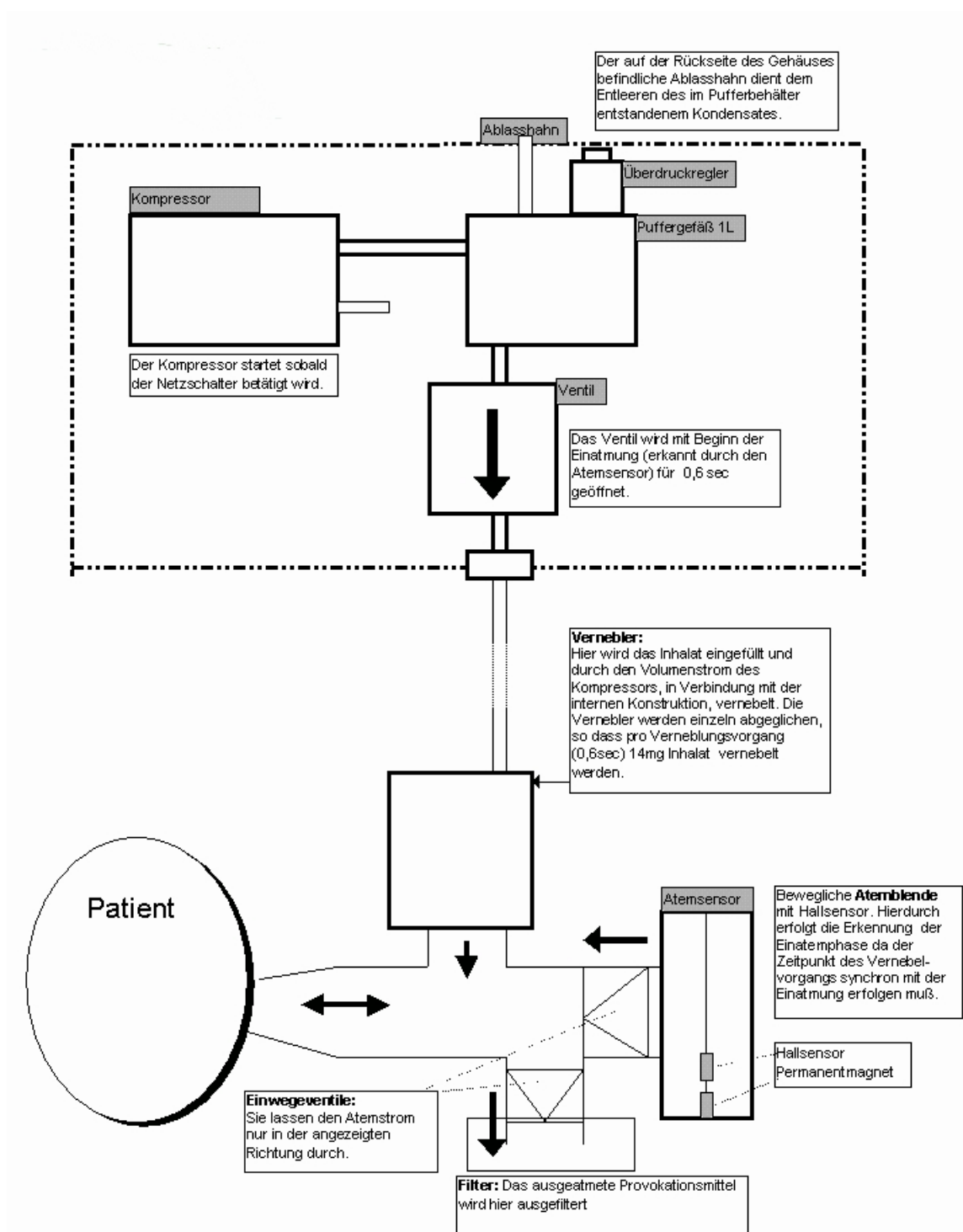


Abbildung 3.4.: Pneumatikschema (nSpiere Health GmbH, 2008)

3.3.2. DeVilbiss 646 Vernebler

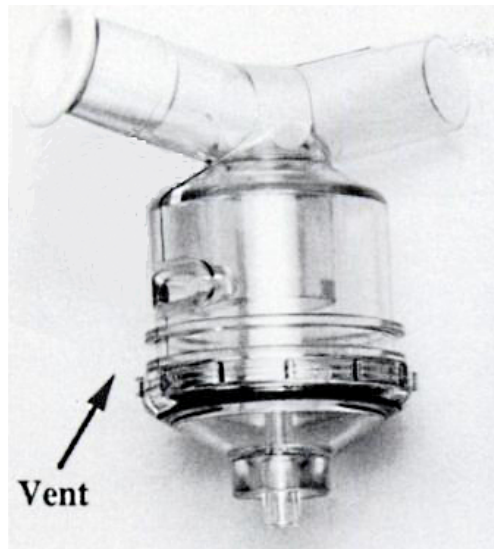


Abbildung 3.5.: DeVilbiss 646 (Hollie *et al.*, 1991)

Der Vernebler DeVilbiss 646 (s. Abb. 3.5 und Abb. 3.6) ist laut Literatur (Crapo *et al.*, 2000) der am häufigsten verwendete Verneblertopf im Rahmen von inhalativen Provokationstests mit Dosimeterprotokollen und wird auch vom Hersteller des ZAN 200 ProvAir II zur Verwendung empfohlen. Er besteht aus einem Ober- und einem Unterteil. Das Unterteil muss mit zwei Millilitern der Provokationssubstanz befüllt werden. Hier befindet sich auch die Verneblerdüse sowie der Druckluftanschluss. Am Oberteil werden das Mundstück sowie das T-Stück des ZAN 200 Prov Air II, das die Verbindung zum Atemsensor sowie zum Ausatemfilter herstellt, angeschlossen. Außerdem befindet sich seitlich am Oberteil eine als Vent bezeichnete Öffnung, durch die Luft angesaugt wird; dies führt zu einer höheren Verneblerleistung. Es ist darauf zu achten, dass sowohl Vent als auch Impinger Arm (s. Abb. 3.6) während der Validierung und in der späteren klinischen Routine stets in die gleiche Richtung zeigen; eine bestimmte Richtung kann jedoch nicht empfohlen werden (Crapo *et al.*, 2000; Hollie *et al.*, 1991). In dieser Versuchsreihe wurden sowohl der Vent als auch so gut wie möglich der Impinger Arm zum Patienten hin ausgerichtet. In der Literatur herrscht keine einheitliche Meinung, ob der Vent bei der Testung geöffnet oder geschlossen sein sollte. Für einen geschlossenen Vent (s. Abb. 3.6) spricht die Tatsache, dass durch die Öffnung beträchtliche Mengen Flüssigkeit verloren gehen können, wodurch bei der Kalibrierung der Verneblerleistung eine falsch hohe Vernebelungsmenge vorgetäuscht werden kann (s. auch Kapitel Vorversuche zur Kalibrierung der Verneblerleistung). Allerdings sinkt die Verneblerleistung bei geschlossenem Vent um ca. ein Drittel (Crapo *et al.*, 2000; Dolovich, 1985; Mercer

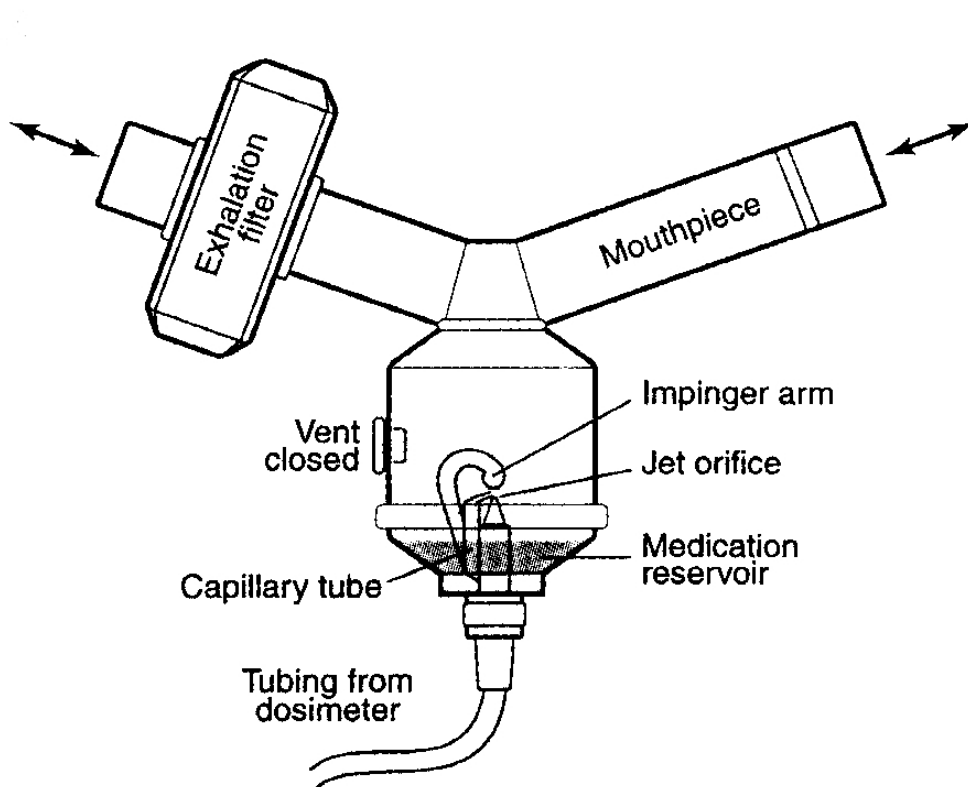


Abbildung 3.6.: DeVilbiss 646 - Schema (Crapo *et al.*, 2000)

et al., 1969). Für einen offenen Vent (s. Abb. 3.5) spricht daher zum einen die höhere Verneblerleistung; zum anderen ist auch zu bedenken, dass bei Validierung des Protokolls mit geschlossenem Vent und dann versehentlicher Öffnung des Vents bei der Routinemessung der Patient durch Applikation einer zu hohen Dosis gefährdet wird, so dass schon aus diesem Grund ein offener Vent vorzuziehen ist.

Der Vernebler ist mit exakt zwei Millilitern Lösung zu befüllen, da sich die Verneblerleistung bei höheren oder niedrigeren Mengen ändert. Diese Menge an Lösung ist für maximal zehn Atemzüge ausreichend. Wichtig ist auch, dass vor dem eigentlichen Beginn der Provokationstestung der Vernebler ausreichend mit Flüssigkeit benetzt ist, da sonst die dem Patienten applizierte Dosis aufgrund von Verlusten von Lösung an die Wand des Verneblertopfes (s. auch Kapitel Vorversuche zur Kalibrierung der Verneblerleistung) sinkt.

Insgesamt ist leider festzustellen, dass die Verneblerleistung aufgrund der zahlreichen Fehlerquellen ausgesprochen variabel ist. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen (s. nächstes Kapitel) bestätigen diesbezüglich die existierende Literatur (Arossa *et al.*, 1984; Ferron *et al.*, 1976; Hollie *et al.*, 1991; Jörres *et al.*, 1992; Massey *et al.*, 1982; Merkus *et al.*, 1992; Sterk *et al.*, 1984).

3.3.3. Vorversuche zur Kalibrierung der Verneblerleistung

Die Methacholin-Provokation ist, wie oben beschrieben, ein seit vielen Jahren bewährtes Verfahren im Rahmen der Diagnostik einer bronchialen Hyperreagibilität. Entsprechend existieren eine Reihe von Provokationsprotokollen, die jeweils mit Vor- und Nachteilen behaftet sind. Wegen der vielen Ungenauigkeiten und Fehlerquellen der Methode ist es bisher nicht gelungen, ein weltweit oder wenigstens national anerkanntes standardisiertes Verfahren zu etablieren. Dennoch ist die Methode ein zuverlässiges und sicheres Verfahren zur Diagnostik der bronchialen Hyperreagibilität. Jedes Lungenfunktionslabor muss allerdings das von ihm verwendete Protokoll selbst validieren, um Sicherheit, größtmögliche Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Praktikabilität in der Routine optimal miteinander zu vereinbaren (Britton und Tattersfield, 1986; Klein und Matthys, 1986; Klein *et al.*, 1998; Prätter und Irwin, 1984; Schultze-Werninghaus, 1985). Angesichts dieser Problematik war es Ziel dieser Untersuchung, unter Berücksichtigung der Stärken und Schwächen der bestehenden Protokolle ein in der klinischen Routine praktikables und valides Dosimeterprotokoll unter Verwendung einer Provokationslösung mit konstanter Konzentration bei Erhöhung der Dosis über die Anzahl der Atemzüge zu entwickeln.

Der erste Schritt zur Entwicklung des Provokationsprotokolls bestand darin, die vom Hersteller mit 14 ± 1 mg bezifferte Vernebelungsmenge pro Atemzug zu überprüfen. Es wurden zwei DeVilbiss 646-Verneblertöpfchen bei den ersten Vorversuchen verglichen; bei beiden zeigte sich die Tendenz, dass weniger als 14 mg pro Atemzug vernebelt wird. Für die endgültige Eichung der pro Atemzug vernebelten Menge und die anschließend durchgeführten Provokationen wurde das zuverlässigere Verneblertöpfchen verwendet. Alle folgenden Daten wurden mittels dieses Töpfchens gewonnen (Seriennummer 204-9601). In verschiedenen Versuchsmodellen wurde zunächst eine repräsentative Menge Lösung ermittelt, die durch Benetzung des oberen Teils des DeVilbiss 646-Verneblersystems bei zu Provokationsbeginn trockenem Verneblertöpfchen für die Inhalation verloren geht. Dabei zeigte sich, dass erst nach 20 Atemzügen mit einer relativ konstanten Vernebelungsmenge zu rechnen ist. Des Weiteren wurden Fehlerquellen wie

Gewichtsverlust durch Niederschlag von Provokationslösung im Mundstück oder Verlust durch den offenen Vent identifiziert und minimiert.

Der endgültige Versuchsablauf zur Ermittlung der pro Atemzug vernebelten Menge sah dann wie folgt aus: Mittels einer Analysenwaage (Sartorius, Ablesbarkeit 0,0001 g) wurde das Leergewicht des DeVilbiss-Verneblertöpfchens inklusive des Mundstücks bestimmt. Dann wurde der Vernebler mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette mit 2 ml isotonischer NaCl-Lösung befüllt und erneut inklusive des Mundstücks gewogen. Anschließend wurden 20 Vernebelungen respektive Atemzüge zur vollständigen Benetzung des Verneblertöpfchens durchgeführt und erneut gewogen. Als nächster Schritt wurde das Unterteil des Verneblertöpfchens getrocknet, erneut mit 2 ml isotonischer NaCl-Lösung befüllt und gewogen. Von nun an folgte jeweils zehn Mal das gleiche Procedere: Nach zehn Vernebelungen / Atemzügen wurde erneut gewogen und so der Verlust an Lösung ermittelt (Differenzgewicht). Anschließend wurde mit Hilfe einer Spritze mit Injektionskanüle durch das Oberteil des Verneblertöpfchens auf das Ausgangsgewicht vor dem ersten Zyklus der zehn Vernebelungen wiederaufgefüllt und erneut zehn Mal vernebelt.

Insgesamt wurde dieser ganze Versuchsablauf fünf Mal wiederholt, so dass, die vorangehenden Versuche nicht gerechnet, aus insgesamt 500 Vernebelungen die pro Atemzug vernebelte Menge berechnet wurde. Exemplarisch ist im folgenden einer der fünf Versuchsdurchgänge zur Kalibrierung der Verneblerleistung beschrieben:

Kalibrierung der Verneblerleistung - Durchgang 2

Versuchsziel:

Ermittlung der vernebelten Menge Lösung pro Atemzug unter Berücksichtigung der Verlustmenge Lösung durch Benetzung des Oberteils des Verneblers

Versuchsmaterial:

ZAN 200 ProvAir II, DeVilbiss 646 Verneblertopf, Analysenwaage (Ablesbarkeit 0,0001 g), Eppendorf-Pipette, isotonische Kochsalzlösung

Versuchsablauf:

1. Wiegen des Verneblers inklusive Mundstück im leeren, trockenen Zustand (= Leergewicht)
2. Füllung des Verneblers mit 2 ml isotonischer Kochsalzlösung mittels einer Eppendorf-Pipette, erneutes Wiegen (= Gewicht nach 1. Füllung)
3. 20 Vernebelungen / Atemzüge, erneutes Wiegen (= Gewicht nach 20 Vernebelungen)
4. Trocknung des Unterteils des Verneblers, dann Füllung mit 2 ml isotonischer Kochsalzlösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette, erneutes Wiegen (= Gewicht nach 2. Füllung)
5. 10 Vernebelungen / Atemzüge, erneutes Wiegen (= Gewicht nach zehn Vernebelungen) und Bildung des Differenzgewichtes nach jeweils zehn Atemzügen
6. Wiederauffüllen auf das Gewicht nach 2. Füllung mit Hilfe einer Spritze
7. Wiederholung der Schritte 5 und 6 insgesamt zehn Mal

Versuchsdurchführung:

- Leergewicht: 44,9784 g

- Gewicht nach Füllung: 46,9987 g
- Gewicht nach 20 Vernebelungen: 46,7732 g
- Gewicht nach 2. Füllung: 48,1632 g

Tabelle 3.2.: Vorversuch Eichung

Gewicht nach Füllung [g]	Gewicht nach 10 Vernebelungen [g]	Differenzgewicht pro 10 Vernebelungen [g]
48,1632	48,0696	0,0936
48,2130	48,0578	0,1552
48,1622	48,0501	0,1121
48,1552	48,0389	0,1163
48,1594	48,0294	0,1300
48,1558	48,0531	0,1027
48,1622	48,0526	0,1096
48,1759	48,0585	0,1174
48,1555	48,0464	0,1091
48,1517	48,0137	0,1380

Versuchsergebnis:

Nach zehn Versuchsdurchläufen mit jeweils zehn Vernebelungen (s. Tab. 3.2) ergab sich ein Mittelwert von 0,1184 g Lösung pro zehn Vernebelungen, d.h. 11,84 mg pro Vernebelung. Insgesamt zeigte sich also, dass der Verneblertopf weniger als die vom Hersteller angegeben 14 +/- 1 mg pro Atemzug vernebelt. Im Anschluss an die zehn Versuchsdurchläufe befand sich noch etwas mehr als 1,5 ml NaCl-Lösung im Unterteil des Verneblertopfs.

Gesamtergebnis:

Bildet man den Mittelwert aus allen fünf Versuchsdurchläufen (unter Berücksichtigung des aufgrund von Flüssigkeitsverlust durch das Mundstück zu niedrigen und daher korrigierten Mittelwertes aus Durchlauf 3), so erhält man einen Wert von 0,11436 g pro zehn Vernebelungen, d.h. eine Dosis von 11,44 mg pro Atemzug. Dieser Wert liegt unter dem vom Hersteller angegebenen Wert von 14 +/- 1 mg. Dies hat sich in allen Versuchsdurchläufen bestätigt. Es zeigte sich, dass die Verneblertöpfe vom Benutzer selbst auf

ihre Vernebelungsmenge zu überprüfen sind. Weiterhin stellte sich heraus, dass bei der Kalibrierung auf verschiedene Fehlerquellen zu achten ist und diese zu minimieren sind. Erstens ist das Mundstück mitzuwiegen, weil sich unterschiedliche Flüssigkeitsmengen darin sammeln. Nicht zu vermeiden ist, dass ab und zu größere Tropfen Flüssigkeit aus dem Mundstück austreten und so eine zu große Vernebelungsmenge vorgetäuscht wird. Dieser Fehler kann im Bereich von 50 - 100 mg liegen. Zweitens ist der Verneblertopf vor Versuchsstart mit 20 Vernebelungen zu benetzen; in einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass zehn Vernebelungen unter Umständen zu wenig sind für eine repräsentative Benetzung des Verneblersystems. Dies jedoch ist die Voraussetzung für eine möglichst konstante Vernebelungsleistung, da anderenfalls ein Teil der vernebelten Flüssigkeit erst für die Benetzung des Verneblersystems benötigt wird. Drittens ist darauf zu achten, dass keine größeren Tropfen aus dem Vent austreten, weil auch so größere Vernebelungsmengen vorgetäuscht werden. Auch hier beläuft sich der Fehler auf bis zu 100 mg beim Austritt größerer Tropfen.

3.3.4. Provokationssubstanz

Methacholin, ein β -Methyl-Derivat des Acetylcholins aus der Gruppe der quartären Ammoniumverbindungen, ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der langsam hydrolysierenden Muskarinrezeptor-Agonisten. Die Substanz ist unter den Handelsnamen Provocholine® oder Provokit® für inhalative Provokationstests zu beziehen. Pharmakokinetisch wird Methacholin langsamer durch Cholinesterasen abgebaut als Acetylcholin. Synonyme sind Acetylmethylcholin oder 2-Acetyloxypropyl-trimethyl-azanium (IUPAC-Nomenklatur). Aufgrund seiner Eigenschaft als direktes Parasympathomimetikum und damit Bronchokonstriktor wird es als gängigste Testsubstanz zur unspezifischen Provokationstestung verwendet. Für den Provokationstest wird Methacholinchlorid (engl.: methacholine chloride) verwendet. Der chemische Name nach IUPAC lautet: 2-Acetoxypropyltrimethylammoniumchlorid. Es handelt sich um farblose Kristalle oder weißes, kristallines Pulver, welches stark hygroskopisch und hydrophil und daher in Wasser sehr leicht löslich, in Ethanol 96 % leicht löslich und in Diethylether unlöslich ist. Der Schmelzpunkt liegt bei 172 - 173 °C. Die lineare Formel von Methacholinchlorid lautet $\text{CH}_3\text{COOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}(\text{Cl})(\text{CH}_3)_3$, die Summenformel lautet $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$, das molekulare Gewicht beträgt 195.69 g/mol (Wikipedia, 2009a). Die Strukturformel ist in Abbildung 3.7 dargestellt:

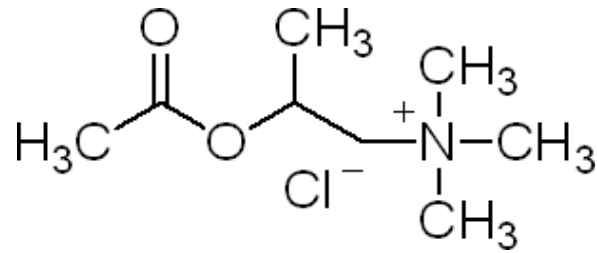


Abbildung 3.7.: Strukturformel Methacholinchlorid

Kontraindikationen für einen inhalativen Methacholin-Test sind (Crapo *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998):

- bekannte Überempfindlichkeit gegen Methacholinchlorid oder andere Parasympathomimetika
- mittelschwere Atemwegsobstruktion
- Exazerbation eines Asthma bronchiale
- schwere kardiale Erkrankungen, insbesondere bradykarde Rhythmusstörungen, Gebrauch von Parasympathomimetika
- schwere arterielle Hypertonie
- frühes Kindesalter (unter 5 Jahren)
- Schwangerschaft

Besondere Vorsicht ist auch geboten, wenn in der Anamnese ein Status asthmaticus oder ein anaphylaktischer Schock eruierbar ist.

Nach der inhalativen Applikation von Methacholinchlorid können folgende unerwünschte Wirkungen auftreten (s. auch Provokit®-Fachinformation):

- Selten: Irritationen im Rachenbereich, Pruritus, Dyspnoe, Husten, Giemen, Müdigkeit, Benommenheit, Schwindel, Kopfschmerzen, Nausea, Flushing, Engegefühl in der Brust, Hypersalivation, Abfall des diastolischen Blutdrucks, Tachykardie und bitterer Geschmack
- In Einzelfällen: Pneumothorax, Diarrhoe, Magen-Darmbeschwerden und vermehrter Harndrang

Insgesamt treten ernsthafte unerwünschte Wirkungen bei gewissenhafter Indikationsstellung, unter Berücksichtigung der Kontraindikationen sowie bei sachgerechter Durchführung äußerst selten auf (Crapo *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2000).

Letztlich ist zu berücksichtigen, dass die Maximalwirkung des Methacholin in der Lunge in einem Bereich von 120 Sekunden liegt, dann sofort das Abklingen der Wirkung beginnt, sich also kein eigentlicher Plateaueffekt einstellt, und durchschnittlich nach ca. 45 Minuten keine Wirkung der Erstdosis im Sinne eines positiven Tests mehr nachzuweisen ist (Cartier *et al.*, 1983; Orehek, 1982; Orehek *et al.*, 1982; Schlegel, 1988). Das Fehlen eines echten Plateaueffekts bedeutet, dass auch nur bedingt von echten Kumulativdosen im pharmakologischem Sinne gesprochen werden kann; vielmehr addiert sich die Wirkung der neuen Dosisstufe auf die wieder abfallende Wirkung der vorangehenden Dosisstufen hinzu. Umso wichtiger ist es, dass die Provokationstestung nach 45 Minuten abgeschlossen ist, da sich sonst die Quasi-Kumulativdosen ändern und noch schlechter nachvollziehbar sind. Weiterhin muss daher jeder lungenfunktionstechnische Messschritt in definiertem Abstand zur letzten Inhalation durchgeführt werden. Hierbei gilt die Messung 1 - 3 Minuten nach Inhalation als Standard (Cartier *et al.*, 1983; Chai *et al.*, 1975; Crapo *et al.*, 2000; Klaustermeyer *et al.*, 1979; Lourenco, 1982; Schlegel, 1988). Die Methacholinlösung sollte durch einen Apotheker in steriler Technik angefertigt im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden. Bei der Provokationstestung sollte die Methacholinlösung Zimmertemperatur haben (Crapo *et al.*, 2000). All diesen Empfehlungen wurde in der hier vorliegenden Untersuchung gefolgt.

