

Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid
in der Ausatemluft
als Marker entzündlicher Aktivität

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Rudolf A. Jörres
aus Düren

Hamburg 2002

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt in der Zeit von Januar 1997 bis Mai 2002 unter der Leitung von Professor Dr. med. G. Gercken, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie. Die Messungen erfolgten im Forschungslabor des Krankenhauses Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie (Ärztliche Leitung: Prof. Dr. med. H. Magnussen), in Zusammenarbeit mit dem Pneumologischen Forschungsinstitut (PRI) am Krankenhaus Großhansdorf (ab 1998).

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Gercken

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Magnussen

Wenn ich bedenke, wie man wenig ist
Und was man ist, das blieb man andern schuldig
Johann Wolfgang von Goethe: *Torquato Tasso*.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	III
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Stickstoffmonoxid und die Atemwege	1
1.2	Wasserstoffperoxid, ein potentieller Entzündungsmarker.....	6
1.3	Ozon und Allergen als pro-inflammatorische Stimuli	10
1.4	Corticosteroide als anti-inflammatorische Intervention	13
2	Problemstellung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Durchführung der Messungen	17
3.1.1	Messung des ausgeatmeten NO	17
3.1.2	Messung des ausgeatmeten H ₂ O ₂	23
3.1.3	Einatmung von Ozon und Allergen	27
3.1.4	Inhalation von Corticosteroiden	29
3.2	Analyse der Daten	30
3.3	Untersuchte Probanden	32
3.4	Anmerkungen zur Durchführung	34
3.5	Liste der Chemikalien	35
3.6	Liste der Geräte	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Entstehung des ausgeatmeten NO	37
4.1.1	Das NO-Transportmodell	37
4.1.2	NO-Konzentration bei konstanter Flussrate	48
4.1.3	NO-Konzentration bei zeitlich variabler Flussrate - Stufenantwort	50
4.2	Flussabhängigkeit des ausgeatmeten H ₂ O ₂	55
4.2.1	Abhängigkeit der Konzentration von der Ausatemrate	55

4.2.2	Variabilität der H_2O_2 -Konzentration	57
4.2.3	Modellanalyse der Flussabhängigkeit	58
4.3	Wirkung entzündlicher Stimuli (Ozon/Allergen) auf NO und H_2O_2	59
4.3.1	Effekt von Ozon auf das ausgeatmete NO	59
4.3.2	Effekt von Allergen auf das ausgeatmete NO	59
4.3.3	Reproduzierbarkeit der Effekte auf NO	61
4.3.4	Effekt von Ozon auf das ausgeatmete H_2O_2	63
4.3.5	Effekt von Ozon auf das ausgeatmete H_2O_2	63
4.3.6	Reproduzierbarkeit der Effekte auf H_2O_2	65
4.3.7	Beziehung zwischen NO und H_2O_2	65
4.3.8	Ergebnisse der anderen Messgrößen	69
4.4	NO-Messungen zur Lokalisation anti-entzündlicher Steroideffekte	70
4.4.1	Wirkung von Steroiden auf NO bei leichtgradigem Asthma	70
4.4.2	Wirkung von Steroiden auf NO bei mittelgradigem Asthma	73
5	Diskussion	78
5.1	Entstehung des ausgeatmeten NO	78
5.2	Flussabhängigkeit des ausgeatmeten H_2O_2	86
5.3	Wirkung entzündlicher Stimuli (Ozon/Allergen) auf NO und H_2O_2	89
5.4	NO-Messungen zur Lokalisation anti-entzündlicher Steroideffekte	95
5.5	Kritische Wertung und Ausblick	100
6	Zusammenfassung	102
6.1	Summary	104
7	Literatur	106
8	Anhang	122
8.1	Detaillierte Herleitung des NO-Transportmodells	122
8.1.1	Alveoläres Kompartiment	122
8.1.2	Atemwegskompartiment	124
8.2	Formale Lösungen des Modells	126

8.2.1	Konstante Flussrate und konstante Eigenschaften der Atemwege.....	126
8.2.2	Zeitabhängige Flussrate und Eigenschaften der Atemwege	127
8.2.3	Zeitabhängige Flussrate und zeitunabhängige Parameter	128
8.2.4	Die Stufenantwort als Anwendung des Konzeptes zeitabhängiger Flussraten	129
8.2.5	Verfeinerung des Modells durch Einbeziehung der mukosalen Flüssigkeitsschicht	130

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	activator protein 1 (Transkriptionsfaktor)
BALF	bronchoalveoläre Spülflüssigkeit
BDP	Beclometason-Dipropionat (beclomethasone dipropionate)
BW	bronchial wash
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
ELF	epithelial lining fluid
eNOS	endotheliale NOS
FAD	Flavinadenindinucleotid
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe (CFC)
FEV ₁	Einsekundenvolumen = maximales, forciert in 1 s ausatembares Volumen
fMLP	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
FMN	Flavinmononucleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniebildungstimulierender Faktor
GPX	Glutathion-Peroxidase
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	glucocorticoid response element
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxydiertes Glutathion
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HFA	Hydrofluoralkan-134a
HOBr	hypobromige Säure
HOCl	hypochlorige Säure
IgE	Immunglobulin E
IκB	inhibitorisches Protein für den nukleären Faktor κB
IL-1	Interleukin-1

IL-8	Interleukin-8
iNOS	induzierbare NOS
LDH	Laktatdehydrogenase
m	männlich
MMAD	Medianer aerodynamischer Durchmesser gemäß Massenverteilung
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl
NADPH	reduziertes Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NANC	nicht-adrenerger, nicht-cholinerger Weg im Nervensystem
NF-IL-6	nukleärer Faktor für Interleukin-6
NF-κB	nukleärer Faktor κB (Transkriptionsfaktor)
NGF	nerve growth factor
nNOS	neuronale NOS
NOS	NO-Synthase
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff (Zustand ¹ Δg)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit I. Art
PC ₁₅ FEV ₁	Provokationskonzentration von Methacholin, die einen Abfall von FEV ₁ um 15 % gegenüber dem Ausgangswert hervorruft
PD ₁₅ FEV ₁	Kumulative Provokationsdosis von Allergen, die einen Abfall von FEV ₁ um 15 % gegenüber dem Ausgangswert hervorruft
PHPL	p-Hydroxyphenyllaktat
ppb	parts per billion (per Volumen)
r	linearer Korrelationskoeffizient nach Pearson
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (Standardfehler)
SOD	Superoxiddismutase
STAT-1	signal transducer and activator of transcription 1 (Transkriptionsfaktor)
VC	inspiratorische Vitalkapazität = maximal einatembares Volumen
w	weiblich
±	arithmetische SD oder SEM (additiv)
÷	geometrische SEM (faktoriell)

Im folgenden sind die Abkürzungen, die bei der Herleitung und Beschreibung des NO-Transportmodells verwandt wurden, separat aufgelistet.

$\alpha_{awc}(x,t)$	lokaler, zentraler, bronchialer Transferfaktor per NO-Konzentrationsdifferenz, Oberflächeneinheit und Zeiteinheit
$\alpha_{awp}(t)$	lokaler peripherer, alveolärer Transferfaktor per NO-Konzentrationsdifferenz, Oberflächeneinheit und Zeiteinheit
\mathcal{D}	Diffusionskoeffizient von NO innerhalb der Flüssigkeitsschicht
$D(x,t)$	lokaler Durchmesser der Atemwegsröhre
D_{NO}	alveoläre Diffusionskapazität für NO nach HYDE et al. [1997]
Δt	Inkrement der Zeitvariablen
Δx	Inkrement der Längenkoordinate
$F_{ac}(x,t)$	fraktionelle NO-Konzentration in der Atemwegsröhre
$F_{ap}(t)$	fraktionelle NO-Konzentration im peripheren Kompartiment
F_{ap0}	Anfangswert der fraktionellen NO-Konzentration im peripheren Kompartiment
$F_{ex}(t)$	fraktionelle Konzentration des ausgeatmeten NO (Wert von $F_{ac}(x,t)$ bei $x = L$)
$F_{ex,1}, F_{ex,2}$	fraktionelle NO-Konzentrationen der Ausatemluft, die den Flussraten $\dot{V}_{ex,1}$ und $\dot{V}_{ex,2}$ korrespondieren
$F_{wc}(x,t)$	fraktionelle NO-Konzentration in der Wandung der Atemwegsröhre (Gleichgewichts-Äquivalent der Luftraumkonzentration)
$F_{wp}(x,t)$	fraktionelle NO-Konzentration in der Wandung des peripheren Kompartiments (Gleichgewichts-Äquivalent der Luftraumkonzentration)
h	Dicke der Flüssigkeitsschicht (ELF), welche die Atemwegsröhre auskleidet
$K_{awc}(t)$	totaler effektiver zentraler Transferfaktor per NO-Konzentrationsdifferenz und Zeiteinheit
L	Länge der Atemwegsröhre (bronchiales, zentrales Kompartiment)
$v(x,t)$	lokale Geschwindigkeit des Luftstroms innerhalb der Atemwegsröhre
P_B	Barometerdruck
r	Integrationsvariable (Hilfsgröße der Ableitung und Darstellung)
$S_p(t)$	Oberfläche des peripheren Kompartiments
t	Zeit
t_s	Zeit, zu der eine stufenförmige Änderung der Flussrate erfolgt
$T(t)$	Transitzeit (Durchgangszeit durch die gesamte Atemwegsröhre) für ein Volumenelement, das die Röhre zur Zeit t verlässt

T_1, T_2	Transitzeiten, die den Flussraten $\dot{V}_{ex,1}$ und $\dot{V}_{ex,2}$ korrespondieren
T_{delay}	Verzögerungszeit bei Stufenantwort (entspricht V_d)
T_{trans}	(quasilineare) Übergangszeit (Transitionszeit) bei Stufenantwort
τ_p	Zeitkonstante der Änderung der peripheren NO-Konzentration
u	Integrationsvariable (Hilfsgröße der Ableitung und Darstellung)
$V_c(t)$	Gesamtvolumen der Atemwegsröhre (NO-produzierende Region)
$V_{d,anat}$	mundwärts gelegener, anatomischer Totraum der NO-Produktion
$V_{d,app}$	apparativer Totraum der NO-Produktion (Mundstück, Schläuche)
V_d	gesamter Totraum der NO-Produktion (apparativ plus anatomisch)
V_L	Volumen des alveolären Kompartiments nach HYDE et al. [1997]
V_{NOai}	volumetrische Tiefe der NO-assoziierten Atemwegsentzündung (V_d plus V_c)
$V_p(t)$	Volumen des peripheren, alveolären Kompartiments
$\dot{V}_{ex}(t)$	expiratorische Flussrate (Ausatemrate)
$\dot{V}_{ex,1}, \dot{V}_{ex,2}$	konstante Werte der expiratorischen Flussrate bei der Stufenantwort
x	Längenkoordinate entlang des zentralen Kompartiments (Atemwegsröhre)
$Y(t)$	Weg, den ein Volumenelement von der Zeit 0 bis zur Zeit t zurücklegt (Hilfsfunktion zur Berechnung von $T(t)$)
$Y^{-1}(t)$	Umkehrfunktion von $Y(t)$

1 Einleitung

Zur Erfassung entzündlicher Vorgänge in den Atemwegen des Menschen sind Verfahren von besonderem Interesse, die mit einer geringen Belastung des Patienten einhergehen. Hierzu gehört neben der semi-invasiven Methode der Sputuminduktion die nicht invasive Analyse der Ausatemluft [GIBSON 2000]. Letztere enthält sowohl partikuläre als auch gasförmige Komponenten, die als Indikatoren zellulärer Vorgänge dienen können. In vielen Fällen zeigen sich Änderungen bei Atemwegserkrankungen [KHARITONOV 2001, 2002], doch ist die Streuung in der Regel groß und die Interpretation ungesichert.

Zwei Komponenten der Ausatemluft können nach der gegenwärtigen Datenlage als relevant für die Erfassung der Atemwegsentzündung gelten. Hierbei handelt es sich um Stickstoffmonoxid (NO), das aufgrund der Verfügbarkeit schnellanzeigender Messgeräte vielfach untersucht wurde, sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Zwar sind die Daten für H_2O_2 vergleichsweise spärlich, doch erscheint für eine vergleichende Analyse attraktiv, dass es sich um eine niedermolekulare Verbindung handelt, deren Übergang in die Ausatemluft ähnlich wie beim NO erfolgen dürfte. Da H_2O_2 vermutlich einen unspezifischen Indikator des oxidativen Stress darstellt, NO hingegen stärker auf spezifische immunologische Vorgänge verweist, tragen beide Marker unabhängige Information. Bevor man jedoch ihre Aussagekraft beim Menschen mittels Interventionen prüft, erscheint es sinnvoll, die Frage nach ihrer Entstehung und Lokalisation in der Lunge zu klären.

1.1 Stickstoffmonoxid und die Atemwege

Nach etablierter Meinung spielen eosinophile Granulozyten, neben Lymphozyten, bei der Entstehung, Unterhaltung und möglichen Verschlechterung eines Asthma bronchiale eine zentrale Rolle [MENZIES-GOW 2002]. Die Eosinophilen im Atemtrakt können nur mittels Sputuminduktion oder auf invasive Weise erfasst werden. Somit erscheint die eng mit ihnen gekoppelte Konzentration des ausgeatmeten NO besonders für die Anwendung beim Menschen geeignet.

Die Beziehung zwischen Eosinophilen und NO findet sich beim chronischen Asthma unabhängig von der Dauer der Erkrankung [GRÖNKE 2002]. Ferner korrespondieren Zahl und

Aktivierung von Eosinophilen nach Gabe von Allergen [GAVREAU 1996] der NO-Konzentration [KHARITONOV 1995] und funktionellen Antwort der Atemwege. Umgekehrt führen Corticosteroide, als anti-entzündliche Pharmaka, zu einer Abnahme der Zahl der Eosinophilen sowie der NO-Werte. Auch hochdosiertes, inhaliertes Interleukin-2, das eine T_H2-artige Immunantwort und dem Asthma ähnliche Veränderungen auslöst, induziert den simultanen Anstieg der Eosinophilenzahl und NO-Konzentration [LOPPOW 2002].

Wesentlich für das Verhalten von NO im Organismus ist sein lipophiles Verhalten, das zu einer hohen Mobilität innerhalb und zwischen Zellen führt. Das ungepaarte Elektron verleiht dem NO die Eigenschaften eines freien Radikals (NO[•]), mit der Folge einer hohen Reaktivität mit anderen freien Radikalen [HALLIWELL 1999], insbesondere reaktiven Sauerstoffspezies (ROS); diese Eigenschaft stellt eine Verbindung zwischen NO und oxidativem Stress her (s.u.). Gegenüber Nicht-Radikalen ist die Reaktivität vergleichsweise gering. Die Reaktion mit molekularem O₂ spielt im Organismus allenfalls bei therapeutisch inhaliertem NO eine Rolle [TOTAPALLY 1999], da sie in wässrigen physiologischen Lösungen sehr langsam erfolgt. In physiologischer Umgebung weist NO abhängig von pH, Hämoglobin- und O₂-Konzentration Halbwertszeiten im Bereich weniger Sekunden auf [HAKIM 1996, SCHMIDT 1997].

Entzündliche Prozesse gehen häufig mit einer Imbalance zwischen der Erzeugung von ROS und der Kapazität der antioxidativen Abwehr einher [HALLIWELL 1999] (vgl. 1.2). Die Reaktion von NO[•] mit Superoxid-Anion führt zu Peroxynitrit ($O_2^{\cdot-} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^-$), diejenige mit dem Hydroxyl-Radikal zu salpetriger Säure ($OH^{\cdot} + NO^{\cdot} \rightarrow HNO_2$) und diejenige mit Peroxyl-Radikalen zu Alkyl-Peroxynitriten ($RO_2^{\cdot} + NO^{\cdot} \rightarrow ROONO$). Eine vergleichbare Ratenkonstante gegenüber NO zeigt das Tyrosyl-Radikal (TyrO[•]). Da Tyrosin häufig am aktiven Zentrum von Enzymen vertreten ist, kann dies die toxische Wirkung von NO teilweise erklären. Entsprechend wurde Nitrotyrosin als Marker der endogenen Erzeugung von NO bzw. ONOO⁻ eingesetzt [SALEH 1998]. Die genannten Reaktionsprodukte werden analog den ROS als reaktive Stickstoffspezies (RNS) bezeichnet.

Peroxynitrite scheinen insofern bei Atemwegserkrankungen involviert zu sein [SADEGH-HASHJIN 1998], als entweder direkt [GANAS 2001] oder in Form von Nitrotyrosin erhöhte Konzentrationen dieser Spezies bei Patienten mit Asthma [SALEH 1998] oder COPD [ICHINOSE 2000] gefunden wurden, neben einer verringerten inhibitorischen Kapazität

[KANAZAWA 2002]. Peroxynitrite oder andere von NO abgeleitete Verbindungen sind für die meisten Effekte an Proteinen verantwortlich, insbesondere die kovalente Modifikation von -SH-Gruppen. Das Zusammenwirken von NO, RNS und ROS ist insofern komplex, als NO u.U. auch die Erzeugung stabiler Endprodukte bewirken und zur Termination einer Kette radikalischer Reaktionen führen kann [HOGG 1999, RUBBO 2000], während Peroxynitrit gegenteilig wirkt [VAN DER VEEN 1999]. Auch werden regulatorische Funktionen der RNS durch Reaktionen mit Ferricytochrom c und sowie das Vorkommen einer mitochondrialen NOS nahegelegt [NOHL 2000, LACZA 2001, RADY 2002].

Kurze Halbwertszeiten sind ebenfalls für dasjenige NO anzunehmen, welches sich im Luftraum der Lunge befindet und somit einer geringeren Zahl potentieller Reaktionspartner ausgesetzt ist. Hier spielt die hohe Diffusivität im Verein mit der hohen Affinität für Hämoglobin eine Rolle [HUANG 2002]. Dies spiegelt sich in einer extrem hohen pulmonalen Diffusionskapazität für NO wider [BORLAND 1989]. Ungeachtet dessen findet sich NO in der Ausatemluft in hinreichend reproduzierbarer Weise, um detaillierte Analysen zu erlauben.

Als primärer Mechanismus der NO-Produktion in den Atemwegen gilt die Freisetzung aus L-Arginin mittels spezifischer NO-Synthasen (NOS) unter gleichzeitiger Erzeugung von L-Citrullin. NADPH und Sauerstoff sind als Kosubstrate und FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin und Häm als Kofaktoren notwendig. Wenn die NOS NO binden, nimmt ihre Aktivität ab. Sie liegen in drei Klassen vor: neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS). nNOS kommt in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems konstitutiv vor, eNOS in Endothelzellen. Das von eNOS synthetisierte NO reguliert die Gefäßweite und wurde zuerst als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) bezeichnet [PALMER 1987, IGNARRO 1987]. Die Aktivität beider NO-Synthasen wird über Calmodulin und das freie intrazelluläre Ca^{2+} kontrolliert, indem die Besetzung hochaffiner Bindungsstellen für Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung mit der Folge einer veränderten Bindung an NOS führt. Im Normalzustand ist die niedrige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration limitierend. Ca^{2+} kann als Folge von Rezeptoraktivierung, beispielsweise durch Histamin und Leukotriene [PERSSON 1995], sowie mechanische Stimulation [HILLSLEY 2002] temporär eine erhöhte NO-Synthese auslösen. iNOS wurde initial in Makrophagen als Antwort auf Stimuli wie Zytokine und Endotoxin nachgewiesen. Sie findet sich vorzugsweise an Orten der Entzündung und produziert dort NO mit konstant hoher Rate, da sie *per se* stark an Calmodulin bindet und somit weitgehend unabhängig von Ca^{2+} agiert. iNOS konnte mittels mRNA oder

immunzytochemisch in Makrophagen [LOPPOW 2001], neutrophilen [SANCHEZ DE MIGUEL 2002] und eosinophilen [DEL POZO 1997] Granulozyten sowie Bronchialepithelzellen [REIMER 1997] nachgewiesen werden.

Die Benennung der NO-Synthasen ist nicht völlig wörtlich zu nehmen, denn das Vorkommen der eNOS ist keineswegs auf das Endothel beschränkt [DE FRUTOS 2001, SANCHEZ DE MIGUEL 2002], und sowohl eNOS als auch nNOS können induziert werden in dem Sinne, dass ihre Expression durch externe Stimuli gesteigert werden kann. Ferner ist iNOS - auf niedrigem Niveau - auch in gesundem Gewebe nachweisbar [GUO 1995]. Daher werden die NOS häufig durch Nummern gekennzeichnet; hierbei wird die iNOS als NOS II bezeichnet. Darüber hinaus gibt es Unterschiede in der Fähigkeit von Makrophagen verschiedener Spezies oder verschiedener Kompartimente der Lunge, auf Stimuli mit der Expression von iNOS bzw. der Produktion von NO zu reagieren [REIMER 1997, SNELL 1997, WANG 1998, HOLZ 1998b]. Die Bereitschaft menschlicher Makrophagen, iNOS zu exprimieren, ist beispielsweise wesentlich geringer als diejenige von Nagern [ALBINA 1995, GANTT 2001, THOMASSEN 2001]. Ähnliches gilt für Neutrophile [ALBINA 1995].

Während nNOS und eNOS picomolare NO-Konzentrationen erzeugen, liegen die durch iNOS erzeugten Konzentrationen viel höher, möglicherweise im mikromolaren Bereich. Vermutlich geht der Hauptanteil des ausgeatmeten NO auf iNOS zurück. Überdies scheint die Expression von iNOS im Bronchialsystem von Asthmatikern gesteigert [SALEH 1998, GUO 2000, TEN HACKEN 2000, REDINGTON 2001], obgleich die Daten nicht ganz eindeutig sind [HOLZ 1998b, VAN DEN TOORN 2001].

Die Regulation der iNOS erfolgt primär über ihre Synthese. Das Enzym produziert NO, solange es intakt und L-Arginin vorhanden ist. Folglich haben Aufnahme, Rezyklierung und Abbau von L-Arginin unter Beteiligung der Arginase eine regulatorische Wirkung [MORI 2000, XIE 2000]. Möglicherweise ist die NO-Produktion beim Asthma auch aufgrund einer verbesserten Versorgung mit L-Arginin erhöht [GUO 2000]. Die Synthese von iNOS steht unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B [GANSTER 2001, KWON 2001, TOGA 2001] und STAT-1 [GUO 2000, GANSTER 2001], die in koordinierter Weise auch andere Aspekte der Entzündung kontrollieren. Auslösende Faktoren sind neben unspezifischen Stimuli vor allem Zytokine wie IFN- γ und TNF- α [vgl. REIMER 1997].

Zusätzlich zum enzymatischen Weg kann NO direkt aus Körperflüssigkeiten freigesetzt werden, vor allem aus Nitrit bei niedrigem pH. Möglicherweise ist das ausgeatmete NO beim Asthma auch teilweise auf eine Ansäuerung des Flüssigkeitsfilmes (epithelial lining fluid, ELF) der Oberfläche der Atemwege zurückzuführen [HUNT 2000]. Nitrit entsteht in Magen und Mund durch Mitwirkung von Bakterien aus Nitrat, das seinerseits aus der Nahrung stammt [ZETTERQUIST 1999]. Im Speichel wurden selbst im nüchternen Zustand Nitrit-Konzentrationen von 100 μM gemessen. Man vermutet, dass die normale physiologische Funktion im gastrointestinalen Trakt antimikrobieller Natur ist [XU 2001]. Darüber hinaus kann NO durch direkte chemische Wirkung von Wasserstoffperoxid auf Arginin [NAGASE 1997] sowie über Thionitrite bzw. Nitrosothiole [SHEU 2000, GROSSI 2002, PALMERINI 2002] erzeugt werden. Nitrosothiole (RSNO) sind im Blut nachweisbar, zumeist als Nitrosoalbumin [MARLEY 2001], sowie in der ELF, zumeist als Reaktionsprodukt (GSNO) mit Glutathion.

Die NO-vermittelte Vasodilatation spielt eine wesentliche Rolle beim Ventilations-Perfusions-Gleichgewicht der Lunge, und die experimentelle Inhalation von NO wurde eingesetzt, um dieses Gleichgewicht zu beeinflussen [KANNIESS 2001]. NO bewirkt vermittelt über den nNOS über einen nicht-adrenergen, nicht-cholineren Mechanismus (NANC) ebenfalls eine Bronchodilatation, doch ist diese nur gering ausgeprägt [WARD 1995] und bei chronischer Inflammation möglicherweise durch die Reaktion von NO mit ROS weiter reduziert. Eine zentrale Rolle kommt NO in der Abwehr bakterieller [TSAI 1997], parasitärer [LIEW 1997] und viraler [SAURA 1999] Infekte zu. Hierbei besteht neben regulatorischen Effekten die Hauptwirkung in der Schädigung lebenswichtiger Enzyme der Mikroorganismen [SAURA 1999]. Vermutlich stellt die Erhaltung der Sterilität eine wesentliche Aufgabe einer lokal hohen NO-Produktion dar, beispielsweise in den Nasennebenhöhlen. Auch wurden bei experimentellen [DE GOUW 1998a] oder natürlich vorkommenden [KHARITONOV 1995b] viralen Infekten erhöhte Konzentrationen des ausgeatmeten NO gefunden.

Die Beziehung zwischen NO und Atemwegsentzündung ist keineswegs geklärt, ungeachtet einer großen Zahl klinischer und experimenteller Arbeiten. Sicher ist, dass NO insbesondere beim Asthma bronchiale erhöht und in relativ spezifischer Weise an die eosinophile Entzündung gekoppelt ist. Neben einer Vielzahl abträglicher Effekte wurden auch protektive Wirkungen insbesondere von nNOS beobachtet [z.B. RICCIARDOLO 1996, 2001]. Wahrscheinlich jedoch führen beim Asthma die hohen Konzentrationen von NO im Verein mit ROS und RNS überwiegend zu einer Schädigung des Atemwegsepithels sowie einer Ver-

stärkung der bronchialen Reaktivität. Insofern stellt das exhalierte NO einen sinnvollen Marker der Atemwegsentzündung dar [BARNES 1996, SANDERS 1999, BERLYNE 2000, KHARITONOV 2001].

Um die Beziehung zwischen der NO-Produktion in der Lunge und den expiratorischen NO-Konzentrationen zu verstehen, führten HYDE et al. [1997] eine detaillierte mathematische Analyse durch. Hierzu verwandten sie ein konventionelles, den alveolären Raum darstellendes Einkompartimentenmodell. Diesem lag der Ansatz zugrunde, dass eine Erhöhung der alveolären Diffusionskapazität für NO während der Ausatmung eine Erniedrigung der NO-Konzentration bewirkte. Eine Assoziation des erzeugten NO mit den Bronchien, welche in Anbetracht hoher NO-Werte beim Asthma plausibel erscheint, war in diesem Konzept weder vorgesehen noch ohne grundlegende Änderung realisierbar. SILKOFF und Mitarbeiter [1997] berichteten erstmalig, dass die Konzentration des ausgeatmeten NO sich umgekehrt zur Höhe der Ausatemrate verhält. Diese Autoren skizzierten bereits die grundlegenden Ideen der Bronchien als primärer Quelle des exhalierten NO sowie der Durchgangszeit durch die Bronchien als wesentlicher Determinante. Allerdings machten sie dieses Konzept nicht zur Basis eines quantitativen Modells wie die vorliegende Arbeit.

Ein derartiges Modell, das zugleich interpretierbare und numerisch schätzbare Parameter enthält, würde das Verständnis der Mechanismen fördern, die das ausgeatmete NO erzeugen. Angesichts der vielfältigen, möglicherweise regional unterschiedlichen Interaktionen von NO im Bronchialsystem scheint dies besonders wünschenswert. Darüber hinaus sollte es möglich sein, zu einer Beschreibung in Form messunabhängiger Systemparameter zu gelangen und gegebenenfalls neue Messgrößen abzuleiten. In diesem Sinne könnte ein Modell die konzeptionelle Grundlage dafür liefern, verschiedene Messverfahren unter einheitlichem Gesichtspunkt zu sehen und je nach Anforderung gezielt einzusetzen.