3.3.5. Provokations-Protokoll

Die meisten etablierten Provokationsprotokolle, so das Protokoll von Chai *et al.* (Chai *et al.*, 1975), beruhen auf der Inhalation von verschiedenen Konzentrationsstufen der Methacholinchloridlösung, wobei die Konzentrationen im allgemeinen zwischen den Stufen verdoppelt, bei Kurzprotokollen auch vervierfacht werden. Die Methacholinchlorid-Konzentrationen liegen in der Regel zwischen ungefähr 0,1 und 8 mg/ml, pro Stufe erfolgen meist fünf Inhalationen. Dieses Vorgehen bietet zwar einige Vorteile, insbesondere Zeitersparnis im Rahmen der Kurzprotokolle, bringt aber auch nicht zu vernachlässigende Nachteile mit sich. Erstens stellt die Tatsache, dass die Verdünnungsstufen in der Regel im Lungenfunktionslabor selbst hergestellt werden, eine erhebliche Fehlerquelle dar, die für die Genauigkeit der Provokationsdosen (z.B. PD 20 FEV1) nachteilig ist. Zweitens kann die Verwechslung von Konzentrationsstufen für den Patienten eine beträchtliche Gefahr bedeuten. Drittens ist zu bedenken, dass bei den Kurzprotokollen

zwar die Konzentrationsstufen mit Vervierfachung der Konzentrationen unter Auslassung jeder zweiten Stufe erhalten bleiben, die Kumulativdosis sich durch dieses Vorgehen jedoch wesentlich ändert, so dass die Ergebnisse bzgl. der Provokationsdosen nicht mehr mit denen der ausführlichen Protokolle vergleichbar sind.

Deshalb wurde ein Provokationsprotokoll entwickelt, das in Hinblick auf die Kumulativdosen vergleichbar ist mit den am weitesten verbreiteten Protokollen wie z.B. dem von Chai *et al.*, bei dem die Dosiszunahme jedoch nicht über eine Steigerung der Konzentrationen, sondern über eine Erhöhung der Anzahl der Atemzüge pro Dosisstufe bei gleichbleibender Konzentration der Methacholinlösung erreicht wird. Hierzu existiert bereits ein hinsichtlich der Anzahl der Atemzüge und der Kumulativ(dosen) zum hier vorgestellten Protokoll identisches Provokationsschema, welches von Schlegel *et al.* entwickelt und an gesunden Versuchsteilnehmern erfolgversprechend getestet wurde (Schlegel *et al.*, 1994a). Die Methacholinchloridlösung wird durch die Klinikapotheke hergestellt und sterilfiltriert. Die Konzentration der Methacholinchloridlösung wurde so gewählt, dass einerseits mit einer praktikablen Anzahl von Atemzügen Kumulativdosen erreicht werden, die denen etablierter Provokationsprotokolle vergleichbar sind, und andererseits die Anfangsdosis auch für stark hyperreaktive Patienten in einem sicheren, also niedrigen Bereich liegt. Im Vorversuch zur Kalibrierung der Verneblerleistung hatte sich eine Vernebelungsmenge von 11,44 mg bei einer Vernebelung ergeben. Unter der vereinfachenden Annahme, dass 1 g bei der geringen NaCl-Konzentrationen (0,9 %-ige Kochsalzlösung) ungefähr 1 ml entspricht, werden bei einer Inhalation daher 0,01144 ml Lösung vernebelt. Darauf aufbauend wurde eine Konzentration von 1,75 mg/ml Methacholinchlorid in 0,9 %-iger Kochsalzlösung gewählt, welche bei Raumtemperatur zur inhalativen Provokation verwendet wurde. Es enthalten somit 0,01144 ml Stammlösung, also die Menge, die bei einer Inhalation vernebelt wird, 0,020 mg Methacholin ($0,01144 \text{ ml} \times 1,75 \text{ mg/ml} = 0,02002 \text{ mg}$ Methacholin pro Vernebelung).

Zunächst wurde bei allen Probanden und Patienten eine Ausgangslungenfunktion gemessen; diese musste als Voraussetzung für den Beginn der Provokation normwertig sein. Dann erfolgte die Inhalation von 0,9 %-iger Kochsalzlösung. Insgesamt wurden dabei aus den oben genannten Gründen der Benetzung des Verneblers 20 Atemzüge durchgeführt. Nach lungenfunktionstechnischem Ausschluss (im folgenden Leerwert genannt) einer positiven Reaktion auf Kochsalzlösung als Lösungsmittel für die Provokationssubstanz wurde mit der ersten Stufe des Provokationsprotokolls begonnen. Nach Inhalation der jeweiligen Dosisstufe wurde nach 90 Sekunden mit der Lungenfunktionsmessung begonnen. Im Anschluss erfolgte direkt die Inhalation der nächsten Dosisstufe. Während

Tabelle 3.3.: Unspezifische Provokation mit Methacholinchloridlösung 1,75 mg/ml - Protokoll

Messschritt	Anzahl AZ	Medium	MCH-Dosis [µg]	Kumulativdosis [µg]
0.	20	NaCl 0,9 %		
1.	1	MCH-Lösung 1,75 mg/ml	20	20
2.	2	wie oben	40	60
3.	2	wie oben	40	100
4.	5	wie oben	100	200
5.	5	wie oben	100	300
6.	5	wie oben	100	400
7.	5	wie oben	100	500
8.	5	wie oben	100	600
9.	5	wie oben	100	700
10.	5	wie oben	100	800
11.	10	wie oben	200	1000
12.	25	wie oben	500	1500
13.	25	wie oben	500	2000

des Wartens auf die Lungenfunktionsmessung wurde der Verneblertopf nach spätestens zehn Vernebelungen wieder auf das Ausgangsgewicht nach erstmaliger Füllung mit 2 ml Methacholinchloridlösung (1,75 mg/ml) aufgefüllt. Die Dosisstufen und Kumulativdosen sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Die Untersuchung wurde abgebrochen, wenn eines der beiden oder beide Kriterien für einen positiven Test erfüllt waren:

- Abfall der FEV1 um $\geq 20\%$ vom Ausgangswert
- Anstieg des Atemwegswiderstandes R_{tot} auf $\geq 0,5 \text{ kPa*s/l}$

Anschließend wurden zwei Hub eines kurzwirksamen β_2 -Mimetikums zur Bronchodilatation appliziert und nach zehn Minuten eine erneute Messung durchgeführt.

3.4. Auswertung

Der am weitesten akzeptierte Parameter zur quantitativen Beschreibung einer bronchialen Hyperreaktivität ist die Provokationsdosis 20 FEV1 (PD 20 FEV1), d.h. die Dosis, bei der die FEV1 um 20 % des Ausgangswertes abgefallen ist (Crapo *et al.*, 2000). In Protokollen, die mit Steigerung der Dosis über Steigerung der Konzentrationsstufen arbeiten, wird entsprechend die Provokationskonzentration 20 FEV1 (PC 20 FEV1)

berechnet. Die Berechnung der PD 20 FEV1 über lineare Regression erfolgte aus den in der Lungenfunktionsmessung gewonnen FEV1-Werten mittels des Statistikprogramms SPSS. Aus der gewonnenen Steigungsgeraden wurde der Steigungskoeffizient m sowie der Achsenabschnitt b ermittelt, so dass mittels der Gleichung

$$y = m \cdot x + b$$

die PD 20 FEV1 berechnet werden kann:

$$0,8 \cdot \text{Leerwert-FEV1} = m \cdot (\text{PD 20 FEV1}) + b$$

Dasselbe Verfahren wurde auch zur Berechnung einer Provokationsdosis $R_{tot} \geq 0,5$ kPa*s/l (PD $R_{tot} \geq 0,5$) angewendet, d.h. der Provokationsdosis, bei der der Atemwegwiderstand auf 0,5 kPa*s/l angestiegen ist. Es wurden auch extrapolierte Provokationsdosen für den jeweils anderen Parameter (FEV1 oder R_{tot}) berechnet, wenn der Patient nur mit einem der beiden Parameter ein positives Testkriterium erfüllt hatte, obwohl Regressiongeraden eigentlich nur im Messbereich Gültigkeit besitzen. Da der Provokationstest aber aus Sicherheitsgründen bereits bei einem positiven Testkriterium abgebrochen werden muss, wurde diese Vorgehensweise nach Absprache mit den statistischen Beratern bewusst gewählt.

Für den klinischen Alltag wurde ein Excel-Sheet entwickelt, das die Berechnung der Provokationsdosen nach Eintragung der Lungenfunktionswerte vollständig übernimmt (s. Ergebnis-Kapitel).

3.5. Statistik

Die statistische Erfassung und Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mittels des Statistikprogramms SPSS. Die statistische Beratung wurde von Herrn Prof. Dr. Gerhard Hommel sowie Herrn Prof. Dr. Manfred Berres vom Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz übernommen.

Die beiden Untersuchungskollektive wurden nach ihrer Alters-, Größen- und Gewichtsverteilung in Bezug auf die Häufigkeiten (Mittelwert, Median, Standardabweichung, Schiefe, Standardfehler der Schiefe, Minimum und Maximum sowie Perzentile 25, 50 und 75) verglichen sowie mittels Mann-Whitney-Test für nichtparametrische unverbundene Daten auf signifikante Unterschiede untersucht. Bezüglich der Geschlech-

terverteilung wurde eine Häufigkeitstabelle sowie eine Kreuztabelle mit den Parametern Geschlecht vs. Gesund / Asthmatiker erstellt und mittels Fisher-Exakt-Test für binäre unverbundene Daten auf signifikante Unterschiede überprüft.

Nach dem gleichen Muster wurde die Auswertung der Lungenfunktionsparameter FEV1, FEV1%VC IN, PEF, MEF 75, 50 und 25, R_{tot} und sG_{tot} durchgeführt.

Anschließend wurde eine Kreuztabelle mit den Parametern Gesund / Asthma vs. Reagiert / Nicht-reagiert erstellt.

Für jeden Versuchsteilnehmer, der eine positive Reaktion gezeigt hatte, wurde eine lineare Regression für die Parameter FEV1 und R_{tot} berechnet. Dieses Vorgehen entspricht unter anderem den Empfehlungen von Bellia und Schlegel zur Anwendbarkeit mathematischer Modelle bei der Auswertung inhalativer Methacholin-Dosis-Wirkungsbeziehungen (Bellia *et al.*, 1983; Schlegel *et al.*, 1994b). Das Bestimmtheitsmaß R^2 wurde ermittelt und eine ANOVA-Tabelle erstellt. Außerdem wurden die Regressionskoeffizienten m (Steigung) und b (Achsenabschnitt) berechnet, aus denen, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, die Provokationsdosis 20 FEV1 (PD 20 FEV1) und die Provokationsdosis $R_{tot} \geq 0,5$ kPa*s/1 (PD $R_{tot} \geq 0,5$) errechnet werden konnten. Die linearen Regressionen wurden auch graphisch dargestellt.

Für die Provokationsdosis 20 FEV1 (PD 20 FEV1), die Provokationsdosis $R_{tot} \geq 0,5$ kPa*s/1 (PD $R_{tot} \geq 0,5$) sowie für den jeweils kleineren Wert der beiden, die für den Testabbruch relevante Provokationsdosis PD Minimal, wurden wiederum die Häufigkeiten, wie oben beschrieben, errechnet sowie mittels Mann-Whitney-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Bei Versuchsteilnehmern, die nicht reagiert hatten, wurde die Provokationsdosis gleich der Endkumulativdosis von 2000 μg gesetzt. Weiterhin wurden für beide Parameter getrennt sowie für die PD Minimal, wie in der Literatur empfohlen, Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt (Schlegel *et al.*, 1994b), die Daten mittels des univariaten Logrank-Tests für Time-to-Event-Daten auf Signifikanz getestet und nach Vorbild der American Thoracic Society (Crapo *et al.*, 2000) ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic) angefertigt, aus denen Sensitivität und Spezifität des Provokationstests bei bestimmten Dosen ablesbar sind. Schließlich wurden noch Streudiagramme zur Korrelation zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ für Gesunde, Asthmatiker und das Gesamtkollektiv erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der Untersuchungskollektive

Das Kollektiv der Lungengesunden wurde mit dem Kollektiv der Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale hinsichtlich des Alters, des Geschlechts, der Größe und des Gewichts verglichen, um signifikante Unterschiede in den Eigenschaften der Kollektive auszuschließen.

Hinsichtlich des Alters ergibt sich dabei folgende Verteilung (s. Tab. 4.1):

Tabelle 4.1.: Alter

	Gesund (Jahre)	Asthma (Jahre)
n	18	15
Mittelwert	24,83	32,73
Median	24,00	26,00
SD σ	1,978	11,003
Schiefe	3,031	0,916
Minimum	23	22
Maximum	32	54

Der Mann-Whitney-Test für unverbundene, also interindividuelle, stetige Daten ergibt eine exakte Signifikanz von $p = 0,011$. Formal besteht zwar ein Unterschied zwischen beiden Gruppen; er ist jedoch bei Betrachtung der absoluten Werte, insbesondere des Medians (Gesund 24 Jahre vs. Asthma 26 Jahre), klinisch irrelevant.

Die Geschlechterverteilung stellt die Kreuztabelle 4.2 dar:

Tabelle 4.2.: Geschlecht

		Geschlecht		Gesamt
		männlich	weiblich	
Gesunde	Anzahl	8	10	18
	% von Gesund/Asthma	44,4	55,6	100,0
	% der Gesamtzahl	24,2	30,3	54,5
Asthmatiker	Anzahl	9	6	15
	% von Gesund/Asthma	60,0	40,0	100,0
	% der Gesamtzahl	27,3	18,2	45,5
Gesamt	Anzahl	17	16	33
	% von Gesund/Asthma	51,5	48,5	100,0
	% der Gesamtzahl	51,5	48,5	100,0

Wie die Tabelle veranschaulicht, gibt es zwischen den Untersuchungskollektiven keinen Unterschied bzgl. der Geschlechterverteilung. Dies bestätigt auch der mittels Fisher-Exakt-Test für unverbundene kategoriale Daten ermittelte p-Wert von 0,491.

Die Untersuchungskollektive wurden auch hinsichtlich ihrer Größe und ihres Gewichtes verglichen (s. Tab. 4.3):

Tabelle 4.3.: Größe und Gewicht

	Größe [cm]		Gewicht [kg]	
	Gesund	Asthma	Gesund	Asthma
n	18	15	18	15
Mittelwert	175,61	175,73	69,94	72,80
Median	174,50	175,00	66,50	73,00
SD σ	8,569	8,259	11,404	15,029
Schiefe	-0,049	0,007	0,541	0,367
Minimum	162	161	57	53
Maximum	188	189	92	101

Im Mann-Whitney-Test ergeben sich weder in Bezug auf die Größe ($p = 0,986$) noch auf das Gewicht ($p = 0,708$) relevante Unterschiede.

4.2. Ergebnisse der Methacholin-Provokation

Zur Darstellung, aus welcher Gruppe wieviele Personen einen positiven Test aufweisen bis zur Enddosis von 2000 µg, d.h. entweder mit der FEV1 um 20 % abgefallen sind oder mit dem totalen Atemwegswiderstand R_{tot} auf über 0,5 kPa*s/l angestiegen sind, dient die folgende Kreuztabelle (s. Tab. 4.4):

Tabelle 4.4.: Kreuztabelle Reaktion

		Negativer Test	Positiver Test	Gesamt
Gesunde	Anzahl	15	3	18
	% von Gesund	83,3	16,7	100,0
	% der Gesamtzahl	45,5	9,1	54,5
Asthma	Anzahl	0	15	15
	% von Asthma	,0	100,0	100,0
	% der Gesamtzahl	,0	45,5	45,5
Gesamt	Anzahl	15	18	33
	% von Gesund/Asthma	45,5	54,5	100,0

Insgesamt erfüllten 55 % der Probanden wenigstens ein Kriterium für einen positiven Tests, 45 % zeigten keine Reaktion im Sinne eines positiven Test. In der Gruppe der Lungengesunden lag das Verhältnis bei 83 % negativer Tests bis zur Enddosis von 2000 µg zu 16 % positiver Tests, während in der Gruppe der Asthmatiker 100 % vor der Enddosis einen positiven Test aufwiesen. Im Fisher-Exakt-Test ergibt sich ein p-Wert von $< 0,001$, d.h. es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen Lungengesunde und Patienten mit Asthma bronchiale. Das bedeutet, dass das neu entwickelte Protokoll in der Lage ist, sicher zwischen Lungengesunden und Patienten mit bronchialer Hyperreagibilität zu unterscheiden. Die Tatsache, dass unter den Lungengesunden drei Probanden bis zur Enddosis die Positivkriterien erfüllt haben, entspricht den Daten aus der Literatur. Auch unter klinisch völlig Lungengesunden findet man einen geringen Prozentsatz von Personen mit einem positiven Provokationstest (Boushey *et al.*, 1980; Klein *et al.*, 1998).

Darüber hinaus ist interessant, welches der Postivkriterien eher erfüllt wurde. In der Gruppe der Lungengesunden haben, wie aus Tabelle 4.4 ersichtlich, drei Personen vor Erreichen der Enddosis von 2000 µg ein Positivkriterium erfüllt; davon wiesen zwei einen zwanzigprozentigen Abfall der FEV1, eine einen Anstieg des Atemwegswiderstandes R_{tot}

auf $\geq 0,5 \text{ kPa}\cdot\text{s/l}$ auf. Beide Kriterien wurden von keiner der Personen erfüllt. In der Gruppe der Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale erreichte keine der Testpersonen die Enddosis. Drei Personen waren vorher um 20 % mit der FEV1 abgefallen, bei neun Personen war ein Anstieg des Atemwegswiderstandes R_{tot} auf $\geq 0,5 \text{ kPa}\cdot\text{s/l}$ zu verzeichnen und drei Personen erfüllten beide Kriterien für einen positiven Test.

4.3. Einsekundenkapazität FEV1

4.3.1. FEV1 - Ausgangsbefunde

Tabelle 4.5 führt die FEV1-Leerwerte auf, d.h. die Werte nach Inhalation von 20 Atemzügen isotoner Kochsalzlösung. Als bemerkenswert einzustufen ist, dass sich in der Gruppe der Asthmatiker einige Patienten im Vergleich zur Messung vor NaCl-Inhalation leicht verschlechtert hatten, jedoch noch grenzwertige Normalbefunde aufwiesen, so dass die Testung weiter durchgeführt wurde. Die Verschlechterung der Lungenfunktion nach Inhalation von Kochsalzlösung kann zum einen durch diese selbst, zum anderen jedoch insbesondere bei stark hyperreaktiven Patienten durch die zwanzig forcierten Atemmanöver bei Inhalation der Lösung verursacht werden (Crapo *et al.*, 2000; Konietzko, 1982; Tweedale *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1982). Deshalb ist in der Literatur umstritten, ob eine Basismessung nach Inhalation des Diluent, also des Lösungsmittels, überhaupt durchgeführt werden sollte (Connolly *et al.*, 1988; Crapo *et al.*, 2000; Wanger und Irvin, 1998). Interessanterweise gaben die betroffenen Patienten mehrheitlich an, auch unter sonstiger Belastung vermehrt an Luftnot zu leiden.

Tabelle 4.5.: FEV1 [l] nach NaCl-Inhalation (Leerwert)

	Gesund	Asthma
n	18	15
Mittelwert	4,39	3,86
Median	4,48	3,85
SD σ	,96	,79
Schiefe	,36	-,20
Minimum	2,99	2,37
Maximum	6,51	5,29

Im Mann-Whitney-Test ergibt sich ein p-Wert von 0,145, so dass im Ausgangsbefund bzgl. der FEV1 kein relevanter Unterschied zwischen den untersuchten Kollektiven fest-

zustellen ist.

Tabelle 4.6 stellt die Ausgangswerte der FEV1 % Predicted Normal dar:

Tabelle 4.6.: FEV1 % Predicted Normal nach NaCl-Inhalation (Leerwert)

	Gesund	Asthma
n	18	15
Mittelwert	109,20	99,07
Median	109,88	97,93
SD σ	11,51	9,16
Schiefe	0,39	0,37
Minimum	93,47	84,47
Maximum	133,68	115,50

Im Mann-Whitney-Test ergibt sich ein p-Wert von 0,018, d.h. ein deutlicher Unterschied im Ausgangsbefund bzgl. der FEV1 % Predicted Normal (FEV1 % PN) zwischen den Lungengesunden und den Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale. Wenn man allerdings die absoluten Werte betrachtet, so liegen die Asthmapatienten mit einer FEV1 % PN von im Mittel 99,07 % völlig im Normbereich, so dass aus der Ausgangslungenfunktion keinesfalls eine obstruktive Atemwegserkrankung abzuleiten ist. Bei vergleichender Betrachtung der FEV1 % PN (109,20 %) in der Gruppe der Lungengesunden lässt sich als Ursache für den überdurchschnittlich guten Wert am ehesten eine zufällige Auswahl von Personen mit besonders guter Lungenfunktion vermuten.

Ähnliches gilt für die Ausgangsbefunde der FEV1 % VC IN (s. Tab. 4.7):

Tabelle 4.7.: FEV1 in % der inspiratorischen Vitalkapazität nach NaCl-Inhalation (Leerwert)

	Gesund	Asthma
n	18	15
Mittelwert	91,63	73,56
Median	90,17	72,67
SD σ	8,66	9,31
Schiefe	1,09	,11
Minimum	78,41	59,30
Maximum	115,45	92,00

Auch hier zeigt sich schon im Ausgangsbefund ein deutlicher Unterschied zwischen den untersuchten Kollektiven ($p < 0,001$), jedoch liegen hier ebenfalls bei der Betrachtung der absoluten Werte beide Gruppen im Mittel im Normbereich, nämlich Gesunde bei 92 % FEV1 % VC IN und Asthmatiker bei 74 % FEV1 % VC IN, so dass insbesondere im Einzelfall von der Ausgangslungenfunktion nicht zwangsläufig auf das Vorliegen einer obstruktiven Atemwegserkrankung geschlossen werden kann.

4.3.2. FEV1 - Verlauf während der Provokation

In der nachfolgenden Tabelle 4.8 ist die Entwicklung der FEV1 während der Provokation dargestellt:

Tabelle 4.8.: FEV1 [l] - Verlauf während der Provokation

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
FEV1.0	0	4,39	4,48	,96	0	3,86	3,85	,79	,145
FEV1.20	0	4,33	4,37	,98	0	3,65	3,61	,75	,048
FEV1.60	0	4,29	4,36	1,00	2	3,55	3,55	,73	,013
FEV1.100	0	4,25	4,27	,99	2	3,37	3,56	,75	,004
FEV1.200	0	4,20	4,35	1,03	8	3,56	3,65	,62	,000
FEV1.300	0	4,17	4,32	1,02	12	3,38	3,46	,15	,000
FEV1.400	1	4,14	4,44	1,00	13	3,36	3,36	,31	,000
FEV1.500	3	4,38	4,38	,82	13	3,30	3,30	,27	,000
FEV1.600	3	4,39	4,36	,84	14	3,32	3,32		,000
FEV1.700	3	4,37	4,45	,82	14	3,39	3,39		,000
FEV1.800	3	4,38	4,36	,87	14	3,38	3,38		,000
FEV1.1000	3	4,34	4,39	,88	14	3,40	3,40		,000
FEV1.1500	3	4,27	4,23	,85	14	2,82	2,82		,000
FEV1.2000	3	4,23	4,25	,86	15				,000

In der ersten Spalte erscheint der Lungenfunktionsparameter, hier also FEV1 nach 0 μg Methacholinchlorid-Inhalation (= FEV1.0), nach 20 μg Methacholinchlorid-Inhalation (= FEV1.20) usw. Die gleiche Darstellung erfolgt in den nachfolgenden Verlaufstabellen für die anderen Lungenfunktionsparameter. Als "Fehlend" sind jeweils die Anzahl

an untersuchten Personen aufgeführt, die bei dem jeweiligen Messschritt aufgrund der Erfüllung eines Postivkriteriums bereits aus dem Testverfahren ausgeschieden waren. Entsprechend konnten sie auch nicht mehr bei der Ermittlung des Mittelwertes und der anderen Parameter berücksichtigt werden. Dennoch ist eindeutig erkennbar, dass sich in der Gruppe der Asthmatiker trotz des zunehmenden Ausscheidens von Testpersonen, insbesondere frühzeitig natürlich denen mit ausgeprägter bronchialer Hyperreagibilität, ein eindeutiger Abfall der FEV1 verzeichnen lässt, während sich die FEV1-Werte in der Gruppe der Lungengesunden bis zur Enddosis im Mittel kaum verändern (bei drei fehlend; wie oben beschrieben normale Quote von klinisch Lungengesunden mit im Test nachweisbarer bronchialer Hyperreagibilität). Die Enddosis von 2000 µg hat, wie oben beschrieben, keiner der 15 untersuchten Asthmatiker erreicht, da vorher mindestens ein Versuchsabbruchskriterium erfüllt war. Daher sind die aus den Werten der noch verbliebenen Testpersonen ermittelten Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen in den höheren Dosisstufen auch nur begrenzt aussagefähig, denn die schlechtesten zu erwartenden Werte können nicht in die Berechnung eingehen. Auch bei der Berechnung der Signifikanzen mittels des Mann-Whitney-Tests tritt folgerichtig das Problem auf, dass ausgeschiedene Testpersonen für den jeweiligen Messschritt keine Daten mehr liefern, was zu einer Verzerrung der Ergebnisse zu Lasten der offensichtlich deutlichen Unterschiede führen würde. Da der Mann-Whitney-Test vorrangig auf Größer/Kleiner-Verhältnisse achtet, wurde in den entsprechenden Fällen ein fiktiver FEV1-Wert eingesetzt, der kleiner als der kleinste unter allen Testpersonen gemessenen FEV1-Wert war. Dann wurden die Signifikanzen berechnet. Dieses Verfahren wurde entsprechend für alle folgenden Lungenfunktionsparameter eingesetzt. Im Falle der FEV1 ist klar ersichtlich, dass zwischen den Untersuchungskollektiven bei nicht signifikanten Unterschieden im Ausgangsbefund schon nach Inhalation von 20 µg Methacholinchlorid ein deutlicher Unterschied ($p = 0,048$) besteht und bereits nach 200 µg Methacholinchloridlösung der p-Wert bei $< 0,001$ liegt, d.h. also sehr deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen.

Ähnlich verhält es sich mit der FEV1 % VC IN (s. Tab. 4.9):

Tabelle 4.9.: FEV1 % VC IN - Verlauf während der Provokation

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
FEV1 % VC.0	0	91,63	90,17	8,66	0	73,56	72,67	9,31	,000
FEV1 % VC.20	0	90,00	89,37	7,84	0	74,14	73,44	8,44	,000
FEV1 % VC.60	0	89,52	90,07	8,52	2	74,51	75,33	8,84	,000
FEV1 % VC.100	0	88,70	88,79	7,50	2	74,26	73,61	8,98	,000
FEV1 % VC.200	0	87,25	86,66	7,97	8	77,06	79,36	10,45	,000
FEV1 % VC.300	0	86,63	86,72	7,74	12	74,81	73,05	9,83	,000
FEV1 % VC.400	1	85,42	84,15	7,68	13	76,76	76,76	15,32	,000
FEV1 % VC.500	3	86,94	87,55	7,55	13	76,99	76,99	13,02	,000
FEV1 % VC.600	3	86,46	86,19	8,15	14	84,46	84,46		,000
FEV1 % VC.700	3	86,01	87,22	8,19	14	83,72	83,72		,000
FEV1 % VC.800	3	85,63	83,97	7,74	14	84,00	84,00		,000
FEV1 % VC.1000	3	85,38	85,54	8,29	14	83,29	83,29		,000
FEV1 % VC.1500	3	84,55	84,36	6,91	14	74,89	74,89		,000
FEV1 % VC.2000	3	84,41	82,78	7,52	15				,000

Auch hier zeigt sich im Verlauf, dass bei den Lungengesunden die FEV1 % VC IN (aus Platzgründen in der Tabelle abgekürzt als FEV1 % VC) nur geringfügig abfällt (bei, wie schon oben beschrieben, drei aufgrund von Erfüllung von Versuchsabbruchskriterien vor der Enddosis abgebrochenen Versuchen). Es ist also davon auszugehen, dass sich bei völlig Lungengesunden auch die FEV1 % VC IN nach Inhalation von 2000 µg Methacholinchlorid höchstens geringfügig ändert. Bei den Asthmapatienten sind die Mittelwerte wiederum nur bedingt aussagekräftig, da sie mit Zunahme der Dosis und damit mit sinkender Anzahl der noch im Test verbliebenen Personen nur noch aus immer weniger Werten errechnet werden. Der zwischenzeitliche Anstieg ist dadurch zu erklären, dass diejenigen Personen, die in den höheren Dosisstufen noch verblieben sind, auch im Ausgangsbefund eine höhere FEV1 % VC IN vorwiesen. Darüber hinaus kann sich eine Zunahme der Obstruktion auch in einer Zunahme der gefangenen Luft und damit in einer Verschiebung der Atemmittellage hin zur Inspiration ausdrücken. Dadurch sinkt die Vitalkapazität; folgerichtig kann die FEV1 % VC ansteigen.

4.4. Flusswerte

4.4.1. Peak Expiratory Flow (PEF)

Auch die Flusswerte wurden statistisch ausgewertet. Dabei zeigt sich für den Peak Expiratory Flow (PEF) folgendes Bild (s. Tab. 4.10):

Tabelle 4.10.: Peak Expiratory Flow PEF [l/s]

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
PEF.0	0	8,81	8,04	2,44	0	8,62	8,46	2,16	1,000
PEF.20	0	8,59	7,98	2,56	0	7,71	6,86	2,05	,259
PEF.60	0	8,54	7,80	2,58	2	7,57	7,22	1,94	,108
PEF.100	0	8,64	7,49	2,60	2	7,09	6,96	1,66	,033
PEF.200	0	8,50	7,86	2,61	8	6,96	7,20	2,12	,001
PEF.300	0	8,46	7,72	2,48	12	6,04	6,01	,12	,000
PEF.400	1	8,34	8,07	2,61	13	5,67	5,67	,16	,000
PEF.500	3	8,91	8,65	2,23	13	5,47	5,47	,21	,000
PEF.600	3	9,15	8,80	2,20	14	5,42	5,42		,000
PEF.700	3	9,01	8,71	2,28	14	5,08	5,08		,000
PEF.800	3	9,02	8,59	2,46	14	4,60	4,60		,000
PEF.1000	3	8,85	7,83	2,36	14	5,74	5,74		,000
PEF.1500	3	8,89	8,65	2,39	14	4,61	4,61		,000
PEF.2000	3	8,86	8,91	2,42	15				,000

Die Tabelle stellt dar, dass die PEF-Ausgangswerte keinen relevanten Unterschied zwischen den untersuchten Kollektiven aufweisen ($p = 1,00$). Im Untersuchungsverlauf sieht man trotz der fehlenden Werte der bereits ausgeschiedenen Testpersonen bei der Betrachtung der absoluten Werte, dass die Lungengesunden (bei 3 fehlend) bis zur Enddosis einen unveränderten PEF aufweisen, während bei den noch im Test verbliebenen Asthmatikern ein deutlicher Abfall zu verzeichnen ist. Im Verlauf der Provokationstestung entwickeln sich entsprechend schon in niedrigen Dosisbereichen eindeutig Unterschiede. Bereits bei 100 μg fällt der p-Wert auf 0,033 und bei 300 μg bereits auf $< 0,001$, d.h. es ist ein sehr deutlicher Unterschied festzustellen. Auch anhand des Peak Expiratory Flow zeigt sich, dass der Test offensichtlich Patienten mit einer bronchialen Hyperreagibilität sicher herausfiltert.

4.4.2. Maximale expiratorische Flusswerte (MEF)

Auch die weiteren Flusswerte wurden entsprechend untersucht (s. Tab. 4.11 bis 4.13):

Tabelle 4.11.: Maximaler expiratorischer Fluss bei noch 75 % ausatembarer VC - MEF75 [l/s]

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
MEF75.0	0	7,95	7,58	,87	0	6,22	5,79	1,97	,030
MEF75.20	0	7,85	7,43	,90	0	5,76	5,38	1,77	,003
MEF75.60	0	7,72	7,26	,82	2	5,59	5,60	1,67	,002
MEF75.100	0	7,76	7,26	,82	2	5,33	4,90	1,61	,001
MEF75.200	0	7,59	7,49	,66	8	5,28	5,25	1,59	,000
MEF75.300	0	7,50	7,22	,63	12	4,81	5,11	,59	,000
MEF75.400	1	7,30	7,81	,52	13	4,51	4,51	,55	,000
MEF75.500	3	7,66	7,39	,74	13	4,52	4,52	,77	,000
MEF75.600	3	7,88	7,46	1,15	14	4,91	4,91		,000
MEF75.700	3	7,73	7,40	,77	14	4,65	4,65		,000
MEF75.800	3	7,90	7,61	1,19	14	4,60	4,60		,000
MEF75.1000	3	7,69	7,30	1,28	14	5,16	5,16		,000
MEF75.1500	3	7,66	7,41	,93	14	4,14	4,14		,000
MEF75.2000	3	7,57	6,98	1,01	15				,000

Tabelle 4.12.: Maximaler expiratorischer Fluss bei noch 50 % ausatembarer VC - MEF50 [l/s]

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
MEF50.0	0	5,21	4,91	1,69	0	3,64	3,24	1,42	,002
MEF50.20	0	5,05	4,83	1,57	0	3,36	2,98	1,36	,001
MEF50.60	0	4,98	4,71	1,71	2	3,13	3,04	1,17	,000
MEF50.100	0	4,80	4,30	1,59	2	2,90	2,64	1,08	,000
MEF50.200	0	4,70	4,34	1,62	8	3,12	2,95	,98	,000
MEF50.300	0	4,56	4,36	1,53	12	2,91	2,88	,56	,000
MEF50.400	1	4,40	4,33	1,32	13	2,99	2,99	1,05	,000
MEF50.500	3	4,66	4,40	1,26	13	2,90	2,90	1,00	,000
MEF50.600	3	4,70	4,31	1,44	14	3,18	3,18		,000
MEF50.700	3	4,74	4,32	1,49	14	3,72	3,72		,000
MEF50.800	3	4,65	4,26	1,56	14	3,61	3,61		,000
MEF50.1000	3	4,62	4,13	1,51	14	3,48	3,48		,000
MEF50.1500	3	4,42	4,19	1,36	14	2,47	2,47		,000
MEF50.2000	3	4,32	3,77	1,41	15				,000

Tabelle 4.13.: Maximaler expiratorischer Fluss bei noch 25 % ausatembarer VC - MEF25 [l/s]

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
MEF25.0	0	2,34	2,21	,76	0	1,51	1,39	,69	,001
MEF25.20	0	2,26	1,94	,76	0	1,34	1,12	,62	,000
MEF25.60	0	2,21	1,95	,92	2	1,29	1,21	,58	,000
MEF25.100	0	2,17	1,91	,85	2	1,20	1,16	,54	,000
MEF25.200	0	2,03	1,83	,82	8	1,41	1,20	,58	,000
MEF25.300	0	1,98	1,86	,87	12	1,41	1,16	,45	,000
MEF25.400	1	1,94	1,83	,82	13	1,66	1,66	,76	,000
MEF25.500	3	2,09	1,80	,73	13	1,61	1,61	,66	,000
MEF25.600	3	2,12	1,78	,78	14	1,95	1,95		,000
MEF25.700	3	2,10	1,97	,71	14	2,00	2,00		,000
MEF25.800	3	2,09	1,89	,79	14	1,77	1,77		,000
MEF25.1000	3	2,06	1,79	,77	14	1,75	1,75		,000
MEF25.1500	3	1,91	1,72	,65	14	,97	,97		,000
MEF25.2000	3	1,92	1,72	,76	15				,000

Interessanterweise lässt sich im Vergleich der Flusswerte beobachten, dass von MEF75 bis MEF25 schon in der Ausgangslungenfunktion zunehmend deutlichere Unterschiede (MEF75.0 $p = 0,03$, MEF50.0 $p = 0,002$, MEF25.0 $p = 0,001$) bestehen, obwohl die absoluten Werte jeweils noch im Normbereich liegen. Dies könnte daran liegen, dass sich die Atemwegsobstruktion bei den Asthmapatienten zunächst in den peripheren Atemwegen manifestiert, denn MEF50 und MEF25 spiegeln mitunter das Geschehen in den Bronchiolen besonders gut wider (“small airway disease”). Dem entspricht auch die Beobachtung, dass sogar bei den Lungengesunden die relative Abnahme der Flusswerte mit steigender Methacholinkonzentration vom PEF bis MEF25 progrediert, d.h. also, dass sich auch bei den Lungengesunden eine diskrete Atemwegsobstruktion zunächst in den peripheren Atemwegen abzuspielen scheint. Dem entgegen stehen jedoch Untersuchungen des Closing Volumes als Parameter der peripheren Atemwegsobstruktion. Obwohl es auch bei Lungengesunden unter Methacholinprovokation zu einem Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks im Blut (pO_2) kommt, zeigten sich keine Veränderungen des Closing Volumes in dieser Gruppe, so dass der Abfall des pO_2 folgerichtig nicht durch eine periphere Atemwegsobstruktion, sondern eher durch vaskuläre Shunteeffekte auf dem Boden der cholinergen Wirkung des Methacholins zu erklären ist (Stewen,

2004). Daher ist die oben beschriebene Beobachtung am ehesten der großen Streuung der MEF-Sollwerte zuzuschreiben. Auch bei den Flusswerten stellt sich darüber hinaus das Problem, dass bei den Asthmatikern die Mittelwerte sowie die weiteren deskriptiv-statistischen Parameter nur stark eingeschränkt aussagekräftig sind, denn je stärker die bronchiale Hyperreagibilität der getesteten Personen ausgeprägt ist, d.h. also je mutmaßlich schlechter die Lungenfunktionswerte im Verlauf sind, desto früher existieren wegen Versuchsabbruchs keine Daten mehr.

4.5. Atemwegswiderstand und Atemwegsleitfähigkeit

4.5.1. Totaler Atemwegswiderstand R_{tot}

Nachfolgende Tabelle 4.14 stellt die Ausgangsbefunde hinsichtlich des totalen Atemwegswiderstandes R_{tot} dar:

Tabelle 4.14.: R_{tot} [kPa*s/l] nach NaCl-Inhalation (Leerwert)

	Gesund	Asthma
n	18	15
Mittelwert	,22	,28
Median	,22	,26
SD σ	,06	,10
Schiefe	,12	,12
Minimum	,12	,12
Maximum	,33	,44

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, haben beide untersuchten Gruppen im Mittel einen völlig normalen Atemwegswiderstand nach Inhalation der Kochsalzlösung; es besteht kein relevanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p = 0,086$).

Der Verlauf des totalen Atemwegswiderstandes während der Provokation ist Tabelle 4.15 zu entnehmen:

Tabelle 4.15.: Totaler Atemwegswiderstand R_{tot} im Verlauf [kPa*s/l]

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
$R_{tot.0}$	0	,22	,22	,059	0	,28	,26	,099	,086
$R_{tot.20}$	0	,22	,21	,065	0	,38	,35	,198	,001
$R_{tot.60}$	0	,23	,21	,066	2	,38	,38	,088	,000
$R_{tot.100}$	0	,24	,23	,067	2	,47	,48	,119	,000
$R_{tot.200}$	0	,27	,25	,087	8	,47	,54	,154	,000
$R_{tot.300}$	0	,28	,26	,081	12	,35	,35	,105	,000
$R_{tot.400}$	1	,28	,26	,095	13	,45	,45	,050	,000
$R_{tot.500}$	3	,26	,25	,056	13	,41	,41	,156	,000
$R_{tot.600}$	3	,26	,26	,049	14	,31	,31		,000
$R_{tot.700}$	3	,28	,28	,057	14	,27	,27		,000
$R_{tot.800}$	3	,28	,25	,069	14	,33	,33		,000
$R_{tot.1000}$	3	,27	,28	,051	14	,28	,28		,000
$R_{tot.1500}$	3	,31	,29	,057	14	,35	,35		,000
$R_{tot.2000}$	3	,29	,29	,055	15				,000

Während sich in der Gruppe der Lungengesunden (bei drei fehlend) der Atemwegswiderstand bis zur Enddosis nur geringfügig verändert und stets im Normbereich bleibt, verzeichnet die Gruppe der Asthmatiker schon nach Inhalation von 20 μg Methacholinchlorid einen Anstieg von 0,28 kPa*s/l auf 0,38 kPa*s/l. Damit ergibt sich bei 20 μg auch im Mann-Whitney-Test bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den Untersuchungskollektiven ($p = 0,001$). Auch die p-Werte in den höheren Dosisstufen zeigen entsprechend überaus deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an ($p < 0,001$).

4.5.2. Spezifische Atemwegsleitfähigkeit sG_{tot}

Die Ausgangsbefunde hinsichtlich der spezifischen Atemwegsleitfähigkeit sG_{tot} sind in Tabelle 4.16 dargestellt:

Tabelle 4.16.: sG_{tot} nach NaCl-Inhalation (Leerwert)

	Gesund	Asthma
n	18	15
Mittelwert	1,19	,99
Median	1,13	,90
SD σ	,320	,389
Schiefe	1,35	1,87
Minimum	,85	,59
Maximum	2,08	2,12

Es besteht ein relevanter Unterschied ($p = 0,030$) hinsichtlich der Ausgangsbefunde der spezifischen Atemwegsleitfähigkeit. Im Untersuchungsverlauf verstärken sich diese Unterschiede und erreichen bereits bei 20 μg einen p-Wert von $< 0,001$ (s. Tab. 4.17):

Tabelle 4.17.: Spezifische Atemwegsleitfähigkeit sG_{tot} im Verlauf [l/kPa*s]

	Gesunde				Asthmatiker				Gesamt
	n=18				n=15				
	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	Fehlend	\bar{x}	\tilde{x}	σ	p
$sG_{tot}\cdot 0$	0	1,19	1,13	,320	0	,99	,90	,389	,030
$sG_{tot}\cdot 20$	0	1,19	1,05	,360	0	,76	,76	,280	,000
$sG_{tot}\cdot 60$	0	1,16	1,13	,228	2	,68	,64	,236	,000
$sG_{tot}\cdot 100$	0	1,09	1,03	,251	2	,54	,55	,174	,000
$sG_{tot}\cdot 200$	0	,99	,95	,260	8	,59	,48	,313	,000
$sG_{tot}\cdot 300$	0	,92	,88	,201	12	,71	,62	,290	,000
$sG_{tot}\cdot 400$	1	,91	,86	,173	13	,56	,56	,127	,000
$sG_{tot}\cdot 500$	3	,91	,89	,133	13	,63	,63	,354	,000
$sG_{tot}\cdot 600$	3	,90	,87	,115	14	,84	,84		,000
$sG_{tot}\cdot 700$	3	,88	,85	,131	14	,95	,95		,000
$sG_{tot}\cdot 800$	3	,87	,89	,151	14	,78	,78		,000
$sG_{tot}\cdot 1000$	3	,87	,90	,134	14	,90	,90		,000
$sG_{tot}\cdot 1500$	3	,77	,73	,101	14	,72	,72		,000
$sG_{tot}\cdot 2000$	3	,79	,79	,105	15				,000

Wie auch bei anderen Lungenfunktionsparametern, z.B. in inverser Weise beim totalen Atemwegswiderstand, beobachtet, fällt die spezifische Atemwegsleitfähigkeit im Mittel

zunächst in der Gruppe der Patienten mit Asthma bronchiale ab, um dann vorübergehend wieder anzusteigen und zuletzt erneut abzufallen. Dies erklärt sich wiederum durch das Ausscheiden der Testpersonen mit der stärksten bronchialen Hyperreagibilität und das im Mittel längere Verbleiben von Testpersonen in der Untersuchungsreihe, die eine im Ausgangsbefund höhere spezifische Atemwegsleitfähigkeit aufweisen.

4.6. Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$

4.6.1. Lineare Regressionen

Wie bereits oben beschrieben, ist der am weitesten akzeptierte Parameter zur quantitativen Einschätzung einer bronchialen Hyperreaktivität die Provokationsdosis 20 FEV1 (PD 20 FEV1), d.h. die Dosis, bei der die FEV1 um 20 % des Ausgangswertes abgefallen ist. Daher wurde aus den mittels Lungenfunktionsmessung gewonnenen FEV1-Werten eine lineare Regression berechnet. Aus der Steigungsgeraden konnte dann der Steigungskoeffizient m sowie der Achsenabschnitt b ermittelt werden, so dass mittels der Gleichung

$$y = mx + b$$

die PD 20 FEV1 berechnet wurde:

$$0,8 * \text{Leerwert-FEV1} = m * (\text{PD 20 FEV1}) + b$$

Dasselbe Verfahren wurde auch zur Berechnung der Provokationsdosis $R_{tot} \geq 0,5$ kPa*s/l (PD $R_{tot} \geq 0,5$ kPa*s/l) angewendet. Wenn die Testperson nur eines der beiden Positivkriterien erfüllt hatte, wurde dennoch eine Regressiongerade für beide Parameter berechnet und wurden im Falle des nicht erreichten Positivkriteriums extrapolierte Werte akzeptiert. Bei Testpersonen, die bis zur Enddosis von 2000 μg nicht reagiert hatten, wurde die PD 20 FEV1 sowie die PD gleich 2000 μg gesetzt.

Nachfolgend ist exemplarisch eine solche PD 20 FEV1- bzw. PD $R_{tot} \geq 0,5$ -Berechnung anhand der realen Daten einer Versuchsperson gezeigt (s. Tab. 4.18):

Tabelle 4.18.: Verlauf von FEV1 und R_{tot}

	FEV1 [l]	R_{tot} [kPa*s/l]
0 µg	4,54	0,22
20 µg	4,51	0,35
60 µg	4,17	0,36
100 µg	3,58	0,51

Die Versuchsperson ist also nach Inhalation von 100 µg Methacholinchlorid um mehr als 20 % mit der FEV1 abgefallen (80 % des FEV1-Ausgangswertes = $4,54 \text{ l} * 0,8 = 3,63 \text{ l}$) und mit dem Atemwegwiderstand auf über 0,5 kPa*s/l angestiegen. Demnach wurden beide Kriterien für einen positiven Test erfüllt, der Versuch also abgebrochen. Aus den absoluten Werten wurde mittels SPSS eine lineare Regression berechnet, aus der folgende Koeffizienten der Steigungsgeraden hervorgehen (s. Tab. 4.19):

Tabelle 4.19.: Koeffizienten der Steigungsgeraden

	FEV1 [l]	R_{tot} [kPa*s/l]
Steigungskoeffizient m	-,009763	,002508
Achsenabschnitt b	4,639	,247

Graphisch sind die Regressionsgeraden in den beiden folgenden Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellt:

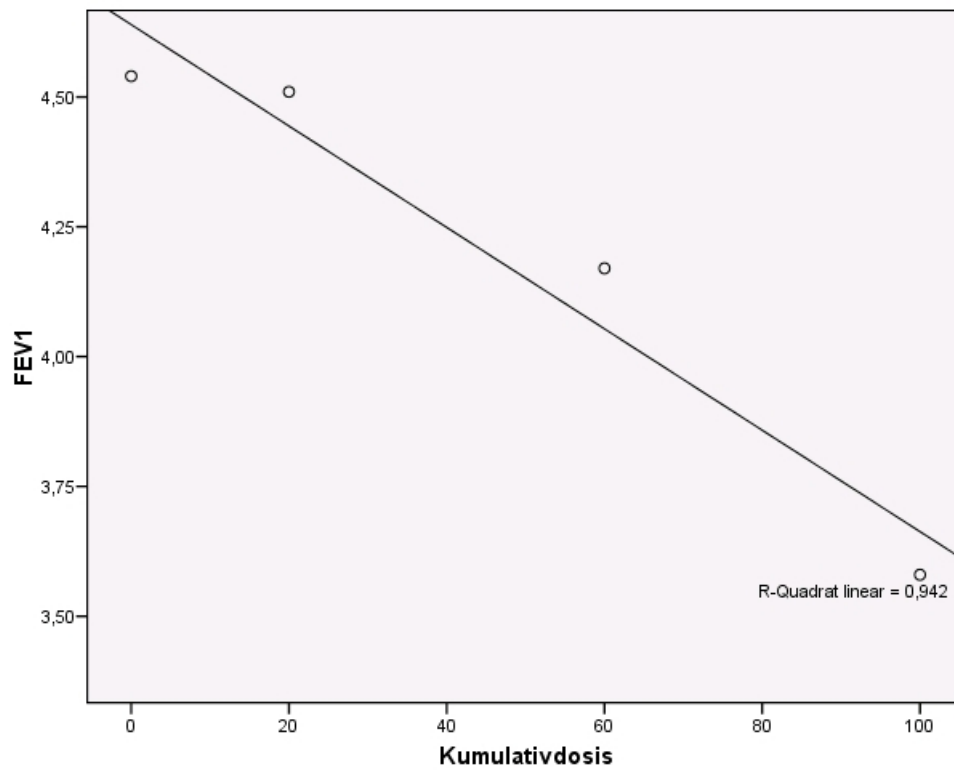


Abbildung 4.1.: Regression FEV1

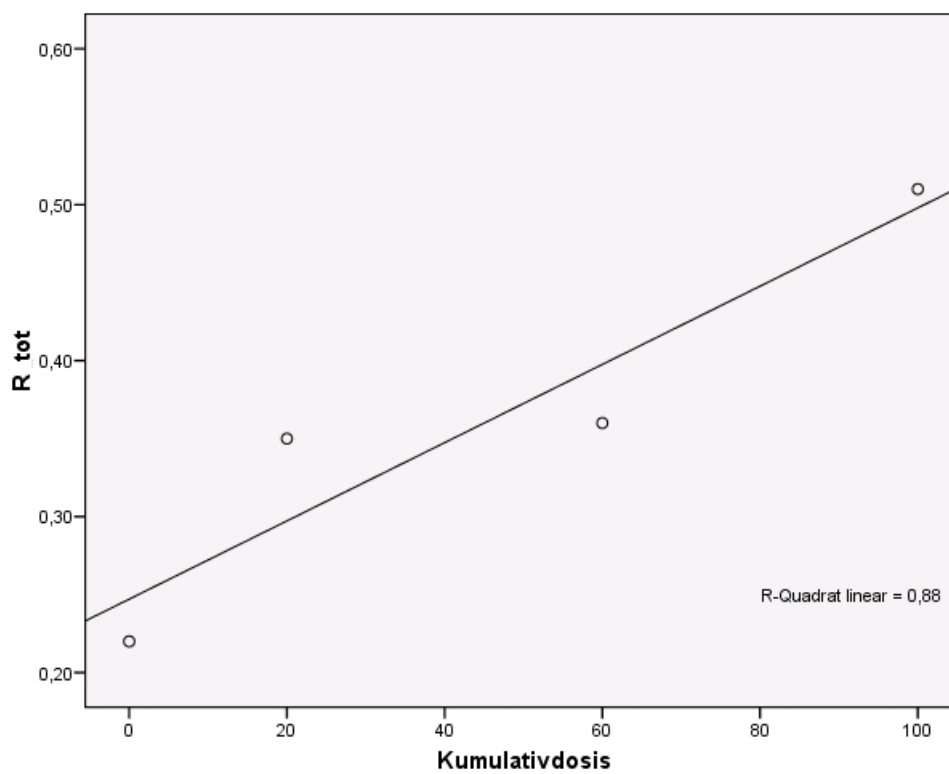


Abbildung 4.2.: Regression R_{tot}

Das Bestimmtheitsmaß R^2 , ein Maß für die Qualität der linearen Approximation, liegt für die FEV1-Regressionsgerade bei 0,942; für die R_{tot} -Regressionsgerade der Beispielperson liegt es bei 0,880. Ein lineares Bestimmtheitsmaß über 0,9 gilt als Nachweis eines sehr guten linearen Zusammenhangs. Nicht bei allen Probanden lagen die Bestimmtheitsmaße in solch hohem Bereich. Dabei ist zunächst festzustellen, dass bei der graphischen Auswertung die lineare Regression als das richtige Modell spezifiziert wurde. Da bei dieser Versuchsreihe aber nur relativ wenige Werte für die Berechnung der Regressionsgeraden zur Verfügung stehen, machen sich Ausreißer sehr stark bemerkbar. Diese Ausreißer sind erstens durch die ganz normalen, allein schon mitarbeitsbedingten Schwankungen in der Lungenfunktion, zweitens durch die aufgrund der oben beschriebenen Fehlerquellen und Ungenauigkeiten des Verfahrens sicherlich nicht immer ganz gleichmäßige Deposition der Methacholindosis in den Atemwegen und drittens durch die nicht zwangsläufig gleichmäßig verlaufende Reaktion auf die Inhalation der Provokationssubstanz zu erklären. Dennoch ist die lineare Regression das am besten passende und in der Literatur akzeptierte Modell (Bellia *et al.*, 1983; Schlegel *et al.*, 1994b).