1.2 Wasserstoffperoxid, ein potentieller Entzündungsmarker

Exogen oder endogen erzeugter oxidativer Stress wird oft als wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Atemwegserkrankungen angesehen [HALLIWELL 1999]. Als Marker wurde verschiedentlich die Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in der Ausatemluft vorgeschlagen [BALDWIN 1987, DOHLMAN 1993]. Im Gegensatz zum exhalierten NO fand sich das exhalierte H_2O_2 nicht nur beim Asthma [DOHLMAN 1993, ANTCZAK 1997, JÖBSIS 1997,

HORVATH 1998, EMELYANOV 2001], sondern auch bei der COPD erhöht [DEKHUIJZEN 1996, NOWAK 1998, DE BENEDETTO 2000]. Ferner wurden bei Patienten mit Bronchiektasen [LOUKIDES 1998] oder zystischer Fibrose [WORLITZSCH 1998] sowie während viraler Infekte [JÖBSIS 2001] und bei Rauchern [NOWAK 1996] erhöhte Werte von H_2O_2 gemessen; allerdings ließen sich diese Befunde nicht immer bestätigen [VAN BEURDEN 2002a, LOUKIDES 2002]. Therapeutische Interventionen bewirkten eine Abnahme der Messwerte [JÖBSIS 2000, KASIELSKI 2001], jedoch ebenfalls nicht in allen Untersuchungen [FERREIRA 2001, HO 1999]. Dies weist auf eine hohe Variabilität der Messwerte oder ihre Abhängigkeit von speziellen Messbedingungen hin.

In der überwiegenden Zahl chemischer Reaktionen verhält sich H_2O_2 als Oxidationsmittel [HALLIWELL 1999], wobei die Reaktionen von H_2O_2 in sauren Lösungen in der Regel langsamer verlaufen als in basischen Lösungen. Die oxidative Wirkung ist primär für die Zytotoxizität verantwortlich, die bei Konzentrationen von 10-100 μM zu beobachten ist. H_2O_2 mischt sich gut mit Wasser und diffundiert leicht sowohl innerhalb wässriger Lösungen als auch zwischen Zellen. Daher ist es ohne weiteres plausibel, H_2O_2 in der Ausatemluft zu finden.

H_2O_2 kann auf mehreren Wegen unter Enzymkatalyse erzeugt oder verbraucht werden. Zentraler Erzeugungsmechanismus ist die Dismutation des Superoxid-Anion-Radikals mittels Cu/Zn- oder Mn-abhängiger Superoxiddismutasen (SOD) ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). CuZnSOD ist ubiquitär in eukaryotischen Zellen, hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und arbeitet im physiologischen Bereich nahezu unabhängig vom pH; hierbei hängen die Ratenkonstanten vom Umfeld ab [GOLDSTEIN 1988]. Neben der zytosolischen CuZnSOD existiert eine extrazelluläre SOD (EC-SOD), die vermutlich an extrazelluläre Kohlenhydrate gebunden ist, insbesondere in Lunge und Blutgefäßen. Man nimmt an, dass ihre Funktion vor allem darin besteht, $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu eliminieren und so zu verhindern, dass mit NO^{\cdot} das aggressive Peroxynitrit gebildet wird (vgl. 1.1). Dies wird durch die hohe Empfindlichkeit entsprechender knock-out-Mäuse gegenüber Hyperoxie [CARLSSON 1995] oder Ozon [JONSSON 2002] nahegelegt. Generell weist die Atemwegsantwort auf Ozon bezüglich Toleranzentwicklung (vgl. 1.3) und antioxidativer Antwort [JACKSON 1984] Ähnlichkeit zu derjenigen auf Hyperoxie auf, so dass Analogieschlüsse erlaubt scheinen. MnSOD zeigt eine ähnliche Umsatzrate wie CuZnSOD, ist jedoch weitgehend auf die Mitochondrien beschränkt; ihr Anteil an der Gesamtaktivität der zellulären SOD liegt um 10 %. Neben der Erzeugung durch SOD kann

H_2O_2 durch eine Vielzahl weiterer Enzyme freigesetzt werden, darunter die zumindest teilweise in den Peroxisomen lokalisierten Flavoprotein-Dehydrogenasen und Glykolat-Oxidasen.

Der enzymvermittelte Abbau von H_2O_2 erfolgt entweder durch Disproportionierung über Katalase ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) oder mittels Peroxidasen. Katalase kommt in den meisten aeroben Zellen vor, insbesondere solchen, die hohen Sauerstoffpartialdrücken (Erythrozyten) oder katalytischer Aktivität (Leberzellen) ausgesetzt sind. Sie ist vorwiegend in den Peroxisomen lokalisiert, also denjenigen Organellen, in denen auch ein Großteil der H_2O_2 erzeugenden Enzymaktivität zu finden ist. Verglichen mit der Katalase ist die Aktivität der überwiegend zytosolischen Glutathion-Peroxidase (GPX) meist geringer, auch wenn in einzelnen Geweben ihre Konzentration bis in den millimolaren Bereich reichen kann. GPX arbeitet unter Verbrauch von reduziertem Glutathion ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$) und erzeugt oxidiertes Glutathion, welches über Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH zu GSH rezykliert wird ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow + 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$). Man nimmt an, dass die regional unterschiedliche Verteilung von Katalase und GPX im Verein mit der Versorgung mit GSH bzw. NADPH zu einer regional unterschiedlichen antioxidativen Kapazität führt. Vermutlich beträgt in der Lunge die Kapazität von GPX, H_2O_2 umzusetzen, nur etwa $\frac{1}{4}$ derjenigen der Katalase [HALLIWELL 1999].

Ein Großteil des mittels SOD erzeugten H_2O_2 wird von aktivierten Neutrophilen verwandt, um über Myeloperoxidase (MPO) hypochlorige Säure zu produzieren ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{HOCl} + \text{OH}^-$). HOCl besitzt ein starkes Oxidationsvermögen und wird zumindest teilweise für die zytotoxischen bzw. bakteriziden Fähigkeiten der Neutrophilen verantwortlich gemacht. Es kann mit $\text{O}_2^{\cdot -}$ zur Produktion des hochreaktiven Hydroxyl-Radikals führen ($\text{HOCl} + \text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\cdot + \text{Cl}^-$). Auf diese Weise ist eine Ankopplung an den respiratory burst gegeben, d.h. die kurzfristige gesteigerte Erzeugung von $\text{O}_2^{\cdot -}$ durch eine membranständige NADPH-Oxidase unter vermehrter O_2 -Aufnahme. HOCl kann mit H_2O_2 Singulett- O_2 erzeugen, das mit Nichtradikalen leicht reagiert, da die entsprechende Spin-Restriktion aufgehoben ist ($\text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$). Einen wichtigen, nicht enzymatischen Abbauweg von H_2O_2 in Anwesenheit von zweiwertigem Fe stellt die Haber-Weiss-Reaktion dar ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}(\text{Chelat})^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot + \text{Fe}(\text{Chelat})^{3+}$). Die schädigenden Wirkungen von H_2O_2 auf die DNA sowie die Oxidation von Proteinen und Fettsäuren werden vermutlich in den meisten Fällen über

OH[•] vermittelt, und die Oxidation essentieller SH-Gruppen am aktiven Zentrum von Enzymen spielt vermutlich eine entscheidende Rolle, wie für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen [BRODIE 1987].

Da Epithelzellen kaum als Quelle von H₂O₂ in Frage kommen, wird der Hauptanteil des O₂^{•-} - und somit vermutlich auch des exhaliierten H₂O₂ - in der Lunge von Phagozyten erzeugt. Neben Neutrophilen sind dies vor allem Makrophagen und Eosinophile [BUSSE 1989]. Die Peroxidase der Eosinophilen verwendet anstelle des abundanten Cl⁻ (140 mM) das sehr viel seltenere Br⁻ (20-100 µM), um HOBr zu erzeugen, das dann mit O₂^{•-} reagieren kann. Darüber hinaus können Mastzellen und Basophile O₂^{•-} freisetzen [HENDERSON 1978], insbesondere nach Stimulation über IgE bzw. FcεRI-Rezeptoren [YOSHIMARU 2002]. H₂O₂ kann die Ausschüttung von Histamin bewirken [OGASAWARA 1986], doch steht dahin, ob dieser Effekt bei physiologischen Konzentrationen von H₂O₂ relevant ist [PEDEN 1994]. Die durch Allergenbindung ausgelöste Histaminausschüttung durch Mastzellen kann indirekt zur Produktion von H₂O₂ beitragen, da Eosinophile nach Stimulation mit Histamin vermehrt O₂^{•-} freisetzen [PINCUS 1982]. Andererseits hemmt Histamin die Freisetzung von O₂^{•-} aus Makrophagen [AZUMA 2001]. Diese Befunde lassen eine komplexe Beziehung zwischen allergischen Reaktionen und H₂O₂ vermuten, die für die Interaktion von Ozon und Allergen von Bedeutung ist (vgl. 1.3).

Beim mittelschweren oder schweren Asthma werden Neutrophile, neben Eosinophilen, als Mitverursacher angeführt, da sie in erhöhter Zahl und Aktivität auftreten. So fand sich eine Beziehung zwischen der Konzentration des ausgeatmeten H₂O₂ und der Aktivierbarkeit von Neutrophilen des peripheren Bluts durch Stimulation mit N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) [ANTCZAK 1999]. Dies wurde anhand des intrazellulären Ca²⁺-Signals verifiziert, über die Aktivität der NADPH-Oxidase mit der Erzeugung des Superoxid-Anion-Radikals und über SOD (s.o.) mit H₂O₂ in Verbindung gebracht. Nach gängiger Meinung sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen jedoch vor allem bei der COPD zentral am Krankheitsgeschehen beteiligt [JÖRRES 1997a]. Entsprechend wurde die Konzentration des ausgeatmeten H₂O₂ bei dieser Erkrankung erhöht gefunden (s.o.).

Die genannten Daten lassen vermuten, dass H₂O₂ möglicherweise wertvolle und von NO unabhängige Information über eine Atemwegsentzündung zu liefern vermag. Um so mehr stellt sich die Frage nach dem Ort innerhalb der Lunge, von dem das ausgeatmete H₂O₂

stammt. Führt man es hauptsächlich auf die Bronchien zurück, so würde man neben Makrophagen neutrophile Granulozyten sowie Eosinophile als primäre Produzenten vermuten. Weist man es hingegen der alveolären Region zu, würde man primär Alveolarmakrophagen als Quelle ansetzen. Im Vergleich dazu ist beim NO die Lage klarer, da die vermutete primär bronchiale Genese des NO beim Asthma bronchiale der primär bronchialen Entzündung korrespondiert. Doch werden auch beim Asthma periphere Prozesse diskutiert [KRAFT 1999]. Angesichts der Unsicherheiten bezüglich Art und Umfang pulmonaler Entzündungsprozesse dürfte die Lokalisierung der Entstehung des ausgeatmeten H₂O₂ einen Fortschritt darstellen.

1.3 Ozon und Allergen als pro-inflammatorische Stimuli

Aus epidemiologischen Untersuchungen sind Assoziationen zwischen der Konzentration von Ozon (O₃) in der Außenluft und asthmatischen Symptomen bzw. einer vermehrten Zahl von Notaufnahmen wegen Atemwegsbeschwerden bekannt [BASCOM 1996, BURNETT 1997]. Diese Effekte treten typischerweise zeitlich verzögert auf, als Hinweis darauf, dass entzündliche Prozesse in Gang gesetzt werden, die sodann eine Atemwegsreaktion auslösen.

Allergene sind neben Atemwegsinfekten die Hauptkandidaten für die Verstärkung einer Ozonreaktion, welche *per se* noch nicht zu klinisch bedenklichen Effekten führen würde. Messungen von Markern der Entzündung in der Nasenspülflüssigkeit nach experimenteller [PEDEN 1995] oder umweltbedingter [HILTERMANN 1997] Exposition gegenüber Ozon und Allergen stehen im Einklang mit dieser Hypothese. Ozon kann die funktionelle Antwort auf ein Allergen beim allergischen Asthma [JÖRRES 1996, JENKINS 1999] und der allergischen Rhinitis [JÖRRES 1996] verstärken, wenn die Probanden mäßiger körperlicher Belastung und Konzentrationen >200 ppb ausgesetzt sind, nicht jedoch bei niedrigeren Werten oder unter Ruhebedingungen [BALL 1996, HANANIA 1998]. Niedrigere Konzentrationen scheinen nur unter extremen Belastungen wirksam zu werden [KEHRL 1999].

Die wiederholte Einatmung von Ozon in Konzentrationen ≥200 ppb führt zu einer graduellen Abnahme der Lungenfunktionsantwort [FOLINSBEE 1994, JÖRRES 2000b] sowie der zellulären und biochemischen Antwort [CHRISTIAN 1998, JÖRRES 2000b, HOLZ 2001], jedoch persistieren einige Marker der Zellschädigung und die entzündliche Reaktion der Atemwegschleimhaut scheint bei wiederholter Exposition erst in Gang zu kommen [JÖRRES 2000b]. Demzufolge ist fraglich, ob die als “Adaptation” oder “Toleranzentwicklung” bezeichnete

Reduktion der funktionellen Antwort einen gelungenen Abwehrprozeß signalisiert. Ebenso ist unklar, ob die wiederholte Ozonexposition auch bei niedrigen Konzentrationen aufgrund einer verdeckten entzündlichen Antwort zu einer Änderung der bronchialen Allergenantwort führen kann. Eine mögliche Verstärkung dieser Antwort hätte Implikationen für die Einschätzung der von Ozon ausgehenden Gefährdung und könnte die bislang unerklärte Wirkung von Ozon auf den klinischen Zustand von Asthmatikern erklären.

Die entzündliche Antwort auf Ozon geht mit einer Neutrophilie einher [vgl. JÖRRES 2000b], deren Stärke unabhängig von der Lungenfunktionsantwort ist und eine individuell reproduzierbare Kenngröße darstellt [HOLZ 1999]. Die Reaktion wird vermutlich teilweise über Interleukin-8 (IL-8) vermittelt, dessen Konzentration im Sputum [HOLZ 1999] und der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) ansteigt [JÖRRES 2000b]. IL-8 seinerseits wird über DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, NF-IL-6 und AP-1 induziert [JASPERS 1997]. Neutrophile treten ebenfalls bei Allergenreaktionen in vermehrter Zahl auf und sind in der Lage, ROS zu erzeugen. Diese werden zwar auch von anderen Phagozyten produziert (vgl. 1.2), doch stellen Neutrophile unter den Bedingungen akuter oxidativer Belastung vermutlich die Hauptquelle dar [vgl. JÖRRES 1997a].

Da das eingeatmete Ozon sowohl in den großen Atemwegen als auch der Lungenperipherie absorbiert wird [GERRITY 1988], sollte die Aktivierung Neutrophiler sowohl in den Alveolen als auch den Bronchien eintreten. Allerdings fallen die ozoninduzierten Änderungen der bronchialen Spülflüssigkeit (BW, bronchial wash) in der Regel stärker aus als diejenigen der BALF. Dies spricht ebenso wie die Tatsache einer durch Ozon verstärkbaren Allergenreaktion [JÖRRES 1996] für eine bronchiale Wirkung von Ozon, im Gegensatz zu der Meinung, aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit seien vornehmlich periphere Effekte zu erwarten. Letzteres mag für chronische Expositionen relevant sein [BARR 1988].

Ozon erzeugt im Bronchialsystem eine Vielzahl chemischer Verbindungen, unter denen die Oxidationsprodukte von Fettsäuren von vorrangiger Bedeutung sind [STEINBERG 1990, LEIKAUF 1993 und 1995b, MADDEN 1993]. Ihre hohe Reaktivität lässt diese Produkte als Hauptursache der zellulären Effekte erscheinen [PRYOR 1992]. Es werden sowohl Aldehyde als auch H_2O_2 [PRYOR 1991a] erzeugt, die beispielsweise die Lyse von Erythrozyten hervorrufen können [PRYOR 1991b]. Über die zytotoxischen Effekte hinaus wird die Produktion von Entzündungsmediatoren stimuliert [LEIKAUF 1995a]. Ozoninduzierte Aldehyde und Hydroxy-

Hydroperoxide sind in der Lage, die Eicosanoid-Produktion bronchialer Epithelzellen zu steigern [LEIKAUF 1993, 1995b]; hierbei sind Hydroxy-Hydroperoxide noch wirksamer als H_2O_2 . H_2O_2 wird über Hydroxy-Hydroperoxide erzeugt, und etwa 50 % der Sauerstoffatome in ozongenerierten Aldehyden ebenso wie beide Sauerstoffatome in H_2O_2 stammen direkt aus Ozon [SANTROCK 1992].

Allerdings scheinen die toxischen Effekte von Ozon auf Epithelzellen *in vitro* nicht primär durch H_2O_2 oder das Hydroxyl-Radikal OH^\cdot vermittelt zu werden [GABRIELSON 1994], obwohl OH^\cdot (und nicht H_2O_2 oder $O_2^{\cdot-}$) als Hauptprodukt der Ozonbegasung gefunden wurde [CHEN 1997]. Die Schäden am Atemwegsepithel *in vivo* bedürfen möglicherweise neutrophiler Granulozyten, wie im Zusammenhang mit H_2O_2 *in vitro* gezeigt [MCDONALD 1999]. Alveolarmakrophagen ozonexponierter Raucher zeigen eine erhöhte Produktion von $O_2^{\cdot-}$ (und damit möglicherweise H_2O_2), da sie zu einer gesteigerten Antwort disponiert sind [VOTER 2001]. Der ozoninduzierte Stress kann das antioxidative Abwehrsystem an seine Grenzen führen, wie durch protektive Effekte von Antioxidantien nahegelegt wird [BHALLA 1994]; diese können sogar zu einer Reduktion der Lungenfunktionsantwort führen [SAMET 2001]. Als Indikator einer Ozonbelastung in der BALF wurde Orthotyrosin verwandt [JÖRRES 2000b], alternativ wurde der Nachweis der Hydroxylierung von 5-Aminosalizylsäure vorgeschlagen [KUMARATHASAN 2001]. Die Rolle von NO und NOS in der Ozonantwort ist unklar, da knock-out-Mäuse für iNOS einerseits eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Ozon aufwiesen [KENYON 2002], andererseits eine Protektion gegenüber ozoninduzierten Lungenschäden zeigten [FAKHRZADEH 2002].

Da eine enge Kopplung zwischen allergischer Reaktion, eosinophiler Entzündung und NO-Produktion besteht und das exhalierte NO vorwiegend aus den Bronchien stammt (vgl. 4.1), erscheint es sinnvoll, NO nach kombinierter Einatmung von Ozon und Allergenen zu messen, um Effekte vom Typ des allergischen Asthma auch in Abwesenheit funktioneller Änderungen zu detektieren. Andererseits scheint als Marker des ozoninduzierten oxidativen Stress H_2O_2 im Atemkondensat sinnvoll, zumal es ebenfalls dem bronchialen Kompartiment zuzuordnen ist (vgl. 4.2).

1.4 Corticosteroide als anti-inflammatorische Intervention

Die effektivste anti-entzündliche Therapie beim Asthma bronchiale stellen Glucocorticoide dar. Hierbei kommt den inhalierbaren Präparaten die Hauptrolle zu, da sie wesentlich geringere Nebenwirkungen als systemische Steroide zeigen und die lokale Applikation bei der Mehrzahl der Patienten ausreicht, Verbesserungen bis hin zur weitgehenden Normalisierung zu erreichen. Zwei Faktoren haben in den letzten Jahren die Entwicklung dieser Applikationsform vorangetrieben. Zum einen haben die Vereinbarungen über die Elimination Fluorchlorkohlenwasserstoff(FCKW)-haltiger Treibgase es notwendig gemacht, die meisten Formulierungen inhalativer Steroide durch solche zu ersetzen, die ohne FCKW auskommen. Zum zweiten löste die Tatsache, dass konventionelle Dosieraerosole nur <20 % der abgegebenen Dosis in die Lunge verbringen, Bestrebungen aus, diesen Anteil zu vergrößern.

Diese Bestrebungen waren verknüpft mit der Frage, wo die Corticosteroide vorzugsweise deponiert werden müssten, um eine optimale Wirkung zu entfalten. Neuere Daten legen nahe, dass beim Asthma bronchiale die eosinophile Entzündung nicht auf die großen Atemwege beschränkt ist, sondern die Lungenperipherie mitumfasst [KRAFT 1999]. Auch verweisen die Analyse sog. „Fluss-Volumen-Kurven“ und alveoläre Kathetermessungen am Tier auf die zentrale Rolle der kleinen Atemwege, und der Beginn von Atemwegserkrankungen scheint oft in den kleinen, d.h. peripheren Atemwegen lokalisiert. Peripher deponierte, mittels feiner Aerosole getragene Steroide, mit denen sich die Entzündung der Lungenperipherie gezielt beeinflussen lässt, stehen inzwischen zur Verfügung und wurden in dieser Untersuchung eingesetzt.

Corticosteroide wirken sehr effizient auf die eosinophile Entzündung und NO-Produktion [KHARITONOV 2001]. Letzteres äußert sich in einer Verringerung der bei Asthmatikern erhöhten und über den Transkriptionsfaktor STAT-1 vermittelten Expression von iNOS im bronchialen Epithel [GUO 2000, REDINGTON 2001]. NF-κB scheint an der Abregulation der iNOS beteiligt [BARNES 1997, HANCOX 1999, TOGA 2001], doch nur für einen Teil der Wirkung verantwortlich zu sein [NEWTON 1998]. Auch waren bronchiale Epithelzellen von Asthmatikern insensitiv gegenüber Steroiden, sobald sie IL-1 ausgesetzt waren, möglicherweise durch eine Hemmung der Produktion von GM-CSF [DONNELLY 2002]. Die transkriptionalen regulatorischen Effekte von Corticosteroiden werden über zytosolische Glucocorticoidrezeptoren (GR), ihre Translokation in den Kern und die Bindung an spezifische Motive

der DNA (GRE) bewirkt [ALMAWI 2002]. Der GR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der in zwei Formen existiert [YUDT 2001], und GRE finden sich in den Promotorregionen vieler Zytokine [BRATTSAND 1996, PARRELLI 1998] sowie des Gens für den β_2 -adrenergen Rezeptor [CORNETT 1998]. Die post-transkriptionalen Effekte beruhen auf der Inhibition von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 [BRATTSAND 1996], möglicherweise unter Einbeziehung inhibitorischer Faktoren wie I κ B [NEWTON 1998]. Posttranskriptionale Effekte werden ferner durch Änderung von T-Zell-Subtypen oder immunmodulatorische Zytokine bewirkt [ALMAWI 2002]. Am Herzen wurde eine akute Stimulation der Phosphatidylinositol-3-kinase und der Proteinkinase Akt beschrieben, die eine Aktivierung der eNOS, gesteigerte NO-Produktion und Vasodilatation in kurzer Zeit bewirkte [HAFEZIMOGHADAM 2002]. Über die Verteilung der NOS entlang des Bronchialsystems, die Hemmbarkeit durch Steroide und die relative Bedeutung transkriptionaler versus nicht-transkriptionaler Mechanismen ist nichts bekannt. Um so interessanter erscheinen methodologische Ansätze, die die lokale Modulierbarkeit der NO-Produktion zu messen erlauben.

Aufgrund der starken Wirkung von Corticosteroiden auf die NO-Produktion sollte ein peripher im Vergleich zu einem zentral deponierten Steroid die lokale Produktion unterschiedlich beeinflussen. Insofern als die NO-assoziierte Entzündung beim Asthmatiker weit in die kleinen Atemwege reicht, sollte ein peripher deponiertes Steroid die NO-Produktion in diesen Atemwegen reduzieren und die „Tiefe“ der NO-assoziierten Atemwegsentzündung bzw. NO-Produktion abnehmen. Daher scheint es lohnend, Verfahren zu untersuchen, welche die Anteile der großen und kleinen Atemwege am ausgeatmeten NO nicht invasiv abzuschätzen erlauben.

2 Problemstellung

Den Untersuchungen lag das Ziel zugrunde, die Bedeutung der Marker NO und H₂O₂ in der Ausatemluft zu verstehen. Dies führte zunächst zu einer Analyse der Bedingungen, unter denen flüchtige Marker wie NO in die Ausatemluft gelangen, und insbesondere ihrer möglichen Entstehungsorte innerhalb der Lunge: Bronchien oder Alveolen. Hierbei war die gesuchte Information allein aus den gemessenen NO-Signalen zu gewinnen. Ziel der ersten Untersuchung war es somit, ein Modell des Transports von NO in der Lunge auszuarbeiten, dieses bezüglich seiner Vorhersagekraft zu prüfen, durch Hinzufügung zusätzlicher Komponenten so weit als möglich den realen Verhältnissen anzupassen, sowie diese Verfeinerungen auf ihre Konsequenzen hin zu analysieren. Das Hauptaugenmerk lag darauf, die Abhängigkeit der NO-Konzentration von der Ausatemrate zu erklären und diese Erklärung für Rückschlüsse auf die Entstehung von NO in der Lunge zu nutzen. Die Gültigkeit des Modells sollte durch vergleichende Messungen an Gesunden und Patienten mit Asthma bronchiale überprüft werden.

Da dieser Ansatz beim NO erfolgreich war, wurde sodann versucht, das Konzept auf H₂O₂ anzuwenden. Im Vorfeld war klar, dass die Analyse in Ermangelung von on-line-Messmöglichkeiten limitiert sein musste, doch erschien es zumindest möglich, das für NO entwickelte Kriterium der Flussabhängigkeit als eines Indikators der bronchialen Entstehung zu prüfen. Somit bestand die Aufgabe darin zu klären, ob die Konzentration des ausgeatmeten H₂O₂ von der Ausatemrate abhängt und diese Abhängigkeit von derselben Art ist, wie sie durch das NO-Transportmodell vorhergesagt wird. Zu diesem Zweck sollten gesunde Probanden und solche mit einer leichtgradigen Atemwegserkrankung untersucht werden, um durch den klinischen Zustand bedingte Schwankungen der H₂O₂-Produktion zu minimieren. Wiederholte Messungen bei definierten Flussraten sollten fernerhin dazu dienen, die Variabilität unter standardisierten Bedingungen zu bestimmen. Durch einen Vergleich der Variabilität mit der Flussabhängigkeit war beabsichtigt, eine Entscheidung darüber zu treffen zu können, ob die Flussabhängigkeit bei praktischen Anwendungen berücksichtigt werden muss.

Nachdem geklärt war, dass das ausgeatmete NO und H₂O₂ vorwiegend aus den Bronchien stammen, erschienen diese Marker geeignet zum Monitoring bronchialer inflammatorischer Prozesse. Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass Ozon eine neutrophile und

Allergen eine eosinophile Entzündung der Bronchien hervorruft; hierbei schienen Neutrophile primär mit Oxidantien, Eosinophile mit NO assoziierbar. Folglich wurden NO und H₂O₂ nach separater oder kombinierter Einatmung von Ozon und Allergen gemessen, um differentielle Effekte beider Stimuli und die mögliche Verstärkung der Allergenreaktion durch Ozon zu erfassen. Sowohl Probanden mit allergischem Asthma bronchiale als auch solche mit allergischer Rhinitis sollten untersucht werden, um ein breites Spektrum der Reaktionsfähigkeit abzudecken.

Die Analyse der Daten ergab, dass pro-inflammatorische Effekte auftreten, jedoch schwer zu interpretieren sind, da die Konzentrationen durch gleichzeitige Änderungen funktioneller Variablen beeinflusst werden. Interventionen, die unterschiedliche (anti-)inflammatorische Effekte ohne wesentliche Unterschiede funktioneller Variablen hervorrufen, sollten eher erlauben, differentielle Effekte zu detektieren. Folglich wurde unter Einsatz neuentwickelter, zentral oder peripher deponierter Corticosteroid-Aerosole versucht, die regionale Modulation der NO-Produktion zu messen. Auf diese Weise sollte das oben entwickelte NO-Transportmodell überprüft werden. Im Vordergrund stand die Frage, ob mittels der Methode der NO-Stufenantwort die NO-Produktion in den Atemwegen nicht nur quantifizierbar, sondern auch lokalisierbar war. Um Probleme durch klinische Instabilität zu vermeiden, sollten zunächst Probanden mit einem leichtgradigen Asthma untersucht werden. Da sich hierbei Tendenzen in Richtung der erwarteten Effekte ergaben, wurden sodann Probanden mit schwerer ausgeprägtem Asthma unter Verwendung einer höheren Steroiddosis untersucht, um möglicherweise größere Effekte auszulösen.