Aus den Koeffizienten der Regressionsgeraden errechnen sich für die Beispielperson folgende Provokationsdosen:

- $0,8 * \text{Leerwert} - FEV1 = m * (PD\ 20\ FEV1) + b$

$$0,8 * 4,54l = -,009763l * \mu g^{-1} * (PD\ 20\ FEV1) + 4,639l$$

$$PD\ 20\ FEV1 = \frac{(0,8*4,54l)-4,639l}{-,009763l*\mu g^{-1}}$$

$$PD\ 20\ FEV1 = 103,14\mu g$$

- $0,5kPa * s/l = m * (PD\ R_{tot} \geq 0,5) + b$

$$0,5kPa * s/l = ,002508kPa * s/l * \mu g^{-1} * (PD\ R_{tot} \geq 0,5) + ,247kPa * s/l$$

$$PD\ R_{tot} \geq 0,5 = \frac{0,5kPa*s/l-,247kPa*s/l}{,002508(kPa*s/l)\mu g^{-1}}$$

$$PD\ R_{tot} \geq 0,5 = 100,88\mu g$$

Dieses Verfahren wurde analog für die Daten aller Testpersonen mit positivem Test durchgeführt.

Für den klinischen Alltag wurde ein Excel-Sheet entwickelt, das die Berechnung der Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ nach Eintragung der Lungenfunktionswerte vollständig übernimmt (s. Abb. 4.3 und 4.4). Hier sind die FEV1-Daten der oben gezeigten Beispielperson für die Berechnung der PD 20 FEV1 eingetragen.


III. Medizinische Klinik und Poliklinik				UNIVERSITÄTSmedizin.	
Schwerpunkt Pneumologie				MAINZ	
Methacholin-Provokation					
Datum:					
Name:		Beispiel		geb. am:	
Indikation:		V.a. Asthma bronchiale			
FEV1 baseline		<input type="text" value="4,54"/>	l		
FEV1 80 % baseline		<input type="text" value="3,63"/>	l		
letzte MCH-Dosis		<input type="text" value="100"/>	µg		
FEV1 post letzte Dosis		<input type="text" value="3,58"/>	l		
%-Abfall post letzte Dosis		<input type="text" value="21,15"/>	%		
PD 20 FEV1:		<input type="text" value="104"/>	µg		
Beurteilung:					
Datum			Unterschrift		

Abbildung 4.3.: Excel Sheet Beispiel Seite 1

Kumulativdosis	FEV1	RGP Kurve		Zeilenanzahl	Zeilenende
0	4,54	4,63932203		4	7
20	4,51	4,4440678			
60	4,17	4,05355932			
100	3,58	3,66305085			
200		2,68677966		PD20	
300		1,71050847		103,1805556	
400		0,73423729			
500		-0,2420339		Steigung	
600		-1,21830508		-0,009762712	
700		-2,19457627			
800		-3,17084746		Achsenabschnitt	
1000		-5,12338983		4,639322034	
1500		-10,0047458		Bestimmtheitsmaß R²	
2000		-14,8861017		0,941929989	
				RGP dynamisch	
			-0,00976271	4,639322034	#NV
			0,00171404	0,101404246	#NV
			0,94192999	0,131658263	#NV
			32,4411851	2	#NV
			0,5623322	0,034667797	#NV

Beispiel				
00.01.1900				00.01.1900

Abbildung 4.4.: Excel Sheet Beispiel Seite 2

4.6.2. Provokationsdosen - Aufstellung der individuellen Ergebnisse

Tabelle 4.20 zeigt die die individuellen parameterspezifischen Provokationsdosen PD 20 FEV1 sowie PD $R_{tot} \geq 0,5$. Darüber hinaus ist die PD Minimal angefügt, die in keinem Fall extrapoliert ist und die je nachdem, mit welchem Lungenfunktionsparameter (FEV1 oder R_{tot}) der Patient zuerst ein Positivkriterium erfüllt hat, entweder der PD 20 FEV1 oder der PD $R_{tot} \geq 0,5$ entspricht. Bei Personen, die bis zur Enddosis 2000 μg keine Reaktion gezeigt hatten, wurde die Enddosis als Provokationsdosis eingesetzt. Versuchsteilnehmer 1 - 18 gehören der Gruppe der Lungengesunden an, Versuchsteilnehmer 19 - 33 der Gruppe der Asthmatiker.

Bezüglich der parameterspezifischen Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ gab es intraindividuell teils erhebliche Unterschiede, wobei zu berücksichtigen ist, dass bei Erfüllung nur eines Kriteriums für einen positiven Test die jeweils andere Provokationsdosis extrapoliert wurde. Daher darf sie nur unter Vorbehalt beurteilt werden, insbesondere da der Abfall bzw. Anstieg des sich nachfolgend verändernden Lungenfunktionsparameters bekanntermaßen auch sehr plötzlich eintreten und dann heftig ausfallen kann.

Tabelle 4.20.: Individuelle Provokationsdosen

Versuchsteilnehmer	PD 20 FEV1	PD $R_{tot} \geq 0,5$	PD Minimal
1	2000	2000	2000
2	2000	2000	2000
3	418	589	418
4	2000	2000	2000
5	2000	2000	2000
6	2000	2000	2000
7	2000	2000	2000
8	2000	2000	2000
9	2000	2000	2000
10	2000	2000	2000
11	2000	2000	2000
12	2000	2000	2000
13	510	339	339
14	2000	2000	2000
15	2000	2000	2000
16	2000	2000	2000
17	255	1846	255
18	2000	2000	2000
19	109	81	81
20	222	615	222
21	325	149	149
22	1190	2000	1190
23	301	164	164
24	683	47	47
25	244	122	122
26	350	66	66
27	33	10	10
28	216	137	137
29	18	2	2
30	103	101	101
31	762	418	418
32	125	61	61
33	82	171	82

4.6.3. Auswertung der Provokationsdosen - deskriptive Statistik

Die Tabellen 4.21 und 4.22 zeigen die deskriptiven Daten zur PD 20 FEV1 und zur PD $R_{tot} \geq 0,5$:

Tabelle 4.21.: PD 20 FEV1 [μg]

	Gesund	Asthma
N	18	15
Mittelwert	1732,39	317,52
Median	2000,00	222,01
SD	617,33	324,03
Schiefe	-1,98	1,72
Minimum	254,98	17,75
Maximum	2000,00	1189,57

Tabelle 4.22.: PD $R_{tot} \geq 0,5$ [μg]

	Gesund	Asthma
N	18	15
Mittelwert	1820,80	276,34
Median	2000,00	121,55
SD	496,74	503,35
Schiefe	-2,72	3,28
Minimum	339,16	2,22
Maximum	2000,00	2000,00

Die statistische Auswertung der PD 20 FEV1 und der PD $R_{tot} \geq 0,5$ ergibt im Mann-Whitney-Test einen überaus deutlichen Unterschied zwischen den Lungengesunden und den Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale ($p < 0,001$). Völlig Lungengesunde haben bis 2000 μg die Kriterien für einen Versuchsabbruch und damit für einen positiven Test nicht erfüllt. Der Mittelwert von weniger als 2000 μg in der Gruppe der Lungengesunden ergibt sich durch die drei Probanden, die zwar klinisch asymptomatisch sind, jedoch im Provokationstest eine positive Testreaktion im Sinne eines mindestens zwanzigprozentigen FEV1-Abfalls oder eines $R_{tot} \geq 0,5$ aufweisen. Dies entspricht, wie schon erläutert, vergleichbaren Daten aus der Literatur. Die Differenz in den absoluten Werten (Median PD 20 FEV1 Gesunde 2000 μg vs. Median Asthmatiker 222 μg ; Median PD $R_{tot} \geq 0,5$ Gesunde 2000 μg vs. Median Asthmatiker 122 μg) zeigt zum einen, dass die Enddosis hoch genug angesetzt war, d.h. dass bei Probanden mit fehlender

Reaktion bei der Enddosis 2000 μg eine bronchiale Hyperreagibilität auszuschließen ist, zum anderen zeigt sich jedoch auch, dass die niedrige Anfangsdosis gerechtfertigt ist, um die Patienten nicht zu gefährden. Weiterhin ist festzustellen, dass Patienten mit relevanter bronchialer Hyperreagibilität bei deutlich unter 1000 μg reagieren, d.h. dass in der klinischen Routine das Testverfahren bei 1000 μg ohne Erkenntnisverlust abgebrochen werden kann. Wer bis 1000 μg Kumulativdosis nicht reagiert hat, bei dem ist eine relevante bronchiale Hyperreagibilität nahezu auszuschließen; vielmehr scheinen Patienten mit ausgeprägter bronchialer Hyperreagibilität sogar bei deutlich unter 500 μg mit mindestens einem der beiden Lungenfunktionsparameter FEV1 oder R_{tot} im Sinne der Erfüllung wenigstens eines Positivkriteriums zu reagieren. Bereits bei 500 μg hatten bis auf eine Testperson alle Probanden mit positivem Test mindestens eines der beiden Positivkriterien erfüllt (s. hierzu auch die Kaplan-Meier-Kurven). In Anbetracht dieser ausgeprägten Unterschiede spricht die Provokationsdosis von 1190 μg Methacholinchlorid bei einer Person aus der Gruppe der Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale eher nicht für diese Diagnose; zumindest liegt eine hochgradige bronchiale Hyperreagibilität mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit aktuell nicht vor. Patienten mit relevanter bronchialer Hyperreagibilität reagieren bereits bei deutlich unter 1000 μg Methacholinchlorid, während die völlig Lungengesunden auch nach Inhalation von 2000 μg noch keine signifikante Reaktion im Sinne eines positiven Tests zeigen. Dies bestätigen auch die Auswertungen (z.B. ROC-Kurven) in den folgenden Kapiteln.

Die folgende Tabelle 4.23 zeigt die deskriptive Statistik für die gemeinsame Betrachtung von PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$. Dies wurde erreicht, indem beide Werte berechnet und der kleinere, also keinesfalls extrapolierte Wert in der weiteren Auswertung verwendet wurde. Diese Provokationsdosis wird im folgenden als PD Minimal bezeichnet.

Tabelle 4.23.: PD Minimal [μg]

	Gesund	Asthma
N	18	15
Mittelwert	1722,89	190,16
Median	2000,00	100,88
SD	638,22	294,41
Schiefe	-1,96	3,19
Minimum	254,98	2,22
Maximum	2000,00	1189,57

Auch hier ergibt sich folgerichtig ein p-Wert von $< 0,001$.

4.6.4. Kaplan-Meier-Kurven

Kaplan-Meier-Kurven messen die Zeitspanne, in der statistischen Fachsprache *time to event* genannt, bis zum Eintritt eines klinisch relevanten Ereignisses oder bis zum Ende der Nachbeobachtung. In dieser Untersuchung heißt das, dass die Provokationsdosis (= Zeitspanne) auf der Abszisse gegen den Eintritt eines Positivkriteriums und damit den Versuchsabbruch auf der Ordinate aufgetragen wird. Das Ende der Nachbeobachtung (= Zensur) entspricht der Enddosis 2000 μg . Diese Kurven wurden für die PD 20 FEV1, die PD $R_{tot} \geq 0,5$ sowie die kombinierte PD Minimal erstellt (s. Abb. 4.5, 4.6 und 4.7). Der Logrank-Test zum Lagevergleich zweier unverbundener Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurven ergibt für alle drei Kurven jeweils einen p-Wert von $< 0,001$, zeigt also ebenfalls einen sehr deutlichen Unterschied an.

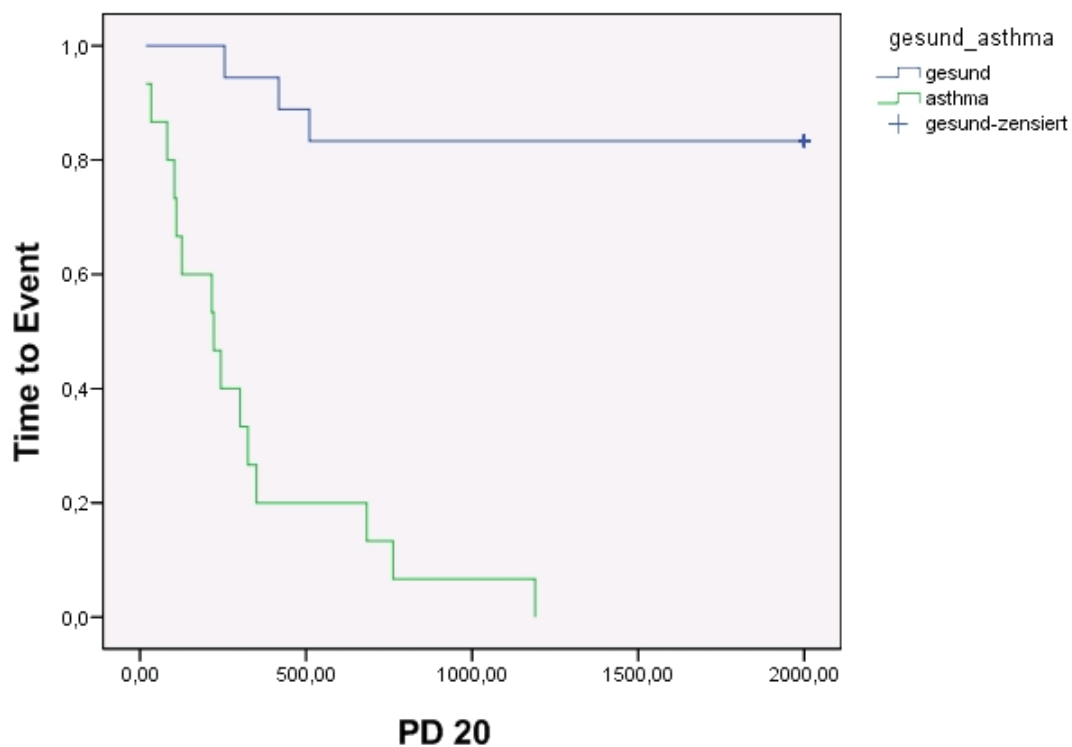


Abbildung 4.5.: Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurve PD 20 FEV1

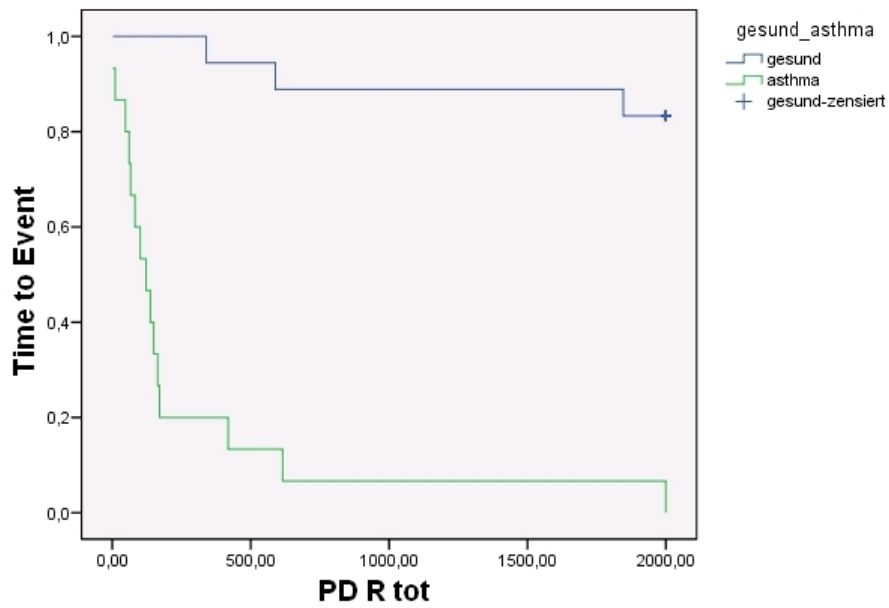


Abbildung 4.6.: Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurve PD R_{tot} ≥ 0,5

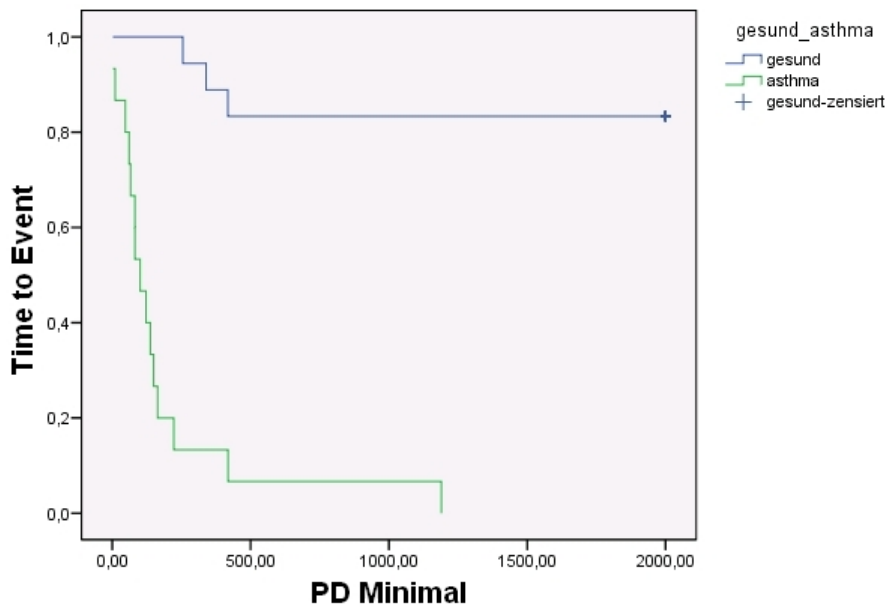


Abbildung 4.7.: Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurve PD Minimal

4.6.5. ROC-Kurven bei Berücksichtigung bis 2000 μg

Die Receiver Operating Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) ist eine Methode zur Bewertung und Optimierung von Analyse-Strategien. Die ROC-Kurve stellt die Abhängigkeit der Effizienz von der Fehlerrate dar. Sie ist eine Methode zur Grenzwertoptimierung. Man ermittelt für jeden möglichen Grenzwert die resultierenden relativen Häufigkeitsverteilungen und errechnet die jeweils zugehörige Sensitivität und Spezifität. In einem Diagramm mit der Ordinate Sensitivität (= relative Häufigkeit aller richtig positiven Testergebnisse) und der Abszisse 1-Spezifität (= relative Häufigkeit aller falsch positiven Testergebnisse) trägt man die diesbezüglichen Wertepaare ein. Es resultiert im günstigen Fall eine gekrümmte, parabelartige Kurve. Das theoretische Optimum des Testgrenzwerts ermittelt man dann aus dem Kontaktpunkt einer 45° ansteigenden Tangente mit der ROC-Kurve, sofern die Achsen einheitlich skaliert wurden. Anderenfalls muss der Tangentenanstieg gleich dem Quotienten $100\% \text{ Sensitivität} / |100\% \text{ Spezifität}|$ sein (Wikipedia, 2009b). Schließlich kann daraus der optimale Cutoff Point, nämlich die Schwellendosis, zur Unterscheidung zwischen positivem und negativem Test abgelesen werden.

Im konkreten Fall bedeutet dies, dass ROC-Kurven für alle drei Provokationsdosen, also PD 20 FEV1, PD $R_{tot} \geq 0,5$ und PD Minimal, berechnet wurden. Aus den Koordinaten der Kurven sind dann die Sensitivität (Anzahl der als richtig positiv erkannten an allen positiven Testergebnissen, also Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen) und die Spezifität (Anzahl der als richtig negativ erkannten an allen negativen Testergebnissen, also Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich negativen Sachverhalt auch durch ein negatives Testergebnis zu erkennen) bei einer bestimmten Dosis ablesbar.

Aus Tabelle 4.24 sowie Abbildung 4.8 ist ersichtlich, dass bei einer Dosis von z.B. $\leq 1000 \mu\text{g}$ die Sensitivität des Tests aufgrund der PD 20 FEV1 bei $>93\%$ liegt, die Spezifität bei 83% . Alle weiteren Sensitivitäten bzw. Spezifitäten sind leicht aus der Tabelle ablesbar. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in dieser Berechnung auch die Probanden mit bronchialer Hyperreagibilität unter den als lungengesund eingestuften Testpersonen sowie eine "Asthmatikerin", bei der die Diagnose im Nachhinein in Zweifel zu ziehen ist, enthalten sind, ist davon auszugehen, dass in der klinischen Routine Sensitivität und Spezifität sowie positiver und negativer prädiktiver Wert des Tests eher noch besser sind. So würde man ja z.B. klinisch asymptotische Patienten mit bronchialer Hyperreagibilität, die in dieser Testung das Testergebnis leicht verzerrt

haben, im klinischen Alltag nicht testen. Diese Gesichtspunkte gelten entsprechend auch für alle weiteren ROC-Kurven.

Tabelle 4.24.: Koordinaten der ROC-Kurve PD 20 FEV1

Positiv, wenn $\leq [\mu\text{g}]$	Sensitivität	1 - Spezifität
16,7500	,000	,000
25,5850	,067	,000
57,6600	,133	,000
92,5200	,200	,000
106,1650	,267	,000
117,3100	,333	,000
170,7100	,400	,000
219,0000	,467	,000
232,7800	,533	,000
249,2650	,600	,000
277,9650	,600	,056
312,9950	,667	,056
337,7000	,733	,056
384,0750	,800	,056
464,0600	,800	,111
596,4550	,800	,167
722,2700	,867	,167
975,7650	,933	,167
1594,7850	1,000	,167
2001,0000	1,000	1,000

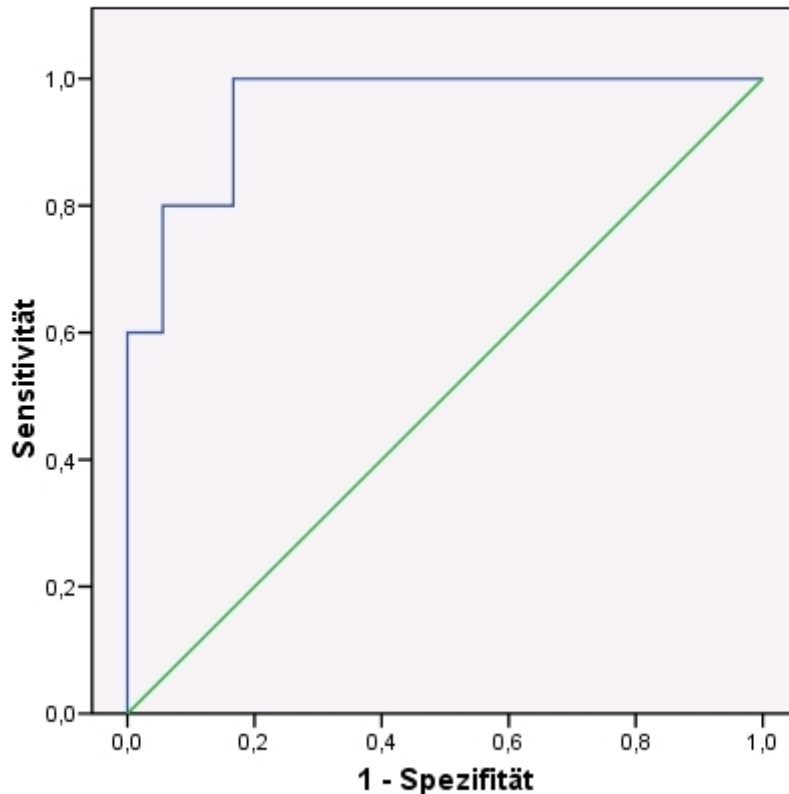


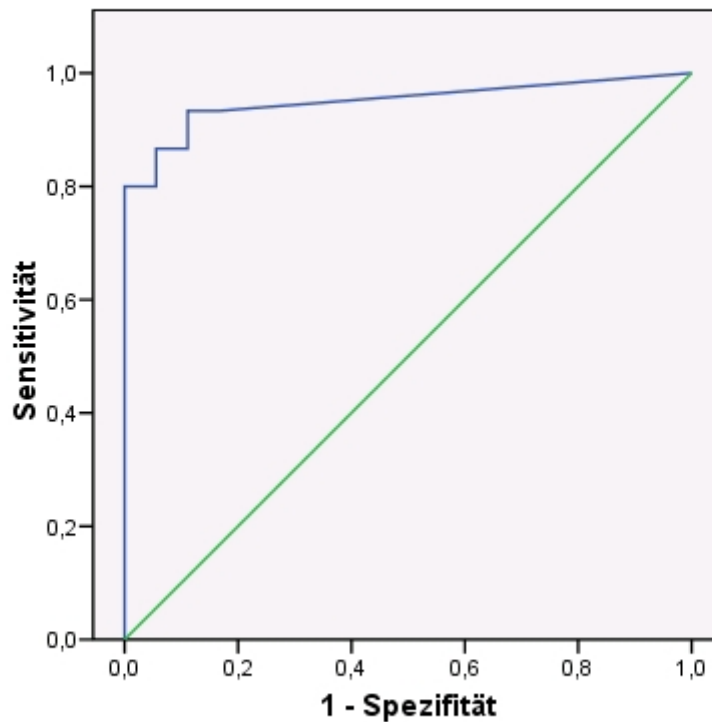
Abbildung 4.8.: ROC-Kurve für PD 20 FEV1

Die Sensitivität des Tests aufgrund der PD $R_{tot} \geq 0,5$ liegt, wie Tabelle 4.25 und Abbildung 4.9 zeigen, bei einer Enddosis von beispielsweise $1000 \mu\text{g}$ bei ca. 90 %, die Spezifität bei 89 %. Die PD $R_{tot} \geq 0,5$ weist dabei bereits bei geringeren Dosen eine höhere Sensitivität bei höherer Spezifität auf als die PD 20 FEV1. Im Bereich der Schwellendosis für einen positiven Test von $500 - 1000 \mu\text{g}$ gleichen sich Sensitivität und Spezifität beider Parameter jedoch zunehmend an. Die diagonalen Segmente in Abbildung 4.9 ergeben sich, weil in beiden Gruppen identische Provokationsdosen auftraten. Sie treten vor allem dann auf, wenn auf einer größeren Skala gemessen wird. Im Prinzip kommen durch die Regressionsschätzung in dieser Studie praktisch nie gleiche Provokationsdosen für verschiedene Probanden heraus. Allerdings wurde bei den Probanden, die nicht reagiert hatten, die Provokationsdosis aus den dargelegten Gründen gleich $2000 \mu\text{g}$ (bzw. im nächsten Abschnitt gleich $1000 \mu\text{g}$) gesetzt, so dass es hier gleiche Provokationsdosen in beiden Gruppen gibt. Deshalb geht die ROC-Kurve vom Punkt (0,167; 0,933) in einem Schritt zum Punkt (1; 1). Das diagonale Segment ist in diesem

Fall also ein Artefakt, das für die Aussagekraft der ROC-Analyse jedoch irrelevant ist.