3 Material und Methoden

3.1 Durchführung der Messungen

3.1.1 Messung des ausgeatmeten NO

Der in 4.1 verwandte apparative Aufbau enthielt ein aus Acrylglas gefertigtes Zweiwegeventil großen Querschnitts, welches Ausatmung und Einatmung durch je ein Einwegeventil in jedem Schenkel trennte (Jaeger GmbH, Würzburg). Der Ausatemschenkel besaß einen Anschluss für die Druckmessung und einen weiteren für die Probenleitung des NO-Analysators. Der Einatemschenkel war über ein zweites inspiratorisch öffnendes Ventil und einen Absperrhahn mit einem Vorratsbeutel verbunden, der die einzuatmende Luft enthielt. Die inspirierte Luft war frei von NO (Konzentration < 1 ppb). Das zweite Ventil in der Einatemleitung diente der zusätzlichen Abdichtung, damit während der Ausatemmanöver keine Luft durch Leckagen im Einatemschenkel verlorengehen konnte.

Der Ausatemschenkel besaß einen Adapter, über den verschiedenartige Widerstände bzw. die Schlauchleitung einer Motorpumpe angeschlossen werden konnten (s.u.). Die Mundstücke waren aus Silikon gefertigt und wiesen ringsum eine lappenförmige Verbreiterung auf, um den dichten Abschluss zu erleichtern. Stets wurden Mundstücke gleicher Größe verwandt, um die Signallaufzeiten konstant zu halten, und alle Teile waren so genormt und ggf. modifiziert, dass das System konstante Charakteristika aufwies; dieses Erfordernis war insbesondere für die Volumenmessungen von Bedeutung (s.u.).

Die expiratorischen Widerstände hatten die Form von Düsen und waren aus rostfreiem Stahl oder Kupfer gefertigt [LOHMANN 1998]. Bei 20 mbar Druck entsprachen sie Flussraten von 33, 48, 69, 140 und 207 mL/s. Ihre Fluss-Druck-Kennlinien waren wegen der kleinen Durchlassquerschnitte nichtlinear. Jede der Kennlinien wurde mit Hilfe eines Wasserspirometers (Typ VT, Mijhardt, Zeist, Holland) sowie eines elektronischen "bubble flow meter" (Optiflow 650, Humonics, Fairfield, Ca., USA) bestimmt und zur Berechnung der aktuellen mittleren Flussrate aus dem Drucksignal herangezogen [SONNEMANN 1997, LOHMANN 1998]. Das Drucksignal wurde durch einen elektronischen Druckaufnehmer (GDH 12 A, Greisinger electronic, Regenstauf) mit einem Differenzdruckbereich von 0-200 mbar aufgenommen,

dessen Signal zusammen mit einer 20 mbar-Referenzlinie auf dem Bildschirm eines Computers dargestellt wurde [SONNEMANN 1997].

Die Konzentration des expirierten NO wurde kontinuierlich gemessen. An einer volumetrisch definierten Stelle zwischen Mundstück und expiratorischem Widerstand befand sich ein Teflonschlauch, durch den die Luft zu einem schnellanzeigenden NO-Analysator geleitet wurde (NOA 280 Nitric Oxide Analyzer, Sievers Instruments Inc., Boulder, Co., USA). Am Einlass des Instruments befand sich ein Gegenstromtrockner. Das analoge, ungeglättete Ausgangssignal wurde über einen 8-Kanal-Schreiber (R-58, Rikadenki GmbH, Freiburg) mit eingebautem Analog-Digital-Wandler ebenso wie das Signal des Druckwandlers von einem Computer aufgenommen und mittels eines laboreigenen Programms auf dem Bildschirm dargestellt und analysiert [SONNEMANN 1997]. Der NO-Analysator wurde regelmäßig mit Hilfe zertifizierter Eichgase (Messer-Griesheim GmbH, Krefeld) kontrolliert, die NO in Konzentrationen von 450-500 ppb in reinem Stickstoff enthielten.

Die Messung bei konstanten Flussraten folgte im wesentlichen der von SILKOFF et al. [1997] vorgeschlagenen und in Empfehlungen [ATS 1999] inkorporierten Methode. Die Probanden atmeten gegen einen positiven Druck, um einen Verschluss des Gaumensegels zu bewirken. Auf diese Weise wurde eine Kontamination der Ausatemluft durch in der Nase bzw. den Nasennebenhöhlen produziertes NO ausgeschlossen, ohne mit für den Probanden unangenehmen Maßnahmen wie einer Absaugung verbunden zu sein [KIRSTEN 1998].

Vor Beginn der Messungen wurden die Probanden instruiert, tief durch die Nase auszuatmen, um möglichst viel nasales NO zu eliminieren. Sodann umfassten sie das Mundstück und vollführten bei mit den Fingern verschlossener Nase eine tiefe Einatmung durch den Mund. Am Ende der Einatmung gaben sie die Nase frei und atmeten gegen den expiratorischen Widerstand aus. Sie bemühten sich hierbei, den Druck von 20 mbar über Umgebungsdruck möglichst rasch aufzubauen und genau beizubehalten. Durch Austausch der Widerstände wurden bei konstantem Druck unterschiedliche Flussraten erzielt. Als niedrigste Rate konnten in Einzelfällen ca. 4 mL/s erreicht werden, indem der expiratorische Schenkel völlig verschlossen wurde und allein die Absaugung durch die Pumpe des NO-Analysators aktiv war. Diese arbeitete durch eine kritische Düse unabhängig von den Druckschwankungen, die der Proband erzeugte.

NO-Stufenantworten wurden gemessen, indem der Proband nach einer tiefen Einatmung das Mundstück umfasste, bei einer nominellen Flussrate von 48 mL/s einen Druck von 20 mbar aufbaute und nach Stabilisierung des NO-Signals willkürlich und so genau und rasch wie möglich den Druck auf ca. 10 mbar senkte. Da Abwärtssprünge sich als besser kontrollierbar erwiesen als Aufwärtssprünge und theoretische Vorteile aufwiesen (siehe 4.1.1), wurden nur solche ausgewertet (vgl. Abb. 4.4).

Die korrekte zeitliche Zuordnung zwischen Fluss- und NO-Signal wurde wie folgt erreicht. Durch Integration des Volumenstromes über die Zeit wurde eine expiratorische Volumenkurve errechnet, welche die unvermeidlichen Fluktuationen des Atemflusses während der Ausatmung glättete. Diese Kurve war streng monoton zunehmend, da der Ausatemstrom immer ≥ 0 war. Für jeden Zeitpunkt wurde sodann derjenige vorherige Zeitpunkt ermittelt, der dem aktuellen Volumen minus dem Volumen des gesamten Totraumes, V_d , entsprach. Dieser Zeitpunkt stellte diejenige Zeit dar, zu der das im Augenblick gemessene NO die bronchiale Röhre verlassen haben musste. Zum Zwecke dieser Korrektur wurde der Gesamttotraum V_d versuchsweise zu 150 mL angenommen, als Summe des apparativen Totraumes, $V_{d,app}$, von 37 mL und eines hypothetischen anatomischen Totraumes, $V_{d,anat}$. Es sei bemerkt, dass die für das Volumen eingesetzten Werte unkritisch waren, da die Fluktuationen der Flussrate über die Zeit durchweg gering waren.

Die Differenz der genannten beiden Zeitpunkte plus der Antwortzeit (response time) des NO-Analysators, gemessen vom Ort der Probennahme im Mundstück, stellten diejenige Zeitspanne dar, um die das vom Computer aufgenommene NO-Signal bei der Anzeige verzögert wurde, nachdem es die Atemwege proximal verlassen hatte. Die Antwortzeit wurde als Zeitintervall definiert, das benötigt wurde, um 90 % des Endwertes bei einer sprungförmigen Änderung der NO-Konzentration am Ort der Probennahme zu erzielen; sie betrug 2,1 s.

Unter Zuhilfenahme des Volumensignals wurden die ersten 250 mL der Ausatemluft verworfen, um Transienten vor Erreichung eines steady-state auszuschließen. Die Konzentrations-Zeit-Kurven zeigten, daß diese von subjektiver Willkür freie Vorgehensweise ausreichte, um Plateauwerte des exhalierten NO zu erreichen (vgl. Abb. 4 in [SILKOFF 1997]). Zum Zwecke der Mittelung wurden die NO-Konzentrationswerte volumetrisch gewichtet, wobei die entsprechenden zeitverschobenen Flusswerte als Gewichte dienten. Bei jedem Probanden erfolgten zwischen 6 und 15 Messungen.

Die Modellanalyse erfolgte anhand der NO-Werte, die nach Erreichen des Plateaus gemittelt wurden. Die korrespondierende Flussrate wurde als Mittelwert über das entsprechende Zeitintervall errechnet. Das NO-Transportmodell (Glg. 1) wurde an die Datenpaare von Konzentration vs. Flussrate mittels eines iterativen Verfahrens angepasst, das eine Implementierung des nichtlinearen Algorithmus von Levenberg-Marquardt-Nash darstellte [NASH 1987]. Gütekriterium war dasjenige der kleinsten Quadrate. Der Wert von F_{ap} wurde als nichtnegativ gefordert. Die Anpassung erfolgte immer mit Originaldaten von NO vs. Fluss (vgl. Abb. 4.3A), da die doppelt-logarithmische Auftragung (vgl. Abb. 4.3B) praktisch identische Schätzwerte der drei Parameter F_{wc} , F_{ap} und K_{awc} lieferte.

Um die numerische Stabilität angesichts des begrenzten Datensatzes zu erhöhen, wurden ebenfalls zweiparametrische Anpassungen durchgeführt; hierzu wurde der Wert von F_{ap} in Glg. (1) auf Null gesetzt. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion des asymptotischen Standardfehlers der Parameterschätzwerte. Da in der dreiparametrischen Anpassung die Werte von F_{ap} in aller Regel nahe Null lagen und klein gegenüber F_{wc} waren, erschien es gerechtfertigt, F_{ap} gleich Null zu setzen. Aus diesem Grunde wurden die im Ergebnisteil dargestellten Werte von F_{wc} und K_{awc} mit $F_{ap} = 0$ mittels Glg. (1) gewonnen. Eine lineare Approximation in einem doppelt-logarithmischen Graphen [vgl. SILKOFF 1997] war nicht anwendbar, da sie nur zwei (Steigung und Achsenabschnitt) statt der erforderlichen drei Parameter enthält. Ferner zeigt die Analyse von Glg. (1) mit $F_{ap} = 0$, dass Steigung und Achsenabschnitt vom gewählten Bereich der Flussrate abhängen. Darin äußert sich die Tatsache, dass der für die Parameterschätzung essentielle Bereich der niedrigen Flussraten in der linearen Auswertung entfallen muss (vgl. Abb. 4.3B).

Schätzwerte der Stufenantworten wurden erhalten mit Hilfe eines iterativen Kleinsten-Quadrate-Algorithmus, der die optimale lineare Regressionslinie zwischen probeweise gewählten und verschobenen Eckpunkten suchte sowie beste Schätzwerte für das vorangehende und folgende Plateau (vgl. Abb. 4.4). Auf analoge Weise wurde der Zeitpunkt der willkürlichen plötzlichen Flussänderung aus dem expiratorischen Volumensignal anhand des Knickpunktes der Zunahme des ausgeatmeten Volumens mit der Zeit bestimmt. Die Volumina des Modells (V_c und V_d) wurden sodann als Produkte der entsprechenden Zeitintervalle (T_{delay} und T_{trans}) mit den korrespondierenden mittleren Flussraten errechnet.

Der zur Bestimmung der Wirkung von Ozon und Allergen auf NO (vgl. 4.3) verwandte Messaufbau war dem vorstehend dargestellten ähnlich. Die Kontrolle des Druckes erfolgte

jedoch mittels eines elektronischen Aufnehmers GDH 07 AN (Greisinger electronic, Regenstauf), dessen Ergebnis inklusive des Sollwertes auf einem PC-Bildschirm angezeigt wurde [LOHMANN 1998, MIDANI 1998]. Die Widerstände waren so gewählt, dass Flussraten zwischen 6 und 200 mL/s bei 20 mbar erzielt werden konnten und in jedem Fall der Bereich um 50-100 mL/s abgedeckt wurde. Die Eichung des NO-Analysators wurde nach jeder Messung überprüft und ggf. die Werte korrigiert, da sich ein temperaturabhängiger Tagesgang herausgestellt hatte. Druck- und analoges, ungeglättetes NO-Signal wurden nicht indirekt über einen Schreiber (s.o.), sondern direkt mittels A/D-Wandler (Advantech PCL-818, Spectra Computersysteme, Echtingen) über ein Anschlussboard (PCLD-780) von einem Computer aufgenommen, graphisch dargestellt und numerisch verarbeitet [LOHMANN 1998, MIDANI 1998]. Unter Anwendung des NO-Transportmodells in der 2-Parameter-Version (s.o.) wurden die NO-Konzentrationen bei 50 mL/s durch Interpolation bestimmt [JÖRRES 2000a]. Die Unterschiede zwischen dem 2- und dem 3-Parameter-Modell, das die alveoläre NO-Konzentration einschloß, waren durchwegs vernachlässigbar, jedoch sicherte das 2-Parameter-Modell in jedem Fall die Konvergenz des iterativen Schätzverfahrens für die Interpolation.

In der Untersuchung zur Wirkung von Corticosteroiden (vgl. 4.4) fanden zur Messung der NO-Konzentration bei konstanten Ausatemraten der gleiche Aufbau und das gleiche Messprotokoll Verwendung wie vorstehend für 4.3 beschrieben. Das NO-Transportmodell wurde ebenfalls primär verwandt, um akkurate NO-Konzentrationen bei expiratorischen Flussraten von 50 und 100 mL/s durch Interpolation zu gewinnen. Vor den Messungen inhalierten die Probanden im Rahmen des Gesamtablaufs (Prämedikation der Sputuminduktion) 200 µg des β_2 -Adrenozeptor-Agonisten Salbutamol, um eine maximale bronchiale Weitstellung zu bewirken und Artefakte der NO-Messung, die durch eine variable Geometrie des Bronchialsystems bedingt waren, zu minimieren.

Über die Interpolation bei konstanten Flussraten hinaus fand das NO-Modell in 4.4 Anwendung als Basis der Messung von Stufenantworten. Diese erfolgte jedoch, anders als in 4.1, nicht durch willkürliche, schwer zu vollführende Drucksenkungen (s.o.), sondern durch eine externe Flusskontrolle, welche die plötzliche Reduktion des Ausatemflusses übernahm. Dies bot den Vorteil, in stärkerem Maße von der Mitarbeit der Probanden unabhängig zu sein, ein unabdingbares Erfordernis bei einer Untersuchung, die eine große Zahl von Messungen involvierte (s.u.). Weiterhin konnte auf diese Weise ein größerer Sprung in den Flussraten realisiert werden als nur um den Faktor 2. Die größere Änderung der Flussrate sollte eine

größere Änderung der NO-Signalamplitude und somit eine bessere Auflösung ermöglichen. Die Stufenantworten wurden gemessen, indem alternativ zu den expiratorischen Widerständen ein weitleumiger, starrer Schlauch an den Expirationsschenkel angeschlossen wurde. Der Schlauch war mit einer 2L-Präzisionspumpe (Jaeger GmbH, Würzburg) verbunden, die auf einem Brett derart befestigt war, dass ihr Kolben über eine Zahnstange bewegt werden konnte. Die Bewegung wurde von einem Schrittmotor kontrolliert, jedoch war zusätzlich ein aktiver Druck von mindestens 5 mbar seitens des Probanden erforderlich, um den Kolben zu bewegen. Dieser Überdruck war nötig, um auch bei dieser Messung den Verschluss des Gaumensegels zu gewährleisten und nasales NO auszuschließen. Der Schrittmotor wurde von einem zweiten Computer gesteuert, der den Befehl zum Start bzw. zur Umschaltung der Geschwindigkeit vom Messcomputer erhielt (Schrittmotorkarte von Conrad Electronic) [MIDANI 1998].

Zwecks Messung umfasste der Proband nach einer tiefen Einatmung das Mundstück, baute einen Druck >5 mbar auf und bemühte sich, den Druck näherungsweise zu halten. Als Zieldruck wurden in der Regel 14 mbar gewählt, da sich dieser Wert als komfortabel und günstig zur Vermeidung von Artefakten herausgestellt hatte. Doch war ein genaues Einhalten des Druckes nicht erforderlich; einzelne Messungen mit willkürlich schwankenden Drücken belegten, dass die NO-Kurve nicht wesentlich beeinflusst wurde und die externe Flussvorgabe genau arbeitete. Allerdings stellte sich heraus, dass Bewegungen der Zunge vermieden werden mussten, da unterhalb der Zunge NO von anaeroben Bakterien produziert wird und dies die Werte des ausgeatmeten NO verfälschen kann [ZETTERQUIST 1999]. Weiterhin musste der Oberkörper still gehalten werden, da Bewegungen offenbar über die Haltungsänderung zu einer Änderung der Ventilationsverteilung führen konnten.

In Vorabversuchen mit der genannten Steuerung hatte sich ergeben, dass Abwärtsstufen von ca. 90-100 mL/s auf ca. 20-30 mL/s am ehesten konstante Volumenschätzwerte lieferten. Demzufolge war anzunehmen, dass in diesem Bereich sowohl eine mögliche Depletion von NO in der Bronchialschleimhaut (bei hoher Flussrate) als auch eine mögliche Akkumulation (bei niedriger Flussrate) vernachlässigbar waren. Derartige Effekte können zur Verfälschung der Zeitspannen führen, in denen sich ein steady-state einstellt (vgl. 5.4), und damit zu fehlerhaft gemessenen Volumina. Aus diesem Grunde erfolgten die Messungen bei einer initialen Rate von 100 mL/s und einer terminalen Rate von 20 mL/s, um den Maximalbereich der Änderung von NO auszuschöpfen. Die Umschaltung wurde seitens des Bedieners ausge-

löst, wenn die auf dem Bildschirm dargestellte NO-Konzentration einen stabilen Wert zeigte bzw. dieser nach Erfahrung des Untersuchers innerhalb der nächsten 2 Sekunden zu erwarten war. Die Verzögerung von ca. 2 s war durch die Signallaufzeiten zum bzw. innerhalb des NO-Analysators bedingt (s.o.). Die Auswertung erfolgte wiederum durch iterative Anpassung einer stückweise linearen Funktion (s.o.) [MIDANI 1998].

3.1.2 Messung des ausatmeten H_2O_2

Die Probensammlung zur Bestimmung der Flussabhängigkeit (vgl. 4.2) wurde wie folgt vorgenommen. Die Probanden atmeten in gekühlte Teflonschläuche des inneren Durchmessers 10 mm und der Länge 40 cm. Diese befanden sich in Kupferröhren, die in einen ebenfalls aus Kupfer gefertigten, für diesen Zweck im Labor konstruierten Kühler eingebaut waren und von Kühlflüssigkeit umspült wurden. Diese wurde über temperaturisolierte Schläuche geleitet und mit Hilfe eines handelsüblichen Laborkühlers mit Reservoir und Umlaufpumpe (Julabo F34, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) auf eine mittlere (\pm SD) Temperatur von $-13,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$ gekühlt. Zwischen Mundstück und Teflonschläuchen konnten drei verschiedene Widerstände angebracht werden, die aus rostfreiem Stahl und Kupfer (vgl. 3.1.1) gefertigt waren und dazu dienten, bei fest vorgegebenem Druck verschiedene Ausatemraten zu erzielen. Ein System von Acrylglasventilen (Jaeger GmbH, Würzburg) gewährleistete, dass die Luft nur in einer Richtung durch die Teflonröhren streichen konnte. Für jede der Ausatemraten wurde einer der drei vorhandenen Teflonschläuche freigegeben und die anderen mittels Stopfen verschlossen. Zum Ausschluss von Speichelkontaminationen wurde zusätzlich zu H_2O_2 α -Amylase mittels eines klinischen Analysators (COBAS Integra, Roche) im Atemkondensat nachgewiesen [SCHLEISS 2000].

Die Probanden waren angehalten, während der gesamten Ausatemzeit einen Druck von 20 mbar gegenüber dem Umgebungsdruck aufrechtzuerhalten. Der konstante Druck sicherte zum einen die Konstanz der Flussrate, zum anderen die Vergleichbarkeit des Drucks zwischen den Widerständen. Unterschiede dieses Druckes hätten im Prinzip über Änderungen der Belüftung der Lungenkompartimente Unterschiede der Ausatemkonzentration erzeugen können. Ein weiterer erwünschter Effekt des Überdrucks war der Schluss des Gaumensegels, so dass Kontaminationen durch nasale Luft ausgeschlossen waren. Zur Kontrolle der Atmung wurde den Probanden der aktuelle Druck mittels eines elektronischen Aufnehmers (GDH 12 A, Greisinger electronic, Regenstauf; vgl. 3.1.1) laufend angezeigt.

Bei dem Solldruck von 20 mbar erzeugten die drei Widerstände Flussraten von 140, 69 und 48 mL/s. Die Reihenfolge der Messungen wurde zufällig gewählt. Jede Messung umfasste 21 Ausatmungen von 20 s Dauer, entsprechend gesammelten Volumina von 20,1, 29,0 und 58,8 L Luft. Diese experimentelle Vorgehensweise sowie die drei Flussraten wurden gewählt, da Vorversuche diese Anzahl und Dauer der Exhalationen als ausreichend erwiesen hatten, um genügend Atemkondensat für die Analyse zu gewinnen. Ein größerer Bereich von Flussraten war angesichts der Forderungen nach ausreichender Materialmenge sowie noch bewältigbaren Atemmanövern nicht realisierbar. Desweiteren sollten durch die Mittelung über mehrere Exhalationen die unvermeidlichen Schwankungen um die Sollflussrate ausgeglichen werden. Statt das Volumen jeder Ausatmung konstant zu wählen, wurde die Dauer konstant gehalten, um auszuschließen, dass ein möglicher Anstieg der alveolären H_2O_2 -Konzentration über die Zeit fälschlich eine Flussabhängigkeit vorspiegelte. Demgegenüber stand zu erwarten, dass der damit einhergehende, wechselnde Beitrag des mundwärts gelegenen Totraumes der H_2O_2 -Produktion bei niedrigen Flussraten eine Abnahme statt Zunahme der Konzentration bewirkt hätte, entgegen der Hypothese einer Zunahme bei geringerem Fluss. Daher war im Sinne der Hypothesenprüfung das gewählte Verfahren vorzuziehen (vgl. 5.2).

Um die Variabilität der ausgeatmeten H_2O_2 -Konzentration über die Zeit zu bestimmen, wurden die Messungen bei allen Probanden wiederholt. Organisatorische Probleme und Infekte resultierten in einer unterschiedlichen Anzahl (2-5) von Wiederholungen. 3 Probanden nahmen an 2, einer an 3, 10 an 4 und einer an 5 Messungen teil. Der Median des Abstandes zwischen den Messungen betrug 7 Tage, das Minimum 1 Tag und das Maximum 40 Tage.

Unmittelbar nach Gewinnung wurde das Volumen des Atemkondensats bestimmt und ein Aliquot (300 μL) für die Analyse von H_2O_2 genommen. Zu diesem Zweck wurden den Proben Meerrettich-Peroxidase (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Boehringer, Mannheim) and p-Hydroxyphenyllaktat (PHPL) (Endkonzentration 0,04 mM, Sigma, München) hinzugefügt und gemischt [HYSLOP 1984; JÖBSIS 1997]. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, ein stabiles Zwischenprodukt zu erzeugen, das bei -20°C gelagert werden konnte. Vorher erprobte Verfahren erforderten die sofortige Analyse, da selbst bei -196°C eine Degradation innerhalb weniger Stunden eintrat [vgl. DEKHUIJZEN 1996]. Nach dem Auftauen wurden die Proben in einem Fluorometer analysiert (LS 50, Perkin-Elmer, Norwalk, USA; Anregungswellenlänge 295 nm, Emissionswellenlänge 405 nm). Da die Eichkurven unabhängig von der Messung der Proben gewonnen werden mussten, wurde eine mittlere Standardkurve verwandt, um alle

Messungen zu normieren. Aufgrund von Vorversuchen schien dieses Vorgehen eine geringere Streuung zu gewährleisten als die Verwendung unterschiedlicher Kurven. Beispiele von Eichkurven sind in Abb. 3.1 gegeben. Sie umfassten Konzentrationen von 0,015, 0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,5, 1 und 2 μM ; die Nachweisgrenze lag bei 0,062 μM .

Im Einzelnen umfasste die Messung von H_2O_2 folgende Schritte (die Angaben beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von 3 mL Atemkondensat und waren ggf. zu ändern):

- Vorbereitung der Reagenzien und Röhrchen (mit vorgespülten Pipettenspitzen):
 - 4x3 μL Peroxidase (-20°C)
 - 3,0 mL HBSS Puffer (-20°C)
 - 4x25 μL PHPL (-80°C)
 - 60 μL H_2O_2 -Standard (-196°C)
 - Aqua bidest. hochrein
- Reagenzien auftauen lassen
- 1 mL HBSS zur PHPL geben, durchmischen
- 600 μL HBSS zur Peroxidase geben, durchmischen
- 60 μL H_2O_2 -Standard in 3 mL Bidest. hochrein geben, durchmischen
- Kondensat in gefrorenem Zustand aus Teflonschläuchen in steriles Röhrchen schieben, rasch auftauen lassen (hier angenommene Menge 3 mL)
- 100-200 μL für Amylase-Messung
- 6 μL Peroxidase und 50 μL PHPL-Ansatz zu 3 mL Kondensat geben, durchmischen
- 6 μL Peroxidase und 50 μL PHPL-Ansatz zum H_2O_2 -Standard geben, durchmischen
- Exhalat und Standard bei -20°C einfrieren

Für den H_2O_2 -Standard wurde eine Endkonzentration von 2 μM in 3 mL benötigt. Die Stammlsg. von 30 % entsprach 9,8 M.

1:100 verd.	→	98 mM	(I)	10 μL Stammlsg. + 990 μL Bidest. hochrein
1:100 verd.	→	980 μM	(II)	10 μL (I) + 990 μL Bidest. hochrein
		102 μM	(III)	520 μL (II) + 4480 μL Bidest. hochrein

- 100 μL von (III) bei 196°C in sterilen verschraubbaren Cups einfrieren
- 60 μL zu 3 mL Bidest. hochrein für jeden (frischen) Standard

Die Peroxidase wurde in folgender Weise angesetzt:

- Lt. Hersteller sind 100 mg/ml in 3 M NaCl über 1 Jahr bei 4°C stabil.

- 10 mg Portionen in 100 μL 3 M NaCl resuspendieren \rightarrow 100 mg/mL
- Aliquots von 3 μL in 500 μL -Cups vorlegen und bei 4°C lagern
- Bei Gebrauch zu 3 μL Peroxidase 600 μL HBSS zugeben (HBSS bei -20°C gelagert)
- Der Ansatz war so gewählt, dass 6 μL für 3 mL Exhalat ausreichen. Eine Lagerung war für einen Tag bei 4°C möglich.