Tabelle 4.25.: Koordinaten der ROC-Kurve PD $R_{tot} \geq 0,5$

Positiv, wenn \leq [μg]	Sensitivität	1 - Spezifität
1,2200	,000	,000
6,3500	,067	,000
28,8400	,133	,000
54,0200	,200	,000
63,3850	,267	,000
73,6950	,333	,000
91,1700	,400	,000
111,2150	,467	,000
129,2600	,533	,000
143,0950	,600	,000
156,5550	,667	,000
167,3950	,733	,000
255,0300	,800	,000
378,7450	,800	,056
503,6850	,867	,056
602,1150	,867	,111
1230,6700	,933	,111
1923,0750	,933	,167
2001,0000	1,000	1,000



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 4.9.: ROC-Kurve für PD $R_{tot} \geq 0,5$

Tabelle 4.26 und Abbildung 4.10 demonstrieren die Daten für die kombinierte Provokationsdosis PD Minimal. Bei gemeinsamer Betrachtung beider Positivkriterien, also der PD Minimal, weist das hier vorliegende Protokoll bei 1000 μg eine Sensitivität von über 93 % bei einer Spezifität von 83 % auf. Bereits bei 500 μg liegt die Sensitivität bei fast 90 % bei einer Spezifität von 83 %, so dass bei einer PD Minimal jenseits von 500 μg nicht von einer höhergradigen bronchialen Hyperreagibilität auszugehen ist und jenseits von 1000 μg eine klinisch relevante bronchiale Hyperreagibilität mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nicht vorliegt. Demnach kann hier der Cutoff bzw. die Schwellendosis zwischen Normo- und Hyperreaktivität gesetzt und der Test abgebrochen werden.

Tabelle 4.26.: Koordinaten der ROC-Kurve PD Minimal

Positiv, wenn \leq [μg]	Sensitivität	1 - Spezifität
1,2200	,000	,000
6,3500	,067	,000
28,8400	,133	,000
54,0200	,200	,000
63,3850	,267	,000
73,6950	,333	,000
81,6800	,400	,000
91,3900	,467	,000
111,2150	,533	,000
129,2600	,600	,000
143,0950	,667	,000
156,5550	,733	,000
192,9500	,800	,000
238,4950	,867	,000
297,0700	,867	,056
378,4750	,867	,111
418,0600	,867	,167
803,9500	,933	,167
1594,7850	1,000	,167
2001,0000	1,000	1,000

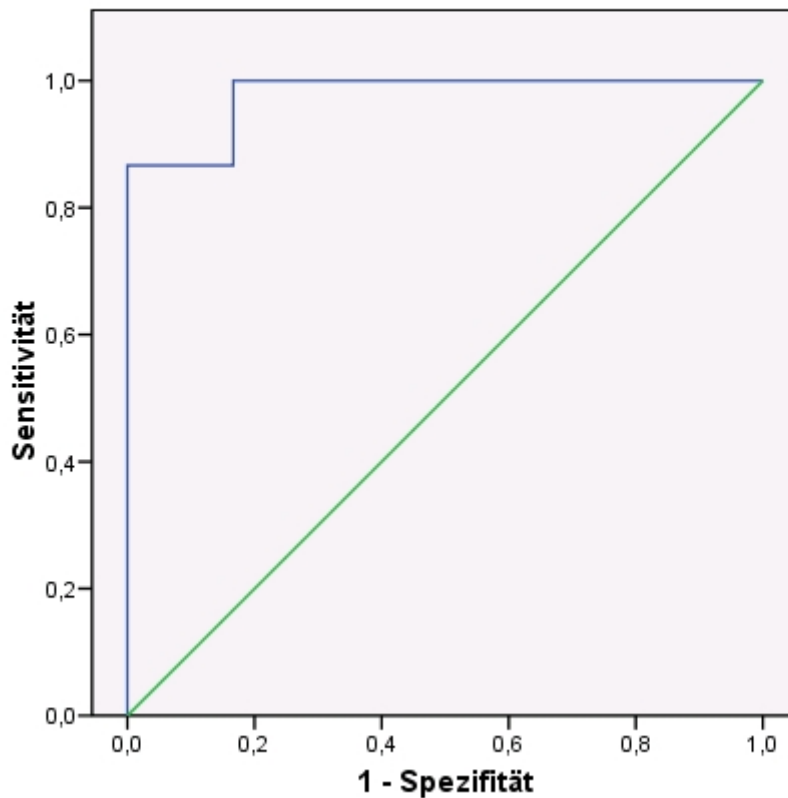


Abbildung 4.10.: ROC-Kurve für PD Minimal

4.6.6. ROC-Kurven bei Berücksichtigung bis 1000 μg

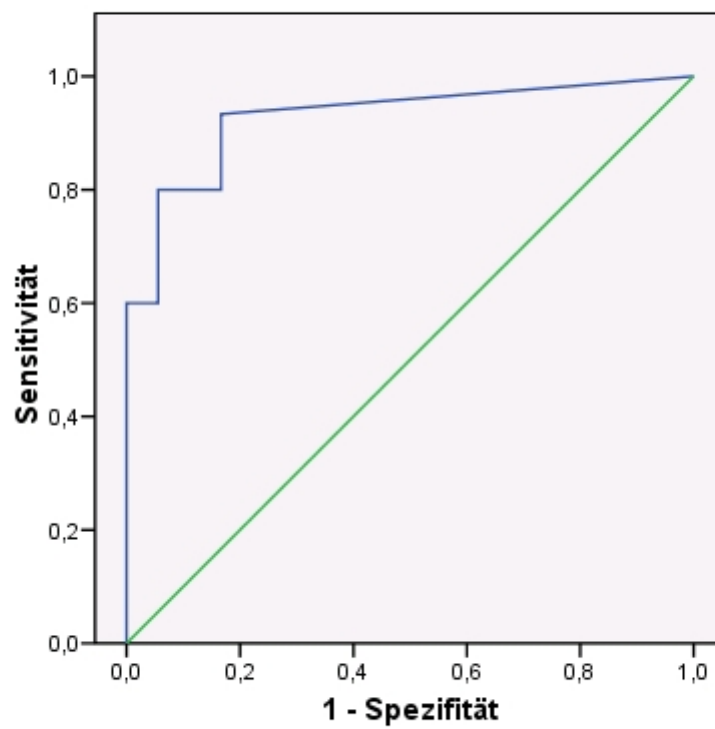
Da in der klinischen Routine ein Testverfahren bis 2000 μg sehr zeitaufwendig wäre und sich aus den vorangehenden Daten ablesen lässt, dass Patienten mit relevanter bronchialer Hyperreagibilität bei Dosen von deutlich unter 1000 μg reagieren, wurden auch ROC-Kurven bei Berücksichtigung der Lungenfunktionswerte nur bis 1000 μg berechnet. Praktisch bedeutet dies, dass die Enddosis und damit Provokationsdosis der Testpersonen, die bis 1000 μg nicht reagiert hatten, gleich 1000 μg gesetzt wurde. Dies veränderte daher nur die Provokationsdosen von allen Testpersonen, die bis 2000 μg gar nicht reagiert hatten, sowie von einer einzigen Person, die zwischen 1000 μg und 2000 μg reagiert hatte. Ein wesentlicher Unterschied in den Sensitivitäten und Spezifitäten ist also nicht zu erwarten gewesen. Aus Gründen der statistischen Korrektheit wurden die Berechnungen dennoch durchgeführt, um in der klinischen Routine die Provokationstest-

tung bei 1000 μg abbrechen zu können.

Die folgende Tabelle 4.27 und die anschließende Abbildung 4.11 stellen Sensitivitäten und Spezifitäten für die PD 20 FEV1 bei Berücksichtigung der Versuchsdaten bis 1000 μg dar:

Tabelle 4.27.: Koordinaten der ROC-Kurve PD 20 FEV1 bei Abbruch bei 1000 μg

Positiv, wenn $\leq [\mu\text{g}]$	Sensitivität	1 - Spezifität
16,7500	,000	,000
25,5850	,067	,000
57,6600	,133	,000
92,5200	,200	,000
106,1650	,267	,000
117,3100	,333	,000
170,7100	,400	,000
219,0000	,467	,000
232,7800	,533	,000
249,2650	,600	,000
277,9650	,600	,056
312,9950	,667	,056
337,7000	,733	,056
384,0750	,800	,056
464,0600	,800	,111
596,4550	,800	,167
722,2700	,867	,167
880,9800	,933	,167
1001,0000	1,000	1,000



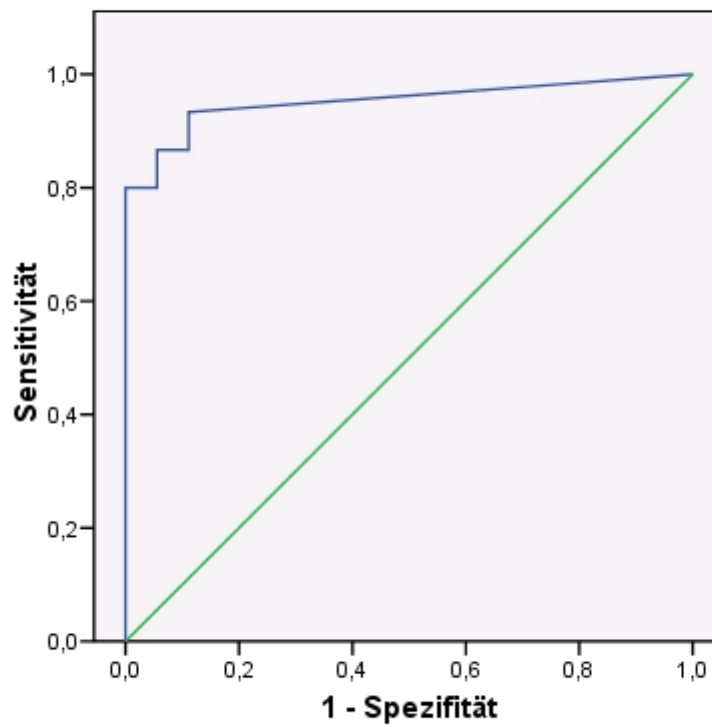
Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 4.11.: ROC-Kurve für PD 20 FEV1 bei Abbruch bei 1000 µg

Entsprechend sind aus Tabelle 4.28 und Abbildung 4.12 die Sensitivitäten und Spezifitäten für die PD $R_{tot} \geq 0,5$ bei Berücksichtigung bis 1000 μg ablesbar:

Tabelle 4.28.: Koordinaten der ROC-Kurve PD $R_{tot} \geq 0,5$ bei Abbruch bei 1000 μg

Positiv, wenn $\leq [\mu\text{g}]$	Sensitivität	1 - Spezifität
1,2200	,000	,000
6,3500	,067	,000
28,8400	,133	,000
54,0200	,200	,000
63,3850	,267	,000
73,6950	,333	,000
91,1700	,400	,000
111,2150	,467	,000
129,2600	,533	,000
143,0950	,600	,000
156,5550	,667	,000
167,3950	,733	,000
255,0300	,800	,000
378,7450	,800	,056
503,6850	,867	,056
602,1150	,867	,111
807,5950	,933	,111
1001,0000	1,000	1,000



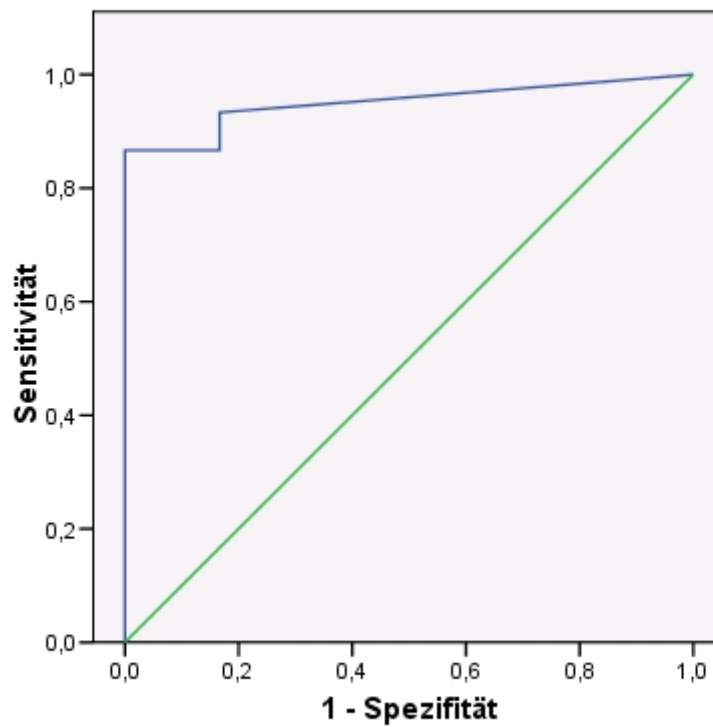
Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 4.12.: ROC-Kurve für PD R_{tot} ≥ 0,5 bei Abbruch bei 1000 µg

Aus Tabelle 4.29 und Abbildung 4.13 gehen die Sensitivitäten und Spezifitäten für die kombinierte Betrachtung der Provokationsdosen bei Berücksichtigung der Versuchsdaten bis 1000 µg hervor:

Tabelle 4.29.: Koordinaten der ROC-Kurve PD Minimal bei Abbruch bei 1000 µg

Positiv, wenn ≤ [µg]	Sensitivität	1 - Spezifität
1,2200	,000	,000
6,3500	,067	,000
28,8400	,133	,000
54,0200	,200	,000
63,3850	,267	,000
73,6950	,333	,000
81,6800	,400	,000
91,3900	,467	,000
111,2150	,533	,000
129,2600	,600	,000
143,0950	,667	,000
156,5550	,733	,000
192,9500	,800	,000
238,4950	,867	,000
297,0700	,867	,056
378,4750	,867	,111
418,0600	,867	,167
709,1650	,933	,167
1001,0000	1,000	1,000



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 4.13.: ROC-Kurve für PD Minimal bei Abbruch bei 1000 µg

Insgesamt ergeben sich in der Tat nur relativ geringfügige Änderungen bzgl. der Sensitivitäten und Spezifitäten unterhalb von 1000 µg, wenn man die Versuchsdaten nur bis 1000 µg berücksichtigt. Daher kann der Test in der klinischen Routine bei 1000 µg ohne Gefahr des Erkenntnisverlustes abgebrochen werden.

4.6.7. Korrelation zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$

Das Streudiagramm 4.14 stellt die Korrelation zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ dar. Die Subgruppen sind farbig gekennzeichnet.

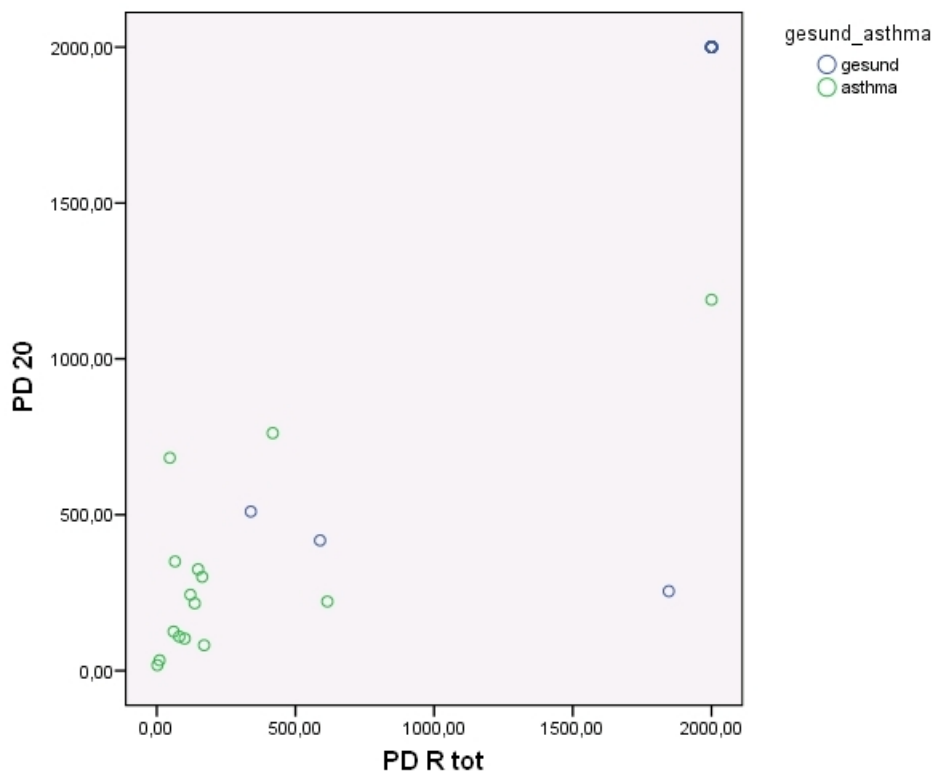


Abbildung 4.14.: Streudiagramm Gesamt

Graphisch und auch anhand des Spearman-Rho Rangkorrelationskoeffizienten (s. Tab. 4.30) ist ersichtlich, dass es bei den Asthmatikern keine enge Korrelation zwischen den Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ gibt (Spearman-Korrelationskoeffizient = 0,486). Diese Beobachtung ist nicht verwunderlich. Sie deckt sich einerseits mit der täglichen klinischen Erfahrung; diese lehrt nämlich, dass sich die Atemwegsobstruktion bei manchen Patienten vor allem zunächst mehr in einem FEV1-Abfall widerspiegelt, bei anderen Patienten mehr in einem erhöhten Atemwegswiderstand und dass bei wiederum anderen Patienten beide Parameter frühzeitig eine Atemwegsobstruktion anzeigen. Auch in der Literatur wird vielfach berichtet, dass sich die zunehmende Atemwegsobstruktion interindividuell und sogar intraindividuell auf verschiedene Weisen lungenfunktionstechnisch widerspiegeln kann (Orehek, 1982; Orehek *et al.*, 1982; Schlegel, 1988). Bei den Lungengesunden wurde, die drei hyperreagiblen Probanden ausgenommen, die Provokationsdosis gleich 2000 μg gesetzt. Der Korrelationskoeffizient fällt also zwangsläufig hoch aus; daher sollte er für die Lungengesunden

nicht berechnet werden. Aus den Korrelationen der drei Hyperreagiblen im Kollektiv der Lungengesunden lassen sich aufgrund der niedrigen Fallzahl ebenfalls keine Schlüsse ziehen. Im Gesamtkollektiv ist die Berechnung des Korrelationskoeffizienten zumindest fragwürdig, zum einen aus den gerade bei den Lungengesunden genannten Gründen, zum anderen, da bei der Zusammensetzung von verschiedenen Punktwolken, wie in der Statistik bekannt, auch unsinnige Korrelationen entstehen können. Wenn das auch hier nicht der Fall ist, so zeigt allein schon die Betrachtung der Grafik, dass auch im Gesamtkollektiv keine eindeutige Korrelation zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ besteht.

Tabelle 4.30.: Korrelationen zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$

	Spearman-Rho Korrelationskoeffizient
Asthmatiker	0,486
Gesamtkollektiv	0,902

5. Diskussion

5.1. Material und Methoden

Der inhalative Provokationstest mit Methacholin ist die am meisten akzeptierte Methode in der Diagnostik der bronchialen Hyperreagibilität. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass vielerlei Faktoren das Untersuchungsergebnis beeinflussen (Benson, 1979; Cheung *et al.*, 1995; Cockcroft und Swystun, 1997; Crapo *et al.*, 2000; Derom *et al.*, 1992; Empey *et al.*, 1976; Freezer *et al.*, 1995; Greenspon und Morrissey, 1986; Jensen *et al.*, 1998; Juniper *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1998; Lemièrre *et al.*, 1996; Magnussen *et al.*, 1995; Schlegel, 1988; Wilson *et al.*, 1987). Hierzu zählen:

Technische Faktoren:

- Wahl der Provokationssubstanz
- Präparation und Handhabung der Methacholintestlösung
- Aerosolherstellung und damit Partikelgröße sowie Art der Vernebelung der Testlösung
- Art und Weise der Aerosol-Inhalation (inspiratorischer Fluss, Inspirationsvolumen pro Vernebelung)
- Methode der Messung der Provokationsreaktion
- Ermittlung und Interpretation der Messergebnisse

Nicht-technische Faktoren:

- Medikation
- Ausgangswert
- Bronchialinfekte

- Allergenkontakt
- Nahrungsmittel

Insbesondere die Einflüsse, die aufgrund der nicht-technischen Faktoren und damit aufgrund der inter- und intraindividuellen Schwankungsbreite zustande kommen, sind auch in Versuchsreihen nur bedingt zu beseitigen. Umso wichtiger ist es daher, die beeinflussbaren, d.h. also vor allem die technischen Faktoren zu optimieren, um möglichst genau reproduzierbare und zwischen verschiedenen Lungenfunktionslabors vergleichbare Provokationsergebnisse zu erhalten. Dennoch gilt, dass jedes Lungenfunktionslabor für die von ihm verwendete Methode eigene Normwerte und Grenzdosen ermitteln muss (Britton und Tattersfield, 1986; Hargreave *et al.*, 1985; Klein *et al.*, 1998; Klein und Matthys, 1986; Prätter und Irwin, 1984; Schultze-Werninghaus, 1985).

Grundlage fast aller heute verwendeten Verfahren des inhalativen Methacholinprovokationstests ist das von Chai *et al.* in der klinischen Routine etablierte Dosimeterprotokoll, welches mit sich verdoppelnden Konzentrationen der zu inhalierenden Lösung zur Dosissteigerung arbeitet (Chai *et al.*, 1975). Darauf aufbauend haben sich diverse Untersuchungen der weiteren Verbesserung der Genauigkeit und Sicherheit der Methacholinprovokation gewidmet. Zur Zeit sind die Leitlinien der American Thoracic Society (ATS) zur Methacholinprovokation der Standard, an dem sich Pneumologen weltweit orientieren (Crapo *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich um das sogenannte Five-breath-Dosimeterprotokoll, welches mit sich vervierfachenden Konzentrationen der Provokationssubstanz arbeitet. Diese Vorgehensweise wird vor allem dem in der klinischen Routine nicht zu unterschätzenden Zeitfaktor gerecht, bringt jedoch auch Nachteile mit sich. Erstens nimmt aufgrund der größeren Dosis sprünge die Genauigkeit der absoluten Provokationsdosis ab; dabei sind diese Dosis sprünge auch kontraproduktiv für die Sicherheit des Testverfahrens. Zweitens sind die ermittelten Provokationskonzentrationen nicht direkt vergleichbar mit Provokationsprotokollen, die mit sich verdoppelnden Konzentrationen der Testsubstanz arbeiten, da sich völlig andere Kumulativdosen ergeben und eine völlig andere Reaktionskinetik zu erwarten ist. Aufgrund dieser Problematik entwickelte sich die Zielsetzung der Entwicklung eines Dosimeterprotokolls, welches die Methacholindosis allein über die Anzahl der Atemzüge bei gleichbleibender Konzentration der Provokationslösung steigert (Schlegel *et al.*, 1994a). Die Dosissteigerung soll so erfolgen, dass mit einer ausreichend niedrigen, also sicheren, Ausgangskonzentration begonnen und die Grenzdosis zum Ausschluss einer relevanten bronchialen Hyperreagibilität in unter methodischen und praktischen Aspekten akzeptabler Zeit erreicht wird. Es ergeben sich hieraus vor allem zwei Vorteile. Da das Ansetzen einer Verdünnungsrei-

he der Testsubstanz im Lungenfunktionslabor entfällt, wird eine wesentliche potentielle Fehlerquelle ausgeschlossen. Daher kann dieses Vorgehen die Genauigkeit der ermittelten Provokationsdosis erhöhen und verhindern, dass dem Patienten falsch hohe Dosen als Ausgangsdosis verabreicht werden. Darüber hinaus verspricht dieses Vorgehen aus zeitökonomischen Gründen Vorteile oder ist zumindest dem Protokoll der sich vervierfachenden Dosen gleichwertig.