Statt der in der Literatur verwandten p-Hydroxyphenylelessigsäure (PHPA, Sigma H4377) wurde p-Hydroxyphenyllaktat (Sigma H3253) eingesetzt:

- 33,4 mg in 2 mL HBSS lösen (bei 37°C) \rightarrow 92 mM
- Aliquots von 25 μL bei -80°C lagern
- Zwecks Messung zu 25 μL PHPL 1 mL HBSS zugeben \rightarrow 2,25 mM
- Davon 50 μL pro 3 mL Exhalat verwenden

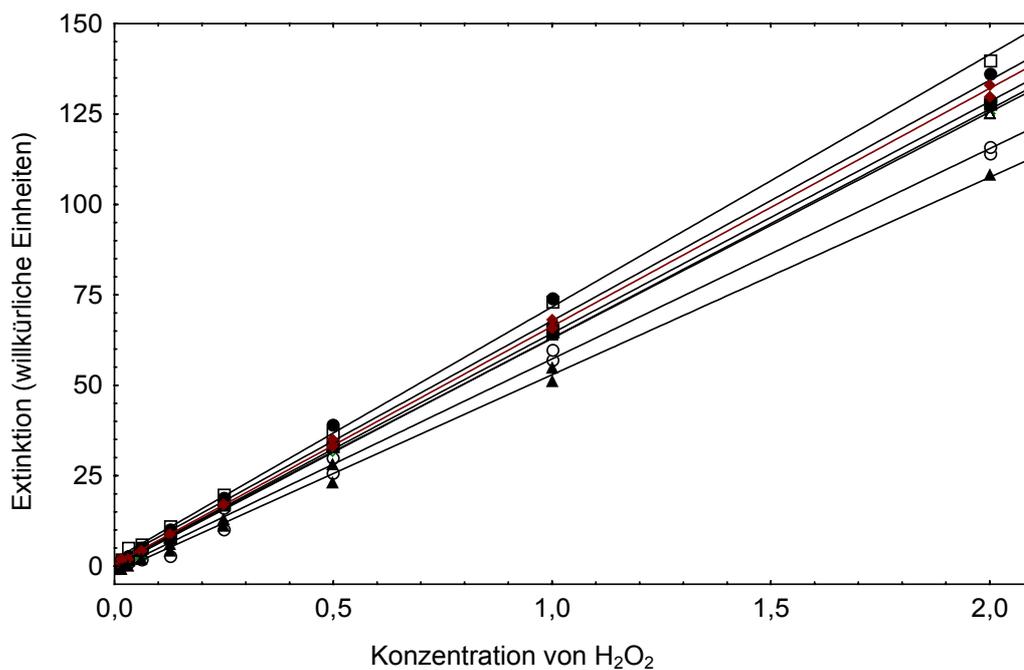


Abbildung 3.1: Beispiele (n=8) von Eichgeraden, deren Mittelwert zur Berechnung der Konzentration des ausgeatmeten H₂O₂ verwandt wurde

In der Untersuchung zur Wirkung von Ozon und Allergen (vgl. 4.3) wurde das gleiche Aggregat verwandt, allerdings ohne expiratorischen Widerstände. Aus den in 5.2 genannten Gründen wurde die zeitaufwendige Messung von H₂O₂ bei verschiedenen Flussraten durch die Sammlung von Atemkondensat während Ruheatmung ersetzt. Diese einfachere und vom

Probanden leichter zu bewältigende Prozedur wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ozon- und Allergeninhalation parallel zur NO-Messung wiederholt, so daß sich der Verlauf beider Marker auch innerhalb eines komplexen Versuchsprotokolls erfassen ließ. Zwei Acrylglasventile (Jaeger GmbH, Würzburg) gewährleisteten, dass die Einatemluft direkt am Mundstück vor den Teflonröhren eingatmet wurde, die Ausatemluft hingegen durch die gekühlten Teflonröhren geleitet wurde; dies wurde dadurch bewirkt, dass sich ein inspiratorisch öffnendes Ventil vor und ein expiratorisch öffnendes Ventil hinter den Teflonschläuchen befand. Um die Ausbeute an Kondensat zu maximieren, wurden jeweils 3 Teflonröhren parallel pro Messung eingesetzt. Die Probanden atmeten für mindestens 10 min unter Ruhebedingungen und die gewonnene Menge an Kondensat lag nach Möglichkeit bei ≥ 3 mL. Der Nachweis von H_2O_2 erfolgte auf die gleiche Weise wie oben beschrieben. Es standen in der Regel größere Mengen an Kondensat als in der vorangegangenen Untersuchung zur Verfügung und die Mengen der Reagenzien wurden entsprechend angepasst.

3.1.3 Einatmung von Ozon und Allergen

Zum Zweck der Ozonexposition (4.3) atmeten die Probanden über ein Mundstück Luft ein, die in einem Mischsystem eigener Konstruktion [JÖRRES 1996, HOLZ 1999, JÖRRES 2000b, HOLZ 2002] erzeugt wurde; dabei trugen sie eine Nasenklemme, um die Atmung durch den Mund zu gewährleisten. Innerhalb des Mischsystems wurde Ozon aus 100 % Sauerstoff erzeugt und mittels Massendurchflussregler unter kontinuierlicher Kontrolle der Konzentration (Model 49, Thermo Environmental Instruments Inc., Franklin, Ma., USA) gefilterter Luft aus der Krankenhausversorgung hinzugefügt. Auf diese Weise wurden Konzentrationen von 125 und 250 ppb Ozon mit Spitzenabweichungen < 5 % erzeugt. Der Ozonanalysator wurde regelmäßig von der Umweltbehörde der Freien und Hansestadt Hamburg kalibriert.

In drei Einschlussuntersuchungen wurden die Ausgangswerte des exhalierten NO und H_2O_2 sowie die Empfindlichkeit gegenüber inhaliertem Allergen ermittelt. Ferner erfolgten ein Haut-Pricktest gegenüber ≥ 20 Allergen (ALK Scherax, Hamburg), eine Blutentnahme zur Bestimmung des Gesamt-IgE und ausgewählter spezifischer IgE-Werte (RAST; CAP-System, Pharmacia, Freiburg) sowie eine Sputuminduktion.

Sodann nahmen die Probanden an vier Tests teil, die in zufälliger Reihenfolge und im Abstand von ≥ 4 Wochen stattfanden. Die Tests umfassten 3 einzelne Expositionen jeweils

gegenüber gefilterter Luft (Kontrolle), 125 und 250 ppb Ozon sowie 4 Expositionen gegenüber 125 ppb Ozon an 4 aufeinanderfolgenden Tagen. Jede Exposition umfasste 3 h intermittierende Belastung (alternierend 15 min Ruhe und 15 min Fahrradfahren). Die Herzschlagfrequenz wurde mittels eines Pulsoximeters (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) überwacht. Unmittelbar nach jeder Exposition wurde das ausgeatmete NO gemessen und Atemkondensat zur Analyse von H₂O₂ gesammelt. Nach 1 h inhalierten die Probanden Methacholinchlorid (Sigma, Deisenhofen) in steigenden Konzentrationen, bis ein Abfall des Einsekundenvolumens (FEV₁) von 15 % erreicht war [JÖRRES 1997b]; die entsprechende, durch Interpolation bestimmte Konzentration ist mit PC₁₅FEV₁ bezeichnet.

20 h nach jeder der einzelnen oder der vierten der aufeinanderfolgenden Expositionen inhalierten die Probanden eine Einzeldosis eines individuell ausgewählten Allergens (ALK Scherax, Hamburg). Das Allergen war aufgrund von Anamnese, Hauttest und IgE als dasjenige gewählt, das die größte Wahrscheinlichkeit bot, die individuell stärkste Reaktion hervorzurufen [vgl. JÖRRES 1996]. Als Einzeldosis wurde die kumulative Dosis gewählt, die bei einer unter stufenweiser Dosiserhöhung durchgeführten Allergenprovokation einen Abfall des FEV₁ um 15 % hervorrief (PD₁₅FEV₁). Trat im Einschlusstest eine geringere Reaktion als 15 % auf, so wurden abhängig vom individuellen Fall 10-50 % der Maximaldosis gewählt, die vom Hersteller des Allergens für inhalative Provokationen empfohlen wurde. Wann immer möglich, wurde für einen Probanden die gleiche Charge von Allergen während der gesamten Untersuchung verwandt, um die Variabilität durch wechselnde Allergenqualität möglichst gering zu halten.

Die Messung des ausgeatmeten NO sowie die Sammlung von Atemkondensat zur Analyse von H₂O₂ erfolgten 1 h nach Allergeninhalation sowie 6 h später. Sodann wurde eine Sputuminduktion durchgeführt, die der Analyse der zellulären Reaktion auf das Allergen diene. Danach wurde die Lungenfunktion für ≥ 1 h im Labor und in der Folge vom Probanden selbst mittels eines transportablen Gerätes (AMOS, Jaeger GmbH) gemessen, um die allergische Spätreaktion zu verfolgen. Die Funktionsmessungen sowie Sputuminduktion und -analyse folgten etablierten Kriterien und Protokollen [QUANJER 1993, JÖRRES 1997, HOLZ 1998 und 1999]. In den Sputumüberständen wurde Laktatdehydrogenase (LDH) als Marker der Zellschädigung gemessen [HOLZ 1999] sowie die Konzentrationen von Mastzell-Tryptase (FEIA; Pharmacia&Upjohn, Freiburg), Histamin (IBL, Hamburg) und Nerve Growth Factor (NGF;

Boehringer Mannheim) mittels ELISA bestimmt; hierzu wurden die Proben mit Hilfe von Gefriertrocknung (Alpha 1-2; Christ, Osterode) 5-fach aufkonzentriert.

Der Medianwert (Interquartile) der Zeitspanne, die zur Komplettierung der Untersuchung bei den einzelnen Probanden benötigt wurde, betrug aufgrund der allergenbedingten Wartezeiten 330 (222; 443) Tage. Die entsprechenden Werte für das Intervall zwischen den Tests waren 42 (31; 75) Tage. Der mittlere Wert (\pm SD) der Ventilation pro Minute und m^2 Körperoberfläche während Belastung betrug 15 ± 3 L/(min \cdot m²), entsprechend einer absoluten Ventilation von $28,6 \pm 6,2$ L/min, und war weder zwischen den Gruppen noch zwischen den Expositionen statistisch verschieden. Dieser Wert zeigte eine mäßige Belastungsintensität an. In ähnlicher Weise wies auch die Ventilationsrate während Ruheatmung keine signifikanten Unterschiede auf; im Mittel betrug der Wert (\pm SD) $8,4 \pm 2,5$ L/min. Analog bestanden keine Unterschiede der Herzschlagfrequenz; die mittleren (\pm SD) Werte lagen bei 83 ± 9 Schlägen/min während Ruhe und bei 119 ± 9 Schlägen/min während Belastung. Diese Daten belegen, dass die Vergleichbarkeit der Expositionen gewährleistet war und die Ergebnisse unter realistischen, im Alltagsleben vorkommenden Bedingungen erhalten wurden.

3.1.4 Inhalation von Corticosteroiden

In der vorliegenden Arbeit wurde das Glucocorticosteroid Beclometason-Dipropionat (BDP) verwandt, das entweder mit einem herkömmlichen FCKW-haltigen Treibgas oder dem Treibmittel HFA(Hydrofluoralkan)-134a kombiniert war. Da BDP in HFA-134a löslich ist, ist die Partikelgröße gegenüber den bisherigen Suspensionen wesentlich reduziert. So beträgt der MMAD (median mass aerodynamic diameter) beim HFA-BDP (Ventolair[®]) im Mittel $1,1 \mu\text{m}$ verglichen mit $3,4\text{-}4 \mu\text{m}$ beim FCKW-BDP (Aerobec[®]) [LEACH 1998a].

Im ersten Teil der Untersuchung (vgl. 4.4) inhalierte jeder Proband in drei Behandlungsphasen jeweils für 2 Wochen entweder Placebo oder FCKW-BDP ($2 \times 100 \mu\text{g}$ täglich) oder HFA-BDP ($2 \times 100 \mu\text{g}$ täglich) in zufälliger Reihenfolge (randomisiert) und mit codierten Medikamenten (doppel-blind). Die Behandlungsphasen waren durch Auswaschphasen von 4 Wochen Dauer getrennt, um Übertragseffekte auszuschließen. Während der Einschlussvisiten sowie Visiten, die unmittelbar vor jeder Behandlungsphase und an ihrem Ende stattfanden, wurden die Konzentrationen von NO bei verschiedenen Ausatemraten, das NO-Produktionsvolumen (V_c) und der NO-Totraum ($V_{d,anat}$) mittels Stufenantworten, sowie Lungenfunktion

und Sputumzusammensetzung gemessen. Lungenfunktion und induziertes Sputum wurden mit den gleichen Methoden erfasst wie in 3.1.3 beschrieben.

Der zweite Teil der Untersuchung beinhaltete wiederum 3 Behandlungsphasen. In den beiden ersten Phasen der Dauer 3 Wochen inhalierte jeder Proband in zufälliger Reihenfolge und doppel-blind entweder HFA-BDP (200 μg täglich) oder FCKW-BDP (200 μg täglich). Die Phasen waren wiederum durch eine Auswaschphase von 4 Wochen Dauer getrennt. Am Ende der zweiten Behandlungsphase steigerte jeder Proband die Dosis desjenigen Medikamentes, das er gerade inhalierte, für 3 Wochen auf 400 μg täglich. Dadurch konnten, wenngleich mit reduzierter Teststärke, die Formulierungen von BDP in zwei Dosen miteinander verglichen werden. Die Untersuchung beinhaltete kein Placebo, da der dosisabhängige Vergleich im Vordergrund stand. Bei den Einschlussvisiten, unmittelbar vor Beginn und am Ende jeder Behandlungsphase sowie am Ende der Phase der Dosisverdopplung erfolgten die gleichen Messungen wie oben beschrieben, jedoch entfiel die Sputumanalyse nach Dosisverdopplung.

3.2 Analyse der Daten

Bei der Analyse der in 4.1 dargestellten Daten wurden aufgrund der Schiefe der Verteilungen für die bei 48 mL/s gemessenen NO-Konzentrationen geometrische Mittelwerte und Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM) errechnet. Die geometrischen SEM sind hierbei als Faktoren des geometrischen Mittelwertes zu verstehen. Analog dem \pm der konventionellen arithmetischen (additiven) SEM muss die geometrische (multiplikative) SEM mit dem Mittelwert multipliziert werden (entsprechend \div) bzw. der Mittelwert wird durch SEM dividiert (entsprechend \cdot), um einen dem „ \pm “ entsprechenden Variationsbereich zu erhalten. Gleiches erfolgte für die anhand des Modells geschätzten Werte der bronchialen Wandkonzentration, F_{wc} , und des totalen Transferfaktors, K_{ave} . Zur Unterscheidung von arithmetischen SEM sind die geometrischen SEM mit dem Zeichen \div hinter dem zugehörigen geometrischen Mittelwert markiert. Der symmetrischen Verteilungen wegen wurden arithmetische Mittelwerte und SEM für die alveoläre NO-Konzentration F_{ap} sowie den NO-Totraum, $V_{d,anat}$, das zentrale bronchiale Volumen, V_c , sowie die Summe V_{NOai} ermittelt. Statistische Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test, Korrelationen wurden durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson ausgedrückt.