In der hier vorliegenden Versuchsreihe wurde das inspirationsgetriggerte Dosimetersystem ZAN 200 ProvAir II zur Applikation der Testsubstanz verwendet. Die Anwendung von Dosimetersystemen ist im allgemeinen mit einer besseren Reproduzierbarkeit verbunden als eine vom Patienten selbst aktivierte Vernebelung oder eine Dauervernebelung mit Ruheatmung (Beach *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1998). Alternativ wird heute auch die Reservoirmethode akzeptiert (Baur *et al.*, 2008; Crapo *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1998), da sie offenbar mit einer besonders geringen Variabilität der intrabronchial deponierten Aerosolmenge einhergeht. Als Verneblertopf wurde, wie vom Hersteller vorgeschlagen, der DeVilbiss 646 verwendet. Die Vor- und Nachteile des DeVilbiss 646 sind bereits eingehend untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass er zwar für die klinische Routine akzeptable Ergebnisse liefert (Crapo *et al.*, 2000), dass jedoch eine erhebliche Variabilität der Auswurfleistung besteht (Arossa *et al.*, 1984; Ferron *et al.*, 1976; Hollie *et al.*, 1991; Jörres *et al.*, 1992; Massey *et al.*, 1982; Merkus *et al.*, 1992; Sterk *et al.*, 1984). Deshalb muss jeder Verneblertopf auf seine Auswurfleistung hin untersucht werden (Arossa *et al.*, 1984; Dennis *et al.*, 1992; Hollie *et al.*, 1991).

In den Leitlinien der American Thoracic Society zur Methacholin-Provokation wird empfohlen, den Vent während der Untersuchung verschlossen zu halten, weil die Auswurfleistung bei offenem Vent höher und noch variabler ist (Crapo *et al.*, 2000; Mercer *et al.*, 1969). Der Hersteller des ZAN 200 ProvAir II empfiehlt hingegen, den Vent offen zu lassen (nSpire Health GmbH, 2008). Insgesamt finden sich also zu dieser Problemstellung unterschiedliche Meinungen in der Literatur. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde der Vent bewusst offen gelassen, und zwar aus folgenden Überlegungen heraus: Die scheinbar höhere Variabilität der Auswurfleistung bei offenem Vent könnte durch den Verlust von Lösung durch die Vent-Öffnung mitbedingt sein; bei den Vorversuchen zur Kalibration des hier verwendeten Verneblertopfes belief sich der Verlust von Lösung über den Vent auf bis zu 50 - 100 mg, wenn ein größerer Tropfen während der Inspiration aus der Ventöffnung austrat. Vor allem jedoch besteht die Gefahr, dass dem Patienten falsch und mitunter gefährlich hohe Dosen der Provokationssubstanz verabreicht werden, wenn die Validierung eines Protokolls mit ge-

geschlossenem Vent erfolgt ist, der Vent dann jedoch in der klinischen Routine versehentlich offen bleibt. Es ist davon auszugehen, dass bei geschlossenem Vent ungefähr ein Drittel weniger Lösung vernebelt wird, andere Daten sprechen von einem 2:1 Verhältnis von offenem zu geschlossenem Vent (Crapo *et al.*, 2000; Dolovich, 1985; Mercer *et al.*, 1969). Insofern erscheinen die Ergebnisse der in dieser Versuchsreihe durchgeführten Kalibrationsversuche zur Verneblerleistung realistisch. Dabei wurde eine Verneblerleistung von 11,44 mg pro Vernebelung bei offenem Vent ermittelt, während in den ATS-Leitlinien von 9 mg +/- 10 % bei geschlossenem Vent ausgegangen wird. Laut Herstellerangaben zum ZAN 200 ProVair II sind alle Verneblertöpfchen auf 14 +/- 1mg Auswurfleistung pro Vernebelung geeicht. Diese Genauigkeit erscheint angesichts der bekanntermaßen ausgeprägten Variabilität der Auswurfleistung der DeVilbiss 646 Verneblertöpfchen nahezu ausgeschlossen, weshalb, wie bereits oben erwähnt, jeder Verneblertopf vor Inbetriebnahme und in regelmäßigen Abständen im eigenen Lungenfunktionslabor auf seine Auswurfleistung hin kalibriert werden muss und ein entsprechendes Dosisschema nach jeder Kalibration neu erstellt werden sollte. Prinzipiell wäre es wünschenswert, auch in der klinischen Routine nach jedem Inhalationsschritt zu wiegen, wieviel Lösung inhaliert worden ist, um die applizierte Dosis der Provokationssubstanz möglichst genau zu bestimmen. Da insbesondere in der klinischen Routine der Ausschluss von Fehlerquellen wie Austritt von Lösung in Tropfenform durch das Mundstück oder den Vent schlecht und nur unter erheblichem Zeitaufwand möglich erscheint, wurde in der hier vorliegenden Versuchsreihe von diesem Vorgehen Abstand genommen.

Letztlich ist auch die vom Hersteller des ZAN 200 ProVair II beschriebene Partikelgröße von 0,3 - 0,5 μm zu hinterfragen, zumal die Quelle dieser Angabe im Benutzerhandbuch nicht ersichtlich ist. Im allgemeinen besteht Konsens, dass Partikel mit einer Größe über 5 μm entweder an der Stimmritze hängen bleiben (Clay *et al.*, 1983; Newman *et al.*, 1985) oder in den zentralen Atemwegen verbleiben, Partikel mit einer Größe zwischen 1 und 5 μm in den peripheren Atemwegen sedimentieren und daher zu favorisieren sind und Partikel unter 1 μm nicht sedimentieren (Benson, 1979; Crapo *et al.*, 2000; Hollie *et al.*, 1991; Morrow, 1974; Newhouse, 1982; Newman *et al.*, 1982). In der Arbeit von Hollie wurden zehn DeVilbiss 646 Nebulizer unter Verwendung des DeVilbiss model 6510D Kompressors unter anderem auf den Anteil der Partikel in der "respirable range" von 1 bis 5 μm getestet; hierbei ergaben sich zwar erhebliche Differenzen, jedoch lag der Anteil insgesamt bei knapp unter 75 %, so dass die Herstellerangabe von 0,3 - 0,5 μm Partikelgröße des Standardverneblers unter Vorbehalt zu betrachten ist.

Die Inhalation des Diluents, also NaCl 0,9 %, vor Beginn der Provokation wird in

der Literatur kontrovers diskutiert (Connolly *et al.*, 1988; Crapo *et al.*, 2000; Wanger und Irvin, 1998), da dieses Vorgehen Vor- und Nachteile mit sich bringt. Bei den in dieser Untersuchung durchgeführten Vorversuchen zur Vernebelungsleistung des DeVilbiss 646 hat sich ergeben, dass sich eine relativ konstante Vernebelungsleistung erst nach ausreichender Benetzung des Verneblers mit Lösung einstellt. Insofern erscheint eine Inhalation des Diluents schon aus diesem Grund bei Verwendung des DeVilbiss 646 unabdingbar. Ein weiterer in der Literatur angeführter Nutzen ist das Erlernen der richtigen Inhalationstechnik während der Inhalation des Lösungsmittels (Crapo *et al.*, 2000). Gegenargumente gegen den vorgeschalteten Schritt der Inhalation des Lösungsmittels sind zum einen zeitökonomische Gründe, zum anderen auch die Ansicht, dass die Inhalation des Lösungsmittels keine größere Sicherheit für den Test bringt, da die Anfangskonzentration des Methacholins in allen Protokollen so gewählt sein sollte, dass der Patient auch bei starker bronchialer Hyperreagibilität nicht gefährdet wird. Nur ein Prozent der getesteten Personen reagieren auf die Inhalation des Lösungsmittels mit einem Abfall der FEV1 um mehr als 20 % (Wanger und Irvin, 1998). Die Bedeutung dieses Abfalls ist umstritten. Zum einen könnte es sich tatsächlich um eine Reaktion auf das Lösungsmittel NaCl handeln, zum anderen könnte aber auch eine reflektorische Reaktion auf forcierte Atemmanöver vorliegen (Crapo *et al.*, 2000; Konietzko, 1982; Tweedale *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1982).

5.2. Ergebnisse

Im Vergleich mit anderen Protokollen zeigte sich, dass auch das neue Protokoll zuverlässig und sicher zwischen gesund und krank unterscheidet, wobei für eine korrekte Interpretation des Testergebnisses unabdingbar immer auch die genaue Anamnese hinsichtlich Asthma-Symptomen, Medikation, Raucherstatus, Atemwegsinfekten, der Krankheitsverlauf und andere lungenfunktionsdiagnostische Parameter zu berücksichtigen sind (Klein *et al.*, 1998). Insgesamt erfüllten 55 % der Probanden wenigstens ein Kriterium für ein positives Testergebnis, 45 % zeigten keine Reaktion im Sinne eines positiven Tests. In der Gruppe der Lungengesunden lag das Verhältnis bei 83 % negativer Testergebnisse bis zur Enddosis von 2000 µg zu 16 % positiver Testergebnisse, während in der Gruppe der Asthmatiker 100 % vor der Enddosis einen positiven Test aufwiesen.

Darüber hinaus ist interessant, welches der Positivkriterien eher erfüllt wurde. In der Gruppe der Lungengesunden erfüllten drei Personen vor Erreichen der Enddosis von 2000 µg ein Positivkriterium; davon wiesen zwei einen zwanzigprozentigen Abfall

der FEV₁, eine einen Anstieg des Atemwegswiderstandes R_{tot} auf $\geq 0,5$ kPa*s/l auf. Beide Kriterien zusammen wurden von keiner der Personen erfüllt. In der Gruppe der Patienten mit bekanntem Asthma bronchiale erreichte keine der Testpersonen die Enddosis von 2000 µg. Drei Personen waren vorher um 20 % mit der FEV₁ abgefallen, bei neun Personen war ein Anstieg des Atemwegswiderstandes R_{tot} auf $\geq 0,5$ kPa*s/l zu verzeichnen und drei Personen erfüllten beide Kriterien für ein positives Testergebnis.

Bezüglich der parameterspezifischen Provokationsdosen PD 20 FEV₁ und PD $R_{tot} \geq 0,5$ gab es intraindividuell teils erhebliche Unterschiede, wobei zu berücksichtigen ist, dass bei Erfüllung nur eines Kriteriums für einen positiven Test die jeweils andere Provokationsdosis extrapoliert wurde. Daher darf sie nur unter Vorbehalt beurteilt werden, insbesondere da der Abfall bzw. Anstieg des sich nachfolgend verändernden Lungenfunktionsparameters bekanntermaßen auch plötzlich eintreten und dann heftig ausfallen kann. Diese Beobachtung entspricht den Daten aus der Literatur (Schlegel, 1988). Dort wird beschrieben, dass es bei manchen Patienten mit bronchialer Hyperreagibilität zunächst zu einem Abfall der FEV₁ kommt, bei anderen zunächst der Atemwegswiderstand ansteigt, während sich bei wiederum anderen beide Parameter von Beginn der Provokationstestung an simultan verändern. Dabei entspricht ein Abfall der FEV₁ und des PEF von 20 % meist in etwa einem Anstieg des totalen Atemwegswiderstandes auf $\geq 0,5$ kPa*s/l. Bereits bei der normalen Lungenfunktionsmessung kann man beobachten, dass sich die Atemwegsobstruktion bei manchen Patienten eher in einer erniedrigten FEV₁ widerspiegelt, bei anderen eher in einem erhöhten Atemwegswiderstand und bei dritten, insbesondere bei zunehmender Obstruktion, in beiden Parametern. Darüber hinaus ist zu beobachten, dass derselbe Patient einmal zuerst mit einem FEV₁-Abfall reagiert und im nächsten Provokationstest erst mit einem Anstieg des totalen Atemwegswiderstandes. Daher ist es um der Genauigkeit und der Sicherheit der Methode willen sowie zum Ausschluss falsch negativer Befunde zwingend notwendig, den Provokationstest stets mit Hilfe einer Bodyplethysmographie durchzuführen und sich nicht nur auf die Spirometrie ohne Messung des Atemwegswiderstandes zu verlassen. Diesbezüglich ist erwähnenswert, dass auch bei Patienten, die bei Versuchsabbruch nur das Kriterium des erhöhten Atemwegswiderstandes erfüllt hatten, z.T. eine ausgeprägte klinische Symptomatik mit Dyspnoe, Husten sowie bereits mit dem bloßen Ohr hörbarem Giemen und Pfeifen zu beobachten war. Das Auftreten solcher klinischer Symptome sollte prinzipiell auch in der klinischen Routine nach jedem Inhalationschritt evaluiert und ggf. notiert werden (Crapo *et al.*, 2000).

Unterschiedliche Verläufe in der Entwicklung der Lungenfunktionsparameter unter

Provokation mittels Methacholin können mitunter auch durch dessen bekanntermaßen unterschiedlich langen Einfluss auf die einzelnen Parameter erklärt werden. Eine eigentliche Plateauphase stellt sich nach Inhalation nicht ein, vielmehr besteht die Maximalwirkung ca. zwei Minuten nach Inhalation. Anschließend beginnt sofort die Abklingphase, die inter- und intraindividuell sehr verschieden sein kann (Cartier *et al.*, 1983; Orehek, 1982; Orehek *et al.*, 1982; Schlegel, 1988). Erwartungsgemäß liegen Daten vor, die eine positive Korrelation zwischen maximaler Änderung der Lungenfunktionsparameter und Dauer der Erfüllung der Kriterien für ein positives Testergebnis nahelegen (Schlegel, 1988). Darüber hinaus war in vorliegender und anderen Untersuchungen zu beobachten, dass sich das Abklingverhalten für die einzelnen Lungenfunktionsparameter unterscheidet, wobei die kürzeste Wirkung auf den totalen Atemwegswiderstand zu bestehen scheint, während andere Messparameter wie FEV₁, MEF₅₀ und spezifische Atemwegsleitfähigkeit ein etwa gleiches und gegenüber dem R_{tot} etwas langsames Abklingverhalten zeigen.

Zur Berechnung der Provokationsdosen PD 20 FEV₁ und PD $R_{tot} \geq 0,5$ wurden lineare Regressionen verwendet. Dieses Vorgehen entspricht den Empfehlungen von Bellia und Schlegel zur Anwendbarkeit mathematischer Modelle bei der Auswertung inhalativer Methacholin-Dosis-Wirkungsbeziehungen (Bellia *et al.*, 1983; Schlegel *et al.*, 1994b). Abgesehen von einem Probanden lag die Provokationsdosis PD Minimal bei allen Versuchsteilnehmern, die mindestens ein Kriterium für einen positiven Test erfüllten, deutlich unter 1000 µg. Darunter befanden sich bis auf den bereits erwähnten Asthmatiker mit einer PD 20 FEV₁ von 1190 µg alle Asthmatiker, jedoch auch drei Probanden aus der Gruppe der Lungengesunden. Alle anderen Lungengesunden zeigten auch bei 2000 µg keine Kriterien für einen positiven Test, so dass die statistische Auswertung einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ergab.

Die Differenz in den absoluten Werten (Median PD 20 FEV₁ Gesunde 2000 µg vs. Median Asthmatiker 222 µg; Median PD $R_{tot} \geq 0,5$ Gesunde 2000 µg vs. Median Asthmatiker 122 µg) zeigt zum einen, dass die Enddosis hoch genug angesetzt war, d.h. dass bei Probanden mit fehlender Reaktion bei der Enddosis 2000 µg eine bronchiale Hyperreagibilität auszuschließen ist, zum anderen zeigt sich jedoch auch, dass die niedrige Anfangsdosis gerechtfertigt ist, um keinen Patienten zu gefährden. Die Tatsache, dass die Provokationsdosis (PD Minimal) bei positivem Testergebnis nahezu ausschließlich unter 1000 µg, sogar, wie aus den Kaplan-Meier-Kurven ersichtlich, bis auf den einen erwähnten positiven Befund bei weniger als 500 µg lag, rechtfertigt, das Provokationsprotokoll in der klinische Routine bereits bei 1000 µg abubrechen, weil danach eine

relevante bronchiale Hyperreagibilität zum Untersuchungszeitpunkt auszuschließen ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die ermittelten ROC-Kurven bestätigt.

Das Modell der ROC-Kurven wird auch von der ATS zur Bewertung der Spezifität und Sensitivität von inhalativen Methacholinprovokationstests favorisiert (Crapo *et al.*, 2000). Es ist die Methode der Wahl, um den optimalen Cutoff Point (Schwellendosis) zwischen positivem und negativem Test zu ermitteln. Die PD $R_{tot} \geq 0,5$ weist dabei bereits bei geringeren Dosen eine höhere Sensitivität bei höherer Spezifität auf als die PD 20 FEV1. Im Bereich der Schwellendosis gleichen sich Sensitivität und Spezifität beider Parameter jedoch zunehmend an. Insgesamt gab es intraindividuell teils erhebliche Unterschiede zwischen den parameterspezifischen Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$, wobei zu berücksichtigen ist, dass bei Erfüllung nur eines Kriteriums für einen positiven Befund die jeweils andere Provokationsdosis extrapoliert wurde und daher nur unter Vorbehalt beurteilt werden darf. Dies gilt insbesondere, da der Abfall bzw. Anstieg des sich nachfolgend verändernden Lungenfunktionsparameters plötzlich eintreten und heftig ausfallen kann.

Bei gemeinsamer Betrachtung beider Positivkriterien, also der PD Minimal, weist das hier vorliegende Protokoll bei 1000 μg eine Sensitivität von über 93 % bei einer Spezifität von 83 % auf. Bereits bei 500 μg liegt die Sensitivität bei fast 90 % bei einer Spezifität von 83 %, d.h. dass bei einer PD Minimal jenseits von 500 μg nicht von einer höhergradigen bronchialen Hyperreagibilität auszugehen ist und jenseits von 1000 μg eine klinisch relevante bronchiale Hyperreagibilität mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Aus Gründen der statistischen Genauigkeit wurden die ROC-Kurven erneut unter Berücksichtigung der Messdaten nur bis 1000 μg berechnet. Erwartungsgemäß zeigte sich kein relevanter Unterschied, da ja bis auf eine Testperson alle Probanden mit positivem Befund deutlich unter 1000 μg reagiert hatten. Daher kann das Protokoll in der klinischen Routine bei spätestens 1000 μg abgebrochen werden. Allerdings zeigt sich auch in der hier vorliegenden Untersuchung an den drei Lungengesunden mit positivem Testergebnis der nur mittelmäßige positive prädiktive Wert der inhalativen Methacholinprovokation für die Diagnose Asthma, wie er auch in den ATS-Leitlinien und anderenorts beschrieben ist (Crapo *et al.*, 2000; Fish, 1993; Rijcken *et al.*, 1993).

Ein einziger Proband aus der Gruppe der Probanden mit bekanntem Asthma bronchiale erfüllte die Kriterien für ein positives Testergebnis erst bei 1190 μg , und zwar durch einen FEV1-Abfall um 20 % vom Ausgangswert. Aus den oben angestellten Überlegun-

gen heraus spricht dies zumindest zum Untersuchungszeitpunkt gegen eine ausgeprägte bronchiale Hyperreagibilität. Demgegenüber stehen die drei Probanden aus der Gruppe der Lungengesunden, also klinisch Unauffälligen, die ebenfalls bei weniger als 500 µg mindestens ein Positivkriterium erfüllten. Die ATS führt für das Bestehen einer milden bis grenzwertigen bronchialen Hyperreagibilität bei Patienten ohne klinische Symptome folgende mögliche Ursachen auf (Crapo *et al.*, 2000): Es könnte sich um Patienten mit mildem Asthma und hoher Wahrnehmungsschwelle für die Symptome handeln oder um Patienten, die die Symptome zwar wahrnehmen, aber nicht für pathologisch erachten. Alternativ könnten solche Patienten niemals Bronchospasmustriggern exponiert gewesen sein. Auch wäre es denkbar, dass bei diesen Patienten ein subklinisches Asthma besteht, das sich in der Zukunft zu einem symptomatischen Asthma entwickeln könnte (Hopp *et al.*, 1990; Jansen *et al.*, 1997). Circa 15 - 45 % asymptomatischer Patienten mit bronchialer Hyperreagibilität können innerhalb der folgenden zwei bis drei Jahre ein Asthma entwickeln (Laprise und Boulet, 1997; Zhong *et al.*, 1992). Des weiteren könnte es sich auch um Patienten handeln, die einen anderen Grund für die bronchiale Hyperreaktivität aufweisen. Positive Methacholintestergebnisse treten nämlich außer beim Asthma bronchiale auch bei Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis, starken Rauchern, Patienten mit COPD oder dekompensierter Herzinsuffizienz, Cystischer Fibrose, Sarkoidose oder Lungenfibrose oder nach akuten Atemwegsinfekten auf (Bahous *et al.*, 1984; Boushey *et al.*, 1980; Davis und Kaliner, 1983; Du Toit *et al.*, 1986; Gerard *et al.*, 1980; Mitchell *et al.*, 1978; Ramsdell *et al.*, 1982; Van Asperen *et al.*, 1981; Yan *et al.*, 1985). Da diese Faktoren in der hier vorliegenden Untersuchung jedoch anamnestisch bzw. mittels Prick-Test, RIST- und RAST-Bestimmung soweit möglich ausgeschlossen wurden, handelt es sich bei den drei besagten Probanden am ehesten um tatsächlich Lungengesunde mit bronchialer Hyperreagibilität ohne klinisch relevante bronchopulmonale Erkrankung, über die auch Boushey berichtet (Boushey *et al.*, 1980). Insgesamt bestätigt sich also, dass das Ergebnis eines inhalativen Methacholinprovokationstests immer in Zusammenschau mit der genauen Anamnese, dem Krankheitsverlauf und anderen lungenfunktionsdiagnostischen Parametern zu interpretieren ist (Klein *et al.*, 1998), dass weiterhin inhalative Methacholinprovokationstests eine sehr gute Sensitivität bei mittelmäßig gutem positiven prädiktivem Wert aufweisen (Crapo *et al.*, 2000; Fish, 1993; Rijcken *et al.*, 1993) und dass es im Hinblick auf die bronchiale Reagibilität ein kontinuierliches Spektrum zwischen gesund und krank gibt (Crapo *et al.*, 2000). Dass der Prozentsatz asymptomatischer Probanden aus der Gruppe der Lungengesunden mit milder bis grenzwertiger bronchialer Hyperreagibilität, d.h. der zu asthmatischen Erkrankungen möglicherweise prädisponierten Personen, in der hier vorliegenden Untersuchung relativ hoch erscheint, mag auch an der im Vergleich zu älteren Untersuchungen

deutlich angestiegenen Inzidenz und Prävalenz von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis liegen. Hier wären Verlaufsbeobachtungen dieser Personen von wissenschaftlichem Interesse.

5.3. Vergleich mit anderen Protokollen

Für den inhalativen Methacholinprovokationstest werden heutzutage von den meisten Autoren entweder die inspirationsgetriggerte Dosimetermethode oder die Reservoirmethode favorisiert (Crapo *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1998). Dass neuere Apparaturen gegenüber früheren von Vorteil hinsichtlich der Deposition der Provokationssubstanz in den peripheren Atemwegen zu sein scheinen, zeigt auch der Vergleich der hier vorliegenden Untersuchung bezüglich der mittleren Provokationsdosen mit Daten aus Schlegels Arbeit "Methodische Untersuchung zur bronchialen Hyperreagibilität" (Schlegel, 1988). Hier lag die mittlere Provokationsdosis PD 20 FEV1 in der Gruppe der Asthmatiker bei 304 µg, während in dem neu validierten Dosimeterprotokoll die mittlere PD 20 FEV1 zwar aufgrund des einen Ausreißers nach oben durch den "Asthmatiker" ohne relevante bronchiale Hyperreagibilität bei 318 µg, der Median jedoch nur bei 222 µg liegt. Einen solchen Ausreißer nach oben, der den Mittelwert verschiebt, hatte es in Schlegels Studie nicht gegeben, so dass davon auszugehen ist, dass die mittlere PD 20 FEV1 tatsächlich durch die Applikation der Provokationssubstanz mittels des inspirationsgetriggerten Dosimetersystems reduziert wird. Noch ausgeprägter ist dies anhand der PD $R_{tot} \geq 0,5$ zu beobachten. Hier lag der Mittelwert in der Arbeit von Schlegel bei 263 µg, während die hier vorliegende Arbeit einen Mittelwert von 276 µg, aber einen Median von 122 µg ergab. Zusammenfassend lässt sich also die These aufstellen, dass die mittleren Provokationsdosen durch Verwendung eines inspirationsgetriggerten Dosimetersystems im Vergleich zu früheren Systemen, etwa konventionellen Handverneblern, um ca. ein Drittel bis zur Hälfte reduziert werden. Umso wichtiger ist es, aus Gründen der Patientensicherheit den inhalativen Methacholinprovokationstest mit einer ausreichend niedrigen Dosis zu starten und keine zu großen Dosisintervalle zuzulassen. Ob die automatische inspirationsgetriggerte Methode im Vergleich zur manuellen Auslösung des Dosimetersystems einen zusätzlichen Vorteil bringt, darüber gehen die Meinungen in der Literatur auseinander (Crapo *et al.*, 2000; Nieminen *et al.*, 1987). Weitere Studien zu diesem Thema wären für eine endgültige Beurteilung erforderlich.

Als Grundlage aller Dosimeterprotokolle gilt das Protokoll von Chai *et al.* (Chai *et al.*, 1975). Auch die hier vorliegende Untersuchung hat sich bei der Entwicklung des Dosie-

rungsschemas an diesem Protokoll orientiert. Es basiert auf einer Verdoppelung der Konzentration der zu inhalierenden Lösung zwischen jeder Dosisstufe. Pro Dosisstufe werden jeweils fünf Atemmanöver durchgeführt. Die folgende Tabelle 5.1 stellt das Provokationsprotokoll von Chai et al. dar. Die letzte Spalte wurde angefügt, um die Kumulativdosen zu demonstrieren. Dabei wurde von dem in der hier vorliegenden Untersuchung ermittelten Wert von pro Atemzug vernebelten 11,44 µl als Basis für die Berechnung der Kumulativdosen ausgegangen. Eine Inhalations-Einheit entspricht einer Inhalation einer Lösung mit 1 mg/ml.

Tabelle 5.1.: Provokationsprotokoll von Chai et al.

MCH-Konz. [mg/ml]	Kumulative Anzahl AZ	Inhalations- einheiten/AZ	Inhalations- einheiten/5 AZ	Kumulative Einheiten/5 AZ	Kumulativ- dosis [µg]
0,075	5	0,075	0,0375	0,375	4,29
0,15	10	0,15	0,750	1,125	12,87
0,31	15	0,31	1,55	2,68	30,66
0,62	20	0,62	3,10	5,78	66,12
1,25	25	1,25	6,25	12,0	137,28
2,50	30	2,50	12,50	24,5	280,28
5,00	35	5,00	25,00	49,5	566,28
10,00	40	10,00	50,00	99,5	1134,3
25,00	46	25,00	125,00	225,0	2574,0

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass man auf äquivalente Kumulativdosen im Vergleich mit dem neuen Protokoll käme, würde man mittels des ZAN ProvAir II Dosimeters, des DeVilbiss 646 Nebulizers und nach dem Protokoll von Chai et al. einen inhalativen Methacholinprovokationstest durchführen. Daher sind die Protokolle gut miteinander vergleichbar, folglich ein wesentliches Untersuchungsziel erreicht.

Das hier entwickelte Protokoll basiert auf einer Arbeit von Schlegel et al. (Schlegel *et al.*, 1994a), die erstmalig die Möglichkeit der Dosissteigerung allein über die Anzahl der Atemzüge bei konstanter Konzentration der Provokationslösung an klinisch und anamnestisch gesunden Probanden untersuchte. Dabei wurde das Dosimetersystem APS der Firma Jäger, Würzburg, verwendet. Unter Berücksichtigung der Konzentration der Provokationslösung (5 mg/ml) und des Eichfaktors des Verneblergefäßes wurde eine Vernebelungszeit von 0,4 Sekunden gewählt, so dass pro Atemzug 20 µg Methacholin vernebelt wurden. Das darauf aufbauende Dosierungsschema wurde für die hier vorliegende Untersuchung hinsichtlich der Anzahl der Atemzüge und der daraus resultierenden

(Kumulativ-) Dosen übernommen. In der Arbeit von Schlegel et al. wurden in 11 von insgesamt 33 untersuchten Fällen das Positivkriterium der Verdoppelung des totalen Atemwegswiderstandes erfüllt; 7 Probanden zeigten einen zwanzigprozentigen FEV₁-Abfall und 4 erfüllten beide Positivkriterien. Aus den positiven Befunden ermittelte sich eine mittlere PD 20 FEV₁ von 566 µg und eine mittlere PD 100 R_{tot} vom 1042 µg, wobei die Tatsache auffällig ist, dass die mittlere PD 20 FEV₁ unter der mittleren PD 100 R_{tot} liegt, obwohl der totale Atemwegswiderstand im allgemeinen der sensitivere Parameter zur Diagnose einer bronchialen Hyperreagibilität ist. In Einzelfällen lag die Provokationsdosis sogar deutlich niedriger, nämlich bei bis zu 187 µg. Daraus wurde gefolgert, dass bereits in einem Dosisbereich von im Mittel 1042 µg Methacholin für den Atemwegswiderstand bzw. 566 µg für die FEV₁ mit signifikanten Veränderungen auch bei Gesunden zu rechnen ist, dass in Einzelfällen jedoch auch deutlich geringere Provokationsdosen (bis zu 187 µg) vorkommen und dass der Übergang zwischen normo- und hyperreaktivem Verhalten bei dieser Methode in einem Dosisbereich von 500 - 1000 µg anzusiedeln ist. Da in dieser Versuchsreihe keine Vortests zum Ausschluss einer allergischen Diathese (Prick, RIST, RAST) durchgeführt wurden, ist es nicht verwunderlich, dass noch mehr Lungengesunde ein positives Testergebnis aufwiesen als in der hier vorliegenden Untersuchung. Dadurch könnten auch die in Einzelfällen sehr niedrigen Provokationsdosen zu erklären sein, wie sie in der eigenen Untersuchung nicht aufgetreten sind. Dass aber auch völlig lungengesunde Probanden im Bereich unter 500 - 1000 µg Methacholin einen positiven Test aufweisen können und dass in diesem Dosisbereich die Schwellendosis zwischen normo- und hyperreaktivem Verhalten anzusiedeln ist, wird durch beide Untersuchungen bestätigt.

Die Deutsche Gesellschaft für Pneumologie empfiehlt in ihren "Leitlinien für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit pharmakologischen Substanzen" (Klein *et al.*, 1998) hinsichtlich der Dosimetermethode die Orientierung an dem oben genannten Protokoll von Chai et al. Dazu haben Grönke und Jörres (Grönke *et al.*, 1995; Jörres *et al.*, 1997) ein hinsichtlich Genauigkeit und Sicherheit adäquates Kurzprotokoll eingeführt, an dem sich auch die Weiterentwicklung und Etablierung eines Kurzprotokolls für die hier vorgestellte Dosimetermethode mit konstanten Konzentrationen orientieren könnte. Tabelle 5.2 zeigt das dazugehörige Provokationsschema. Die (Kumulativ-) Dosis errechnet sich wiederum unter der Annahme der in der eigenen Untersuchung ermittelten Lösungsmenge von pro Atemzug vernebelten 11,44 µl.

Tabelle 5.2.: Kurzprotokoll von Jörres et al.

Stufe	MCH-Konz. [mg/ml]	Anzahl AZ	äquiv. PC bei 5 AZ	Dosis [µg]	Kumulativdosis [µg]
1	0,104	6	0,125	7,14	7,14
2	0,42	6	0,5	28,83	35,97
3	1,67	6	2	114,63	150,6
4	6,67	6	8	457,83	608,43
5	26,67	2	10,67	610,21	1218,64

Als normoreaktiv werden nach dieser Methode Patienten angesehen, deren Provokationskonzentration PC 20 FEV1 bei über 8 mg/ml liegt, also bei einer Kumulativdosis bzw. PD 20 FEV1 über 608 µg. Dabei ist zu berücksichtigen, dass hier nur die parameterspezifische Provokationskonzentration PC 20 FEV1 ermittelt wird, weil die Methode auf einer spirometrischen Messung der Lungenfunktionsparameter beruht. Im Gegensatz dazu ermittelt das neue Protokoll die PD Minimal, die je nachdem, mit welchem Lungenfunktionsparameter (FEV1 oder R_{tot}) der Patient zuerst ein Positivkriterium erfüllt, entweder der PD 20 FEV1 oder der PD $R_{tot} \geq 0,5$ entspricht. Dennoch liegt die Schwellendosis zwischen normaler, grenzwertiger und pathologischer Reaktion offensichtlich in äquivalenten Dosisbereichen und ist somit zwischen den Protokollen gut vergleichbar.

Konkurrierend wird in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie auch eine Reservoirmethode (Provokationstest II; Firma Medanz-Pari, Starnberg) vorgestellt (Klein *et al.*, 1998). Die nachfolgende Tabelle 5.3 zeigt das vorgeschlagene Provokationsschema:

Tabelle 5.3.: Provokationsschema für die Reservoirmethode

Stufe	Beutelvolumen [l]	MCH-Konzentration [mg/ml]	Dosis [µg]	Kumulativdosis [µg]
1	0,5	0,33	15,2	15,2
2	1	0,33	30,4	45,6
3	2	0,33	60,7	106,3
4	4	0,33	121,4	227,7
5	8	0,33	242,9	470,6

Ergänzend lautet die Leitlinien-Empfehlung: „Wird eine höhere Sensitivität angestrebt, d.h. sollen auch Patienten mit geringer oder grenzwertiger bronchialer Hyperrea-

gibilität entdeckt werden, kann eine zusätzliche 6. Stufe (Beutelvolumen 8 l, 0,33 mg/ml, Kumulativdosis 713,5 µg) hinzugefügt werden. Für klinische Zwecke kann ein Provokationstest als negativ angesehen werden, wenn nach Inhalation der 5. Stufe keine relevante Obstruktion auftritt.“ Die Schwellendosis zur grenzwertigen bronchialen Hyperreagibilität wird bei 400 - 500 µg Kumulativdosis angegeben, die Schwellendosis zum Ausschluss einer bronchialen Hyperreagibilität mit ca. 700 µg, was den Beobachtungen hinsichtlich der Schwellendosen in der eigenen Untersuchung ebenfalls hervorragend entspricht.

Die American Thoracic Society (ATS) empfiehlt in ihren “Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing - 1999” (Crapo *et al.*, 2000) ein Dosimeterprotokoll; auch hier werden pro Dosisstufe jeweils fünf Inhalationen durchgeführt. Während das ursprüngliche Five-breath-Dosimeterprotokoll von Chai *et al.* und die Empfehlungen der European Respiratory Society (Sterk *et al.*, 1993) auf einer Verdoppelung der Konzentrationen (Doubling Doses) zwischen jeder Provokationsstufe basieren, wird hier eine Modifikation des Protokolls mit Vervierfachung (Quadrupling Doses) der Konzentrationen favorisiert. Tabelle 5.4 zeigt das Provokationsschema dieses Protokolls. Die ATS empfiehlt, den Vent des DeVilbiss 646 Verneblers während des Provokationstests zu verschließen und geht daher, wie oben beschrieben, von einer Vernebelungsmenge von 9 µl +/- 10 % pro Inhalation aus, d.h. pro fünf Atemzüge von einer Vernebelungsmenge von 45 µl. Demgegenüber stehen die in den eigenen Untersuchungen ermittelten Menge von pro Atemzug vernebelten 11,44 µl, also 57,2 µl pro fünf Atemzüge, bei offenem Vent. Daher sind dem ATS-Dosisschema zum einen die (Kumulativ-) Dosen bei Berechnung mit 9 µl bei geschlossenem Vent und zum anderen die (Kumulativ-) Dosen bei Berechnung mit 11,44 µl vernebelter Lösung pro Atemzug bei offenem Vent zum Vergleich angefügt.

Tabelle 5.4.: Provokationsschema der ATS mit Quadrupling Doses

Stufe	MCH-Konz. [mg/ml]	Dosis (9 µl/AZ) [µg]	Kumulativdosis (9 µl/AZ) [µg]	Dosis (11,44 µl/AZ) [µg]	Kumulativdosis (11,44 µl/AZ) [µg]
1	0,0625	2,8125	2,8125	3,575	3,575
2	0,25	11,25	14,0625	14,3	17,875
3	1	45	59,0625	57,2	75,075
4	4	180	239,0624	228,8	303,875
5	16	720	959,0625	915,2	1219,075

Die ATS gibt als mittels ROC-Kurven ermittelte Schwellendosis zwischen positivem und negativem Test eine PC 20 FEV1 von 8 - 16 mg/ml an. Dies entspricht, gleich ob mit geschlossenem Vent oder mit offenem Vent gemessen wird, einem Kumulativdosisbereich von etwa 500 - 1000 μg . Genau in diesem Dosisbereich liegt auch die mittels ROC-Kurven ermittelte Schwellendosis zwischen physiologischer und pathologischer Reaktion des neu entwickelten Protokolls. Zu berücksichtigen ist, dass sich beim ATS-Protokoll die Provokationskonzentration nur auf die FEV1 bezieht, da der Methacholintest nur spirometrisch durchgeführt wird. Hingegen stützt sich die Provokationsdosis PD Minimal des neuen Protokolls auf die Betrachtung von FEV1 und/oder R_{tot} als Positivkriterium. Gleichwohl ergibt sich aus diesen Daten die gute Vergleichbarkeit der Protokolle und die Gleichwertigkeit hinsichtlich der Größenordnung der Provokationsdosen.

Da der Beweis für äquivalente Schwellendosen hiermit erbracht ist, ist es nun von Interesse, die ATS-Schweregradeinteilung der bronchialen Hyperreagibilität, die in der Tabelle 5.5 dargestellt ist, auf das neue Protokoll zu übertragen. In der letzten Spalte ist jeweils die entsprechende Dosisstufe des neuen Protokolls vermerkt.

Tabelle 5.5.: ATS-Schweregradeinteilung der BHR und Vergleich mit Dosisstufen des neuen Protokolls

PC 20 FEV1	Schweregrad	PD Minimal bei Vernebelung von 9 μl
≤ 1	Moderate bis schwere BHR	$\leq 59,0625$
1 - 4	Milde BHR	59,0625 - 239,0625
4 - 16	Borderline BHR	239,0625 - 959,0625
≥ 16	Normalbefund	$\geq 959,0625$

Im direkten Vergleich der Protokolle heißt das also, dass Patienten mit PD Minimal von ≤ 60 μg unter einer moderaten bis schweren, Patienten mit PD Minimal bis ca. 240 μg unter eine milden und Patienten mit PD Minimal bis ca. 960 μg unter einer grenzwertigen bronchialen Hyperreagibilität leiden. Jenseits von 960 μg ist eine relevante bronchiale Hyperreagibilität sicher auszuschließen. Den Erfahrungen aus der eigenen Untersuchung zufolge könnte eine PD Minimal unter 100 μg einer moderaten bis schweren, eine PD Minimal bis 400 - 500 μg einer milden und eine PD Minimal bis 1000 μg einer grenzwertigen bronchialen Hyperreagibilität entsprechen, während eine PD Minimal über 1000 μg eine relevante bronchiale Hyperreagibilität ausschließt.

Selbstverständlich muss die Zulässigkeit dieser Vergleiche durch weitere Untersuchungen untermauert werden. Hierbei wäre es insbesondere interessant, Patienten einmal mit dem ATS-Protokoll und einmal mit dem neuen Protokoll zu provozieren, wobei aus den

bereits vielfach genannten Gründen durchaus unterschiedliche Provokationsdosen zu erwarten sind. Unterschiede hinsichtlich der PC 20 FEV₁ bis zu 1,5 Doubling Doses wären dabei gemäß den auf zahlreichen Untersuchungen basierenden ATS-Leitlinien zu akzeptieren, da dies der durchschnittlichen intraindividuellen Reproduzierbarkeit bei stabiler Klinik entspricht. Trotz der diesbezüglich ausstehenden wissenschaftlichen Fundierung kann in der klinischen Routine die Schweregradeinteilung der ATS mit ihren äquivalenten Provokationsdosen fürs erste als Anhaltspunkt verwendet werden.

5.4. Ausblick

Aufgrund des kontinuierlichen Spektrums der bronchialen Reagibilität, der inter- und intraindividuellen Schwankungsbreite und in Ermangelung eines fehlerlosen "Goldstandards" zur Diagnose eines Asthma bronchiale werden sich auf dem Gebiet der inhalativen Provokationstests immer wieder neue Fragestellungen ergeben. Bezüglich des hier vorliegenden neuen Protokolls wären dabei Untersuchungen zum Beweis der mit anderen Protokollen gleichwertigen Reproduzierbarkeit, der direkte Vergleich der Reaktion nach Provokation mit einem anderen Protokoll, z.B. dem Quadrupling Doses Dosimeterprotokoll der American Thoracic Society, sowie weitere Studien zur Einordnung des Schweregrades der bronchialen Hyperreagibilität von besonderer Relevanz. Auch könnten Folgeuntersuchungen zur Entwicklung eines entsprechenden Kurzprotokolls, z.B. durch Zusammenfassung von Dosisstufen im höheren Dosisbereich oder durch Abbruch des Protokolls bereits bei 500 µg, durchgeführt werden. Angesichts der in dieser wie in vorangehenden Studien zutage getretenen Problematik der Erhebung von hinlänglich exakten und vergleichbaren Messdaten erscheint nicht zuletzt eine die Möglichkeiten der aktuellen Technologie konsequent ausschöpfende Verbesserung der apparativen Gegebenheiten ein dringliches Anliegen.

6. Zusammenfassung

Die unspezifische Provokation mit Methacholin ist die am weitesten verbreitete und akzeptierte Methode zur Diagnose bzw. zum Ausschluss der bronchialen Hyperreagibilität bei Patienten mit Verdacht auf ein Asthma bronchiale und zu dessen Therapiekontrolle. Um die Sicherheit und die Genauigkeit der Methode weiter zu verbessern, wurde daher ein Dosimeterprotokoll entwickelt, das die inhalierte Methacholin-Dosis anstatt durch die Erhöhung, d.h. in der Regel Verdoppelung, der Methacholinkonzentrationen nur durch Erhöhung der Anzahl der Inhalationen bei konstanter, niedriger Konzentration der Methacholinlösung steigert. Dieses neue Protokoll wurde verglichen mit anderen weit verbreiteten Methacholin-Provokationsprotokollen. Die Methacholinchlorid-Lösung (1,75 mg/ml) wurde mit Hilfe des Dosimetersystems ZAN 200 ProvAir II sowie des Verneblertopfes DeVilbiss 646 vernebelt. 15 Asthmapatienten mit einer vor der Provokation normalen Lungenfunktion (FEV1 98 +/- 9 % PN) und 18 Lungengesunde (FEV1 110 +/- 12 % PN) nahmen an der Testreihe teil. Begonnen wurde mit einer Dosis von 20 µg Methacholinchlorid (= eine Inhalation); beendet wurde der Versuch bei einer Kumulativdosis von 2000 µg Methacholinchlorid, wenn nicht vorher ein Kriterium für einen positiven Test und damit für einen Versuchsabbruch erfüllt wurde. Abbruchkriterien waren entweder ein Abfall der FEV1 um 20 % des Ausgangswertes oder ein Anstieg des totalen Atemwegwiderstandes auf $\geq 0,5$ kPa*s/l. Mittels linearer Regression wurden die Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$ berechnet.

Im Vergleich mit anderen Protokollen zeigte sich, dass auch das neue Protokoll zuverlässig und sicher zwischen gesund und krank unterscheidet. Der Median der PD 20 FEV1 liegt in der Gruppe der Asthmatiker bei 222 µg, bei den Lungengesunden bei 2000 µg; daraus ergibt sich ein p-Wert von $< 0,001$. In Bezug auf die PD $R_{tot} \geq 0,5$ liegt der Median bei den Asthmatikern bei 122 µg, in der Gruppe der Lungengesunden bei 2000 µg; hieraus errechnet sich ebenfalls ein p-Wert von $< 0,001$. Sensitivität und Spezifität der Methode wurden mittels ROC-Kurven untersucht. Basierend auf der PD 20 FEV1 liefert die Methode für die Diagnose einer bronchialen Hyperreagibilität bei einer Enddosis von 1000 µg Methacholinchlorid eine Sensitivität von über 93 % und eine Spezifität von 83 %; basierend auf der PD $R_{tot} \geq 0,5$ liegt die Sensitivität bei

einer Dosis von 1000 μg bei 90 %, die Spezifität bei 89 %. Für die gemeinsame Betrachtung der parameterspezifischen Provokationsdosen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$, der PD Minimal, bei 1000 μg liegt die Sensitivität bei über 93 % und die Spezifität bei 83 %. Daher können 1000 μg als Schwellendosis für den Ausschluss einer bronchialen Hyperreagibilität zum Untersuchungszeitpunkt angesehen werden, und der Test darf an diesem Punkt abgebrochen werden. Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Diagnostik der bronchialen Hyperreagibilität sicher und genau mit Hilfe eines Dosimeterprotokolls erfolgen kann, das die Methacholin-Dosis nur durch die Steigerung der Inhalationen bei gleichbleibender Konzentration der Methacholinlösung erhöht. Die Schwellendosis zwischen normaler und pathologischer bronchialer Reaktion, Sensitivität und Spezifität sowie die Trennschärfe der Methode sind sehr gut vergleichbar mit anderen bisher etablierten Protokollen wie dem Five-breath-Dosimeterprotokoll von Chai *et al.* oder dem Quadrupling Doses Protokoll der American Thoracic Society (Chai *et al.*, 1975; Crapo *et al.*, 2000).

Literaturverzeichnis

- Arossa, W., Quagliotti, F., Sala, M., *et al.* (1984) Different performance of two commercial nebulizers. *Respiration* **46**: 128–132.
- Bahous, J., Cartier, A., Quimet, G., *et al.* (1984) Nonallergic hyperexcitability in chronic bronchitis. *American Review of Respiratory Disease* **220**: 216–220.
- Barnes, P. J. (1992a) Neural mechanisms in asthma. *British Medical Bulletin* **48**: 149–168.
- Barnes, P. J. (1992b) Neurogenetic inflammation and asthma. *Journal of Asthma* **29**: 165–180.
- Baur, X., Preisser, A., Oldenburg, M., *et al.* (2008) Lungenfunktionsprüfung in der Arbeitsmedizin. AWMF online - Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V. (DGAUM), URL: <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll/02-013.htm> [Online; Stand 18. August 2009].
- Beach, J. ., Young, C. L., Avery, A. J., *et al.* (1993) Measurement of airway responsiveness to methacholine: relative importance of the precision of drug delivery and the method of assessing response. *Thorax* **48**: 239–243.
- Beasley, R., Keil, U., Mutius, E. v., *et al.* (1998) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* **351**: 1225–1232.
- Beeh, K. M., Buhl, R. (2001) Pathogenese des Asthma bronchiale - Eröffnung neuer therapeutischer Perspektiven. *Medizinische Klinik* **96**: 15–25.
- Beeh, K. M., Ksoll, M., Buhl, R. (2000) Elevation of total serum immunoglobuline E is associated with asthma in non-allergic individuals. *European Respiratory Journal* **16**: 609–614.
- Bellia, V., Rizzo, A., Amoroso, S., *et al.* (1983) Analysis of dose-response-curves in the detection of bronchial hyperreactivity. *Respiration* **44**: 10–18.

- Benson, M. K. (1979) Bronchial provocation tests. *British Journal of Clinical Pharmacology* **8**: 417–424.
- Boushey, H. A., Holtzman, M. J., Sheller, J. R., Nadel, J. A. (1980) Bronchial hyperreactivity. *American Review of Respiratory Disease* **121**: 389–413.
- Britton, J., Tattersfield, A. E. (1986) Does measurement of bronchial hyperreactivity help in the clinical diagnosis of asthma? *European Journal of Respiratory Diseases* **68**: 233–238.
- Buhl, R., Berdel, D., Criée, C. P., *et al.* (2006) Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin eV. *Pneumologie* **60**: 139–183.
- Cartier, A., Malo, J., Begin, P., *et al.* (1983) Time Course of the bronchoconstriction induced by inhaled Histamine and Methacholine. *Journal of Applied Physiology* **54**: 821–826.
- Chai, H., Farr, R. S., Froehlich, L. A., *et al.* (1975) Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **56**: 323–327.
- Cheung, D., Dick, E. C., Timmers, M. C., *et al.* (1995) Rhinovirus inhalation causes long-lasting excessive airway narrowing in response to methacholine in asthmatic subjects in vivo. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **152**: 1490–1496.
- Clay, M. M., Pavia, D., Newman, S. P., *et al.* (1983) Assessment of jet nebulizers for lung aerosol therapy. *Lancet* **2**: 592–594.
- Clutterbuck, E. J., Hirst, E. M., Sanderson, C. J. (1989) Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* **73**: 1504–1512.
- Cockcroft, D. W., Swystun, V. A. (1997) Effect of single dose of S-salbutamol, R-salbutamol, racemic salbutamol and placebo on the airway response to methacholine. *Thorax* **52**: 845–848.
- Connolly, M. J., Avery, A. J., Walters, E. H., Hendrick, D. J. (1988) The use of sequential doses of inhaled histamine in the measurement of bronchial responsiveness: cumulative effect and distortion produced by shortening the protocol. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **82**: 863–868.

- Corren, J., Adinoff, A. D., Buchmeier, A. D., *et al.* (1992) Nasal beclomethason prevents the seasonal increase in bronchial hyperresponsiveness in patients with allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **90**: 250–256.
- Costello, R. W., Fryer, A. D., Belmonte, K. E., *et al.* (1998a) Effects of tachykinin NK1 receptor antagonists on vagal hyperreactivity and neuronal M2 muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *British Journal of Pharmacology* **124**: 267–276.
- Costello, R. W., Jacoby, D. B., Fryer, A. D. (1998b) Pulmonary neuronal M2 muscarinic receptor function in asthma and animal models of hyperreactivity. *Thorax* **53**: 613–616.
- Coyle, A. J., Wagner, K., Bertrand, C., *et al.* (1996) Central role of immunoglobuline (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenetic anti-IgE antibody. *Journal of Experimental Medicine* **183**: 1303–1310.
- Crapo, R. O., Casaburi, R., Coates, A. L., *et al.* (2000) Guidelines for methacholine and exercise challenge testing - 1999. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **161**: 309–329.
- Dahlen, S.-E., Hedqvist, P., Hammerstrom, S., *et al.* (1980) Leukotriens are potent constrictors of human bronchi. *Nature* **288**: 484–486.
- Davis, P. B., Kaliner, M. (1983) Autonomic nervous abnormalities in cystic fibrosis. *Journal of Chronic Diseases* **36**: 269–275.
- Dennis, J. H., Avery, A. J., Walters, E. H., Hendrick, D. J. (1992) Calibration of aerosol output from the Mefar dosimeter: implications for epidemiological studies. *European Respiratory Journal* **5**: 1279–1282.
- Derom, E. Y., Pauwels, R. A., Van der Straeten, M. E. F. (1992) The effect of inhaled salmeterol on methacholine responsiveness in subjects with asthma up to 12 hours. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **89**: 811–815.
- Dolovich, M. B. (1985) Technical factors influencing response to challenge aerosols. In: F.E. Hargreave and A.J. Woolcock (Herausgeber). *Airway Responsiveness: Measurement and Interpretation*. Astra Pharmaceuticals, Mississauga, ON, Canada .

- Du Toit, J. I., Woolcock, A. J., Salome, C. M., *et al.* (1986) Characteristics of bronchial hyperresponsiveness in smokers with chronic air-flow limitation. *American Review of Respiratory Disease* **134**: 498–501.
- Durham, S. R. (1998) Mechanisms of mucosal inflammation in the nose and lungs. *Clinical & Experimental Allergy* **28**: 11–16.
- Ebina, M., Takahashi, T., Chiba, T., *et al.* (1993) Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *American Review of Respiratory Disease* **148**: 720–726.
- Elbon, C. L., Jacoby, D. B., Fryer, A. D. (1995) Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary M2 muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *American Journal of Cell and Molecular Biology* **12**: 320–8.
- Empey, D., Laitinen, L., Jacobs, L., *et al.* (1976) Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normale subjects after upper respiratory tract infection. *American Review of Respiratory Disease* **113**: 131–139.
- Ferron, G. A., Kerrebijn, K. F., Weber, J. (1976) Properties of aerosols produced with three nebulizers. *American Review of Respiratory Disease* **114**: 899–908.
- Fish, J. E. (1993) Bronchial challenge testing. In: E. Middleton (Herausgeber). *Allergy: Principles and Practice*, 4th edition. Mosbey-Year Book, St. Louis, MO .
- Freezer, N. J., Croasdell, H., Doull, I. J. M., Holgate, S. T. (1995) Effect of regular inhaled beclomethasone on exercise and methacholine airway responses in school children with recurrent wheeze. *European Respiratory Journal* **8**: 1488–1493.
- Frigas, E., Loegering, D. A., Solley, G. O., *et al.* (1981) Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clinic Proceedings* **56**: 345–353.
- Garcia-Zepeda, E. A., Rothenberg, M. E., Ownbey, R. T., *et al.* (1996) Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Medicine* **2**: 449–456.
- Gerard, J. W., Cockcroft, D. W., Mink, J. T., *et al.* (1980) Increased nonspecific bronchial reactivity in cigarette smokers with normal lung function. *American Review of Respiratory Disease* **122**: 577–581.

- Greenspon, L. W., Morrissey, W. L. (1986) Factors that contribute to inhibition of methacholine-induced bronchoconstriction. *American Review of Respiratory Disease* **133**: 735–739.
- Griffin, E., Hakansson, L., Formgren, H., *et al.* (1991) Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **87**: 548–57.
- Grönke, L., Nowak, D., Jörres, R., Magnussen, H. (1995) Entwicklung und Validierung eines Kurzprotokolls zur inhalativen Methacholinprovokation bei epidemiologischen Studien. *Atemwegs- und Lungenkrankheiten* **21**: 320–321.
- Gundel, R. H., Wegener, C. D., Torcellini, C. A., *et al.* (1991) Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced airway inflammation and late-phase airway obstruction in monkeys. *Journal of Clinical Investigation* **88**: 1407–1411.
- Hargreave, F. E., Ramsdale, E. H., Stark, P. J., Juniper, E. F. (1985) Advances in the use of inhalation provocation tests in clinical evaluation. *Chest* **87**: 32S–35S.
- nSpire Health GmbH (2008) ZAN 200 ProvAir II Benutzerhandbuch .
- Heinrich, J., Richter, K., Frye, C., *et al.* (2002) Die europäische Studie zu Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen [European Community Respiratory Health Survey in Adults (ECRHS)]. *Pneumologie* **56**: 197–303.
- Henderson, J. (1991) Eicosanoids and platelet-activating-factor in allergic respiratory diseases. *American Review of Respiratory Disease* **143**: S86–90.
- Hollie, M. C., Malone, R. A., Skufca, R. M., Nelson, H. S. (1991) Extreme variability in aerosol output of the DeVilbiss 646 jet nebulizer. *Chest* **100**: 1339–1344.
- Hopkin, J. M. (1997) Mechanisms of enhanced prevalence of asthma and atopy in developed countries. *Current Opinion in Immunology* **9**: 788–792.
- Hopp, R. J., Townley, R. G., Biven, R. E., *et al.* (1990) The presence of airway reactivity before the development of asthma. *American Review of Respiratory Disease* **141**: 2–8.
- Huber, H., Ammon, J., Baur, X. (1998) Bronchialer Hyperreaktivitätstest (Kontraktionstest). In: X. Baur (Herausgeber). *Lungenfunktionsprüfung und Allergiediagnostik*. Dustri-Verlag. München - Deisenhofen .

- Huber, H., Lauschner, R., Papenfuss, F., *et al.* (2000) Randomisierte Doppelblindstudie (third place blinded) zur Untersuchung der Wirksamkeit und Nebenwirkungen von Methacholin im unspezifischen bronchialen Provokationstest. *Pneumologie* **54**: 99–103.
- Jansen, D. F., Timens, W., Kraan, J., *et al.* (1997) (A)symptomatic bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Respiratory Medicine* **91**: 121–134.
- Jensen, E. J., Dahl, R., Steffensen, F. (1998) Bronchial reactivity to cigarette smoke in smokers: repeatability, relationship to methacholine reactivity, smoking and atopy. *European Respiratory Journal* **11**: 670–676.
- John, M., Hirst, S. J., Jose, P. J., *et al.* (1997) Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *Journal of Immunology* **158**: 1841–1817.
- Jörres, R., Nowak, D., Rabe, K., *et al.* (1992) Variability in aerosol output of the DeVilbiss 646 jet nebulizer. *Chest* **102**: 1636.
- Jörres, R. A., Nowak, D., Kirsten, D., *et al.* (1997) A Short Protocol for Methacholine Provocation Testing Adapted to the Rosenthal-Chai Dosimeter Technique. *Chest* **111**: 866–869.
- Juniper, E. F., Kline, P. A., Vanzielegem, M. A., *et al.* (1990) Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonid) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in non-steroid dependent asthmatics. *American Review of Respiratory Disease* **142**: 832–836.
- Klaustermeyer, W. B., Hale, F. C., Prescott, E. J. (1979) Analysis of the Methacholine response in bronchial asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **43**: 237–240.
- Klein, G., Baur, X., Becker, R., *et al.* (1998) Leitlinien für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit pharmakologischen Substanzen. *Pneumologie* **52**: 214–219.
- Klein, G., Matthys, H. (1986) Bronchiale Hyperreagibilität; Nachweismethoden mit pharmakologischen Substanzen. *Praxis und Klinik der Pneumologie* **40**: 156–166.
- Konietzko, N. (1982) Methodische Probleme zur Messung der Überempfindlichkeit des Bronchialsystems. In: *Bochumer Treff 1982: das überempfindliche Bronchialsystem*. Gedon & Reuss Verlag. München .
- Kroegel, C. (1990) The role of eosinophils in asthma. *Lung* **5**: 17.

- Kyan Aung, U., Haskard, D. O., Poston, R. N., *et al.* (1991) Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *Journal of Immunology* **146**: 521–528.
- Lambert, A. L., Winsett, D. W., Coste, D. L., *et al.* (1998) Transfer of allergic airway response with serum and lymphocytes from rats sensitized to dust mite. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **157**: 1991–1999.
- Laprise, C., Boulet, L. P. (1997) Asymptomatic airway hyperresponsiveness: a two year follow-up. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **156**: 403–409.
- Lemière, C., Cartier, A., Dolovich, J., *et al.* (1996) Outcome of specific bronchial responsiveness to occupational agents after removal from exposure. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **154**: 329–333.
- Lourenco, R. V. (1982) Clinical aerosols. I. Characterization of aerosols and their diagnostic uses. *Archives of Internal Medicine* **142**: 2163–2172.
- Magnussen, H., Willenbrock, U., Jörres, R. (1995) Die Dauer der Wirkung inhalativer Corticosteroide auf Lungenfunktion und Empfindlichkeit der Atemwege bei Patienten mit Asthma bronchiale. *Medizinische Klinik* **90**: 213–219.
- Massey, D. G., Miyauchi, D., Massey, G. F. (1982) Nebulizer function. *Bulletin européen de physiopathologie respiratoire* **18**: 665–671.
- Mercer, T. T., Goddard, R. F., Flores, R. L. (1969) Effect of auxiliary air flow on the output characteristics of compressed-air nebulizers. *Annual of Allergy* **27**: 211–217.
- Merkus, P. J. F., van Essen-Zandvliet, E. E. M., Parlevliet, E., *et al.* (1992) Changes of nebulizer output over the years. *European Respiratory Journal* **5**: 488–491.
- Mitchell, I., Corey, M., Woenne, R., *et al.* (1978) Bronchial hyperreactivity in cystic fibrosis and asthma. *Journal of Pediatrics* **93**: 744–748.
- Morrow, P. E. (1974) Aerosol characterization and deposition. *American Review of Respiratory Disease* **110**: 88–89.
- Mutius, E. v., Martinez, F. D., Fritsch, C., *et al.* (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **149**: 358–364.
- Newhouse, M. T. (1982) Principles of aerosol therapy. *Chest* **1**: 39S–41S.

- Newman, S. P., Agnew, J. E., Puria, D., Clarke, S. W. (1982) Inhaled aerosols: lung deposition and clinical applications. *Clinical Physics & Physiological Measurement* **3**: 1–20.
- Newman, S. P., Pellow, P. G. D., Clay, M. M., Clarke, S. W. (1985) Evaluation of jet nebulizers for use with gentamicin solution. *Thorax* **40**: 671–676.
- Nieminen, M. M., Holli, H., Lahdensou, A., *et al.* (1987) Aerosol deposition in automatic dosimeter nebulizer. *European Journal of Respiratory Diseases* **71**: 145–152.
- NIH (1998) National Heart, Lung and Blood Institute: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH Publication **98**: 4051.
- Nowak, D., Heinrich, J., Jörres, R., *et al.* (1996a) Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: West and East Germany. *European Respiratory Journal* **9**: 2541–2552.
- Nowak, D., Mutius, E. v. (2004) Asthma bronchiale im Kindes- und Erwachsenenalter: Risikofaktoren, Diagnose, Standardtherapie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **129**: 509–516.
- Nowak, D., Suppli, U. C., Mutius, E. (2004) Asthma and atopy: has peak prevalence been reached? *European Respiratory Journal* **23**: 359–360.
- Nowak, D., Volmer, D., Wettengel, R. (1996b) Asthma bronchiale - eine Krankheitskostenanalyse. *Pneumologie* **50**: 364–371.
- Orehek, K. (1982) Asthma without airway hyperreactivity: fact or artifact. *European Journal of Respiratory Diseases* **63**: 1–4.
- Orehek, K., Nicoli, M. M., Deljerre, S., Beaupre, A. (1982) Influence of the previous deep inspiration on the spirometric measurement of provoked bronchoconstriction in asthma. *American Review of Respiratory Disease* **123**: 269–272.
- Postma, D. S., Bleecker, E. R., Amelung, P. J., *et al.* (1995) Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *New England Journal of Medicine* **333**: 894–900.
- Prätter, M. R., Irwin, S. R. (1984) The clinical value of pharmacologic bronchoprovocation challenge. *Chest* **85**: 260–265.

- Ramsdell, J. W., Nachtwey, F. J., Moser, K. M. (1982) Bronchial hyperreactivity in chronic obstructive bronchitis. *American Review of Respiratory Disease* **126**: 829–832.
- Rijcken, B., Schouten, J. P., Weiss, S. T., *et al.* (1993) Long term variability of bronchial responsiveness to histamine in a random population sample of adults. *American Review of Respiratory Disease* **148**: 944–949.
- Rothenberg, M. E., Luster, A. D., Lilly, C. M., *et al.* (1995) Constitutive and allergen-induced expression of eotaxin mRNA in the guinea pig lung. *Journal of Experimental Medicine* **181**: 1211–1216.
- Schlegel, J. (1988) Methodische Untersuchung zur bronchialen Hyperreagibilität. Inauguraldissertation. Fachbereich Medizin der Joh. Gutenberg-Universität Mainz .
- Schlegel, J., Hausen, S. v., Stepling, R., Ferlinz, R. (1994a) Bestimmung der bronchialen Reagibilität Gesunder zur Standardisierung des inhalativen Methacholinprovokations-tests mit einem Dosimetersystem. *Pneumologie* **48**: 684.
- Schlegel, J., Meng, G., Kieser, M., *et al.* (1994b) Neue Ansätze zur Auswertung der unspezifischen inhalativen Provokation (Dosis-Wirkungs-Beziehung) zur vergleichenden Bewertung der bronchialen Hyperreagibilität im Rahmen der Durchführung klinischer Arzneimittelprüfungen. *Pneumologie* **48**: 799–802.
- Schmidt, D., Watson, N., Magnussen, H., *et al.* (1999) Serum IgE levels predict human airway reactivity in vitro. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **159**: A123.
- Schultze-Werninghaus, G. (1985) Inhalative Provokationsproben mit Pharmaka und Allergenen - Techniken und Nutzen. *Atemwegs- und Lungenkrankheiten* **11**: 550–558.
- Sterk, P. J., Fabbri, L. M., Qunajer, P. H., *et al.* (1993) (Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Statement of the European Respiratory Society. *European Respiratory Journal* **6(Supplement 16)**: 53–83.
- Sterk, P. J., Plomp, A., van de Vate, J. F., Quanjier, P. H. (1984) Physical properties of aerosols produced by several jet and ultrasonic nebulizers. *Bulletin européen de physiopathologie respiratoire* **20**: 65–72.

- Stewen, J. (2004) Methodische Untersuchung zur Funktionsdiagnostik der kleinen Atemwege mittels der Ultraschallmolmassenspirometrie. Inauguraldissertation. Fachbereich Medizin der Joh. Gutenberg-Universität Mainz .
- Tandon, R. (1997) Measuring nebulizer output. Aerosol production vs gravimetric analysis. *Chest* **111**: 1361–1365.
- Tweedale, P. M., Godden, D., Grant, I. (1981) Hyperventilation or exercise induced asthma. *Thorax* **36**: 596–598.
- Van Asperen, P., Mellis, C. M., South, R. T. (1981) Bronchial reactivity in cystic fibrosis with normal pulmonary function. *American Journal of Diseases of Children* **135**: 815–819.
- Walker, C., Virchow, J., Brujnzeel, P. L. B., *et al.* (1991) T-Cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *Journal of Immunology* **146**: 1829–35.
- Wanger, J., Irvin, C. G. (1998) Responses to diluent inhalation in clinical methacholine challenges (abstract). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **157(Supplement)**: A672.
- Watson, N., Bodtke, K., Coleman, R. A., *et al.* (1997) Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive sensitization of human airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **155**: 839–844.
- Wegener, C. D., Gundel, R. H., Letts, L. G. (1993) Efficacy of monoclonal antibodies against adhesion molecules in animal models of asthma. *Agents & Actions* **43:Supplement**: 151–162.
- Weiland, S. K., Pearce, N. (2004) Asthma prevalence in adults: good news? *Thorax* **59**: 637–638.
- Wettengel, K., Berdel, D., Krause, J., *et al.* (1999) Empfehlungen zur Asthma-Therapie bei Kindern und Erwachsenen. *Pneumologie* **52**: 591–601.
- Wikipedia (2009a) Methacholintest, URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Methacholintest&oldid=66057815>. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie [Online; Stand 1. Dezember 2009].
- Wikipedia (2009b) Receiver Operating Characteristic, URL: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Receiver_Operating_Characteristic&oldid=57049932. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie [Online; Stand 8. Juni 2009].

- Wilson, N. M., Barnes, B. J., Vichers, H., Silverman, M. (1982) Hyperventilation induced asthma: evidence for two mechanisms. *Thorax* **37**: 657–662.
- Wilson, N. M., Green, S., Coe, C., Barnes, P. J. (1987) Duration of protection by oxitropium bromide against cholinergic challenge. *European Journal of Respiratory Diseases* **71**: 455–458.
- Wood, L. J., Inman, M. D., Denburg, J. A., *et al.* (1998) Allergen challenge increases cell traffic between bone marrow and lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **18**: 159–67.
- Yan, K., Salome, C. M., Woolcock, A. J., *et al.* (1985) Prevalence and nature of bronchial hyperresponsiveness in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *American Review of Respiratory Disease* **132**: 25–29.
- Zhong, N. S., Chen, R. C., Yang, M. O., *et al.* (1992) Is asymptomatic bronchial hyperresponsiveness an indication of potential asthma? A two year follow-up of young students with bronchial hyperresponsiveness. *Chest* **102**: 1104–1109.

Abbildungsverzeichnis

1.1. Immunpathogenese des Asthma bronchiale (Beeh und Buhl, 2001)	3
3.1. ZAN 200 ProvAir II (nSpire Health GmbH, 2008)	12
3.2. ZAN 200 ProvAir II (nSpire Health GmbH, 2008)	13
3.3. ZAN 200 ProvAir II (nSpire Health GmbH, 2008)	14
3.4. Pneumatikschema (nSpire Health GmbH, 2008)	15
3.5. DeVilbiss 646 (Hollie <i>et al.</i> , 1991)	16
3.6. DeVilbiss 646 - Schema (Crapo <i>et al.</i> , 2000)	17
3.7. Strukturformel Methacholinchlorid	23
4.1. Regression FEV1	46
4.2. Regression R_{tot}	46
4.3. Excel Sheet Beispiel Seite 1	49
4.4. Excel Sheet Beispiel Seite 2	50
4.5. Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurve PD 20 FEV1	55
4.6. Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurve PD $R_{tot} \geq 0,5$	56
4.7. Kaplan-Meier-Time-to-Event-Kurve PD Minimal	56
4.8. ROC-Kurve für PD 20 FEV1	59
4.9. ROC-Kurve für PD $R_{tot} \geq 0,5$	61
4.10. ROC-Kurve für PD Minimal	63
4.11. ROC-Kurve für PD 20 FEV1 bei Abbruch bei 1000 μg	65
4.12. ROC-Kurve für PD $R_{tot} \geq 0,5$ bei Abbruch bei 1000 μg	67
4.13. ROC-Kurve für PD Minimal bei Abbruch bei 1000 μg	69
4.14. Streudiagramm Gesamt	70
A.1. Ethikvotum	105
A.2. Ethikvotum	106

Tabellenverzeichnis

3.1. Ausgewertete Lungenfunktionsparameter	11
3.2. Vorversuch Eichung	21
3.3. Unspezifische Provokation mit Methacholinchloridlösung 1,75 mg/ml - Protokoll	26
4.1. Alter	29
4.2. Geschlecht	30
4.3. Größe und Gewicht	30
4.4. Kreuztabelle Reaktion	31
4.5. FEV1 [l] nach NaCl-Inhalation (Leerwert)	32
4.6. FEV1 % Predicted Normal nach NaCl-Inhalation (Leerwert)	33
4.7. FEV1 in % der inspiratorischen Vitalkapazität nach NaCl-Inhalation (Leerwert)	33
4.8. FEV1 [l] - Verlauf während der Provokation	34
4.9. FEV1 % VC IN - Verlauf während der Provokation	36
4.10. Peak Expiratory Flow PEF [l/s]	37
4.11. Maximaler expiratorischer Fluss bei noch 75 % ausatembarer VC - MEF75 [l/s]	38
4.12. Maximaler expiratorischer Fluss bei noch 50 % ausatembarer VC - MEF50 [l/s]	39
4.13. Maximaler expiratorischer Fluss bei noch 25 % ausatembarer VC - MEF25 [l/s]	40
4.14. R_{tot} [kPa*s/l] nach NaCl-Inhalation (Leerwert)	41
4.15. Totaler Atemwegswiderstand R_{tot} im Verlauf [kPa*s/l]	42
4.16. sG_{tot} nach NaCl-Inhalation (Leerwert)	43
4.17. Spezifische Atemwegsleitfähigkeit sG_{tot} im Verlauf [l/kPa*s]	43
4.18. Verlauf von FEV1 und R_{tot}	45
4.19. Koeffizienten der Steigungsgeraden	45
4.20. Individuelle Provokationsdosen	52
4.21. PD 20 FEV1 [μ g]	53

4.22. PD $R_{tot} \geq 0,5$ [μg]	53
4.23. PD Minimal [μg]	54
4.24. Koordinaten der ROC-Kurve PD 20 FEV1	58
4.25. Koordinaten der ROC-Kurve PD $R_{tot} \geq 0,5$	60
4.26. Koordinaten der ROC-Kurve PD Minimal	62
4.27. Koordinaten der ROC-Kurve PD 20 FEV1 bei Abbruch bei 1000 μg . . .	64
4.28. Koordinaten der ROC-Kurve PD $R_{tot} \geq 0,5$ bei Abbruch bei 1000 μg . .	66
4.29. Koordinaten der ROC-Kurve PD Minimal bei Abbruch bei 1000 μg . . .	68
4.30. Korrelationen zwischen PD 20 FEV1 und PD $R_{tot} \geq 0,5$	71
5.1. Provokationsprotokoll von Chai et al.	82
5.2. Kurzprotokoll von Jörres et al.	84
5.3. Provokationsschema für die Reservoirmethode	84
5.4. Provokationsschema der ATS mit Quadrupling Doses	85
5.5. ATS-Schweregradeinteilung der BHR und Vergleich mit Dosisstufen des neuen Protokolls	86

A. Anhang

- Ethikvotum



- Ethik-Kommission -

Landesärztekammer Rheinland-Pfalz

Körperschaft des Öffentlichen Rechts
Postfach 29 26 · 55019 Mainz
Deutschhausplatz 3 · 55116 Mainz
Telefon (06131) 28822-0 (Zentrale)
Telefax (06131) 28822-66

Landesärztekammer Rhld.-Pf. · Postfach 29 26 · 55019 Mainz

Herrn
Dr. J. Schlegel
III. Med. Klinik und Poliklinik
Schwerpunkt Pneumologie
Klinikum der Joh. Gutenberg-Universität
Langenbeckstraße 1
55131 Mainz

Ansprechpartner/in:

Frau Pierzina, Frau Weil, Frau Rademacher

Telefon: - 41 (Pie), 42 (WL), 43 (Rd)

Bitte bei jedem Schriftwechsel die Bearbeitungsnummer angeben!

Mainz, den 11.04.2006 / Rd

Antrag (Klinische Forschung) Dr. SCHLEGEL, Prof. Dr. Buhl, III. Med. Klinik der Univ. Mainz, vom 05.01.06 (Eingang: 10.01.06):
„Methodische Untersuchung zur Diagnostik der bronchialen Hyperreagibilität mit Hilfe eines inhalativen Methacholin-Provokationstestes“

Bearbeitungsnummer 837.009.06 (5107)

Ihr Schreiben vom 21.03.06

Sehr geehrter Herr Dr. Schlegel,

vielen Dank für Ihr o.a. Schreiben.

Die Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz hat in ihrer Sitzung am 01.02.06 über Ihren Antrag beraten und folgenden Beschluss gefasst:

Auf der Grundlage der zur Beratung vorgelegten Unterlagen sowie der durch Ihr Schreiben vom 21.03.06 nachgereichten Dokumente bestehen nach dem gegenwärtigen Stand keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der geplanten Studie, d. h. Sie erhalten ein positives Votum.

Die Ethik-Kommission geht jedoch davon aus, dass Sie folgenden Hinweis berücksichtigen:

Bitte geben Sie in der Probanden-/Patienteninformation noch den Studientitel an.

Ferner gibt die Ethik-Kommission folgende allgemeine Hinweise:

Die Verantwortlichkeit des Prüfarztes bleibt in vollem Umfang bestehen und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Die Entscheidung ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Konto-Nr. 0001299735 · Deutsche Apotheker- und Ärztebank · Filiale Mainz · BLZ 550 608 31



LÄK RLP - Schreiben vom 11.04.2006
Seite 2 von 2

Der Ethik-Kommission sind alle schwerwiegenden Komplikationen in beurteilbarer Form unverzüglich mitzuteilen. Die Ethik-Kommission bittet darum, dass ihr das Ergebnis der Studie zur Kenntnis gebracht wird.

Mit freundlichen Grüßen

E. Wandél
Dr. Eveline Wandél
Vorsitzende



Folgende Unterlagen haben zur Beratung vorgelegen:

Revidierter Antrag vom 21.03.06
Produktbeschreibung
Patienten- und Probandeninformation vom 21.03.06
Einverständniserklärung vom 03.01.06

B. Danksagung

C. Lebenslauf