Für Atemkondensatmengen und H₂O₂-Konzentrationen (vgl. 4.2) wurden ebenfalls arithmetische Mittelwerte und SEM berechnet. Zur Charakterisierung der Variabilität wiederholter Messungen dienten deren Standardabweichungen (SD) als Basiswerte. Aufgrund der schiefen Verteilungen wurden die Variationskoeffizienten ($=100 \cdot \text{SD} / \text{Mittelwert}$) wiederholter Messungen sowie die prozentualen Unterschiede zwischen den Konzentrationen bei verschiedenen Flussraten mit Hilfe geometrischer Mittelwerte sowie Bereiche (Minimum, Maximum) statistisch gekennzeichnet. Mediane und Interquartile wurden für die Modellparameter gewählt. Vergleiche zwischen den Flussraten erfolgten mittels des paarigen t-Tests, in den die mittleren Werte jedes Probanden Eingang fanden.

In der Untersuchung zur Wirkung von Ozon und Allergen (vgl. 4.3) wurden sowohl die Werte des exhalierten NO als auch diejenigen von H₂O₂ logarithmiert; entsprechend wurden geometrische Mittelwerte und SEM berechnet. Arithmetische Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes wurden für alle anderen Variablen berechnet, da diese keine Transformation erforderten. Statistische Vergleiche erfolgten mittels repeated-measures ANOVA (Varianzanalyse) an logarithmierten Werten und *post-hoc*-Analysen nach Newman-Keuls, um den Fehler erster Art bei multiplen Vergleichen kontrolliert zu halten. Wenn möglich, sind die p-Werte explizit angegeben.

Zur statistischen Analyse der Wirkung inhalierter Corticosteroide (vgl. 4.4) wurde folgendes Verfahren gewählt. Die NO-Volumen-Werte wurden pro Visite als Mittelwerte von bis zu 25 Einzelmessungen berechnet. Hierbei schwankte die Anzahl der Einzelmessungen, da eine jeweils unterschiedliche Anzahl von Werten wegen Artefakten bzw. als Ausreißer verworfen werden mussten. In der ersten Untersuchung erfolgte die Selektion der Einzelmessungen zunächst mit Hilfe eines Fehlerquadratkriteriums, das den Grad der Anpassung der stückweise linearen Kurven beschrieb. Da dieses Kriterium jedoch nicht zuverlässig arbeitete, wurden in die Endauswertung alle bis auf offenkundig unsinnige Einzelmessungen einbezogen und entsprechende Mittelwerte berechnet, die dann als Messwert pro Visite galten. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um nicht durch eine subjektiv gesteuerte Datenselektion das Ergebnis zu verzerren.

In der zweiten Untersuchung zur Inhalation von Steroiden wurden alle auswertbaren NO-Volumina nach einem rein statistischen Kriterium selektiert. Zu diesem Zweck wurden Mittelwert und Standardabweichung (SD) der Rohdaten pro Visite berechnet und sodann alle Werte verworfen, die außerhalb von $2 \times \text{SD}$ lagen. Aus den derart selektierten Einzelwerten wurde

wiederum das Mittel berechnet; dieses ging in die Analyse ein. Diese Vorgehensweise hatte sich in Vorversuchen als sinnvoll herausgestellt in dem Sinne, da sie die beste Übereinstimmung mit einer qualitativen Bewertung der Daten lieferte. Aufgrund der unterschiedlichen Streuung der Volumina verwarf das Verfahren mehr Werte von V_c oder $V_{d,anat}$ als von V_{NOai} . Um die Konsistenz der in die Auswertung eingehenden Volumina zu sichern ($V_{NOai} = V_c + V_{d,anat}$), wurde die Selektion nur auf V_c und V_{NOai} angewandt und der individuelle Mittelwert von V_d pro Visite als Differenz dieser Werte errechnet.

Zur statistischen Beschreibung wurden sodann arithmetische Mittelwerte und SEM für NO-Volumina und Lungenfunktion berechnet, geometrische Mittelwerte und SEM für NO-Konzentrationen und Eosinophilen-Werte. In die Auswertung der ersten Untersuchung fand der Prozentsatz der Eosinophilen als Mittel über die konsekutiven Inhalationen von 3, 4 und 5 % Kochsalzlösung Eingang [HOLZ 1998]. In der nachfolgenden Untersuchung hingegen wurden zur Erhöhung der statistischen Teststärke diese Werte separiert und gingen als Wiederholungsmessungen in eine entsprechende Varianzanalyse ein. Statistische Vergleiche erfolgten anhand des paarigen oder unpaarigen t-Tests. Logarithmisch transformierte Daten wurden dann verwandt, wenn geometrische Mittel adäquat waren.

Alle erwähnten Tests erfolgten zweiseitig, wenn dies anwendbar war, und statistische Signifikanz wurde durchgängig bei einem Fehler I. Art von $p < 0,05$ angenommen.

3.3 Untersuchte Probanden

Um die Anwendbarkeit des NO-Modells (vgl. 4.1) zu prüfen, erfolgten Messungen des exhalierten NO über einen Bereich von Ausatemraten bei insgesamt 20 gesunden freiwilligen Probanden (12 m / 8 w; mittleres (\pm SD) Alter 32 ± 8 Jahre; Einsekundenvolumen FEV_1 106 ± 17 % vom Sollwert [QUANJER 1993]) sowie 7 Probanden mit einem leichtgradigen Asthma, die keine Corticosteroide erhielten (5 m / 2 w; Alter 30 ± 6 Jahre; FEV_1 99 ± 13 %Soll). Zusätzliche Stufenantworten des exhalierten NO wurden bei insgesamt 9 Gesunden und 4 Asthmatikern ermittelt (vgl. Tab. 4.2). Die Diagnose eines Asthma bronchiale basierte auf international akzeptierten Kriterien [ATS 1987]. Keiner der Probanden inhalierte regelmäßig Bronchodilatoren; diese wurden mindestens einen Tag vor den Messungen nicht angewandt. Alle Probanden waren Nichtraucher, in stabilem klinischem Zustand und frei von Atemwegsinfekten innerhalb von 4 Wochen vor den Messungen [KHARITONOV 1995b].

An den Messungen zur Bestimmung der Flussabhängigkeit von H_2O_2 (vgl. 4.2) nahmen 15 freiwillige Probanden teil, die allesamt Nichtraucher waren. Unter ihnen befanden sich 8 Atemwegsgesunde (4 m / 4 w). Diese wiesen ein mittleres ($\pm\text{SD}$) Alter von 31 ± 7 Jahren und ein FEV_1 von 101 ± 10 %Soll auf. 4 Probanden gaben anamnestisch ein leichtgradiges allergisches Asthma bronchiale an (4 m, Alter 36 ± 10 Jahre, FEV_1 94 ± 7 %Soll) und 3 Probanden eine allergische Rhinitis (1 m / 3 w, Alter 29 ± 2 Jahre, FEV_1 121 ± 6 %Soll). Keiner der Probanden benutzte Corticosteroide, und die (gelegentliche) Inhalation von atemwegserweiternden β_2 -Adrenozeptor-Agonisten wurde mindestens 6 h vor jedem Test eingestellt. Ferner wies keiner der Probanden in den 4 Wochen vor den Tests Symptome einer Atemwegsinfektion auf, welche die Ergebnisse hätte beeinflussen können [JÖBSIS 2001]. Da die Überprüfung der Flussabhängigkeit das primäre Ziel der Untersuchung war, waren die Gruppengrößen von vornherein nicht auf einen Vergleich der Erkrankungen hin gewählt.

Die Untersuchung zur Wirkung von Ozon und Allergen (vgl. 4.3) erfolgte an 22 freiwilligen Probanden mit allergischer Rhinitis und 11 Probanden mit leichtgradigem allergischem Asthma [ATS 1987]. Die Probanden mit Rhinitis (16 m / 6 w) wiesen ein mittleres ($\pm\text{SD}$) Alter von 29 ± 7 Jahren sowie ein mittleres FEV_1 von 107 ± 12 %Soll auf, diejenigen mit Asthma (6 m / 5 w) ein Alter von 30 ± 10 Jahren und ein FEV_1 von 100 ± 11 %Soll. Alle Probanden zeigten eine Allergie gemäß Anamnese und Haut-Pricktest, waren Nichtraucher und hatten in den letzten 3 Monaten vor Einschluss keine Corticosteroide inhaliert. Eine bedarfsweise Inhalation von β_2 -Adrenozeptor-Agonisten zum Zweck der Bronchialerweiterung wurde 8 h vor den Tests eingestellt. Darüber hinaus fand die Untersuchung außerhalb der Allergensaison des jeweiligen Probanden statt, um Interaktionen mit der Umweltallergenen zu minimieren. Respiratorische Infekte waren innerhalb von 3 Wochen vor jedem Test auszuschließen, da sie mit entzündlichen Reaktionen einhergehen.

An der Untersuchung zur regionalen Wirkung inhalierter Corticosteroide (vgl. 4.4) nahmen zunächst 15 freiwillige Probanden mit leichtgradigem Asthma bronchiale teil (6 m / 9 w; mittleres ($\pm\text{SD}$) Alter 30 ± 6 Jahre; FEV_1 107 ± 9 %Soll), die in den 3 Monaten vor Einschluss keine Steroide inhaliert hatten. Nur kurzwirksame β_2 -Adrenozeptor-Agonisten bei Bedarf waren erlaubt. Unter dieser Medikation war ein $\text{FEV}_1 \geq 80$ %Soll gefordert. Auch andere anti-entzündliche Medikationen waren ausgeschlossen, ebenso wie Raucher bzw. Probanden, die seit <12 Monaten Ex-Raucher waren. Bei Infekten der oberen Atemwege wurden die Tests verschoben, bis der Infekt abgeklungen war. Die nachfolgende Unter-

suchung der Wirkung inhalierter Corticosteroide umfasste 18 freiwillige Probanden mit leicht- bis mittelgradigem Asthma (9 m / 9 w; mittleres (\pm SD) Alter 41 ± 10 Jahre; FEV₁ 78 ± 8 %Soll). Die Probanden durften in den 4 Wochen vor Einschluss keine Corticosteroide inhaliert haben. Erlaubt war hingegen die regelmäßige Inhalation von β_2 -Adrenozeptor-Agonisten. Ferner war ein FEV₁ ≤ 90 %Soll gefordert. Die anderen Kriterien waren analog den oben genannten.

3.4 Anmerkungen zur Durchführung

Alle Untersuchungsprotokolle bzw. Messungen waren von der Ethikkommission der Ärztekammer des Landes Schleswig-Holstein für unbedenklich befunden worden und erfolgten nach ausführlicher Aufklärung im Einverständnis mit den Probanden.

Die Untersuchungen zur Entstehung von NO und zur Flußabhängigkeit von H₂O₂ wurden von der LVA - Freie und Hansestadt Hamburg im Rahmen einer jährlichen Zuwendung zur Unterstützung der Forschung unterstützt und diejenige zur Wirkung von Ozon und Allergen vom „Projekt Umwelt und Gesundheit“ des Landes Baden-Württemberg, Karlsruhe, (Projekt PUG L96010; Projektleiter R.A. Jörres).

Die Untersuchungen zur Wirkung von Corticosteroiden auf das NO-Produktionsvolumen wurden von der Firma 3M Medica, Borken, unterstützt (“A 14-week, phase III, placebo-controlled, randomized, double-blind, 3-way cross-over, single-center Pilot-Study to assess the volume of NO production within the airways after treatment with 200 μ g HFA-BDP (Beclomethasone-dipropionate) or 200 μ g CFC-BDP or Placebo by Autohaler™” sowie “The effect of inhaled HFA-134a beclomethasone dipropionate (Ventolair[®]) as compared to CFC beclomethasone dipropionate (AeroBec[®]) (200 and 400 μ g daily, each) on markers of airway inflammation in patients with mild to moderate asthma - a phase IV, randomized, double-blind, 2-way cross-over and parallel, single-center study“).

3.5 Liste der Chemikalien

Chemikalien und Reagenzien	Produkt/Nr.	Hersteller/Vertrieb
<i>Tests an Probanden</i>		
Haut-Pricktest-Allergene		ALK Scherax, Hamburg
Allergene zur Inhalation		"
Methacholinchlorid		Synopharm, Barsbüttel
IgE-Bestimmung (RAST)	CAP-System	Pharmacia, Freiburg
<i>Nachweis von H₂O₂</i>		
Meerrettich-Peroxidase		Boehringer, Mannheim
p-Hydroxyphenyllaktat (PHPL)	H3253	Sigma, Deisenhofen
H ₂ O ₂	21,676-3	"
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)	L2045	Seromed, Fa. Biochrom, Berlin
<i>Analyse des Sputum-Überstands</i>		
Mastzell-Tryptase	FEIA	Pharmacia&Upjohn, Freiburg
Histamin	ELISA	IBL, Hamburg
Nerve Growth Factor (NGF)	ELISA	Boehringer, Mannheim
<i>NO-Messung</i>		
NO-Eichgas		Messer-Griesheim, Krefeld

3.6 Liste der Geräte

Geräte	Produkt/Typ	Hersteller/Vertrieb
NO-Chemilumineszenz-Analysator	NOA 280	Sievers Instr. Inc., Boulder, Co., USA
Druckaufnehmer	GDH 12 A	Greisinger electronic, Regenstauf
"	GDH 07 AN	"
A/D-Wandler-Karte	PCL-818	Spectra Computersyst., Echterdingen
8-Kanal-Schreiber	R-58	Rikadenki GmbH, Freiburg
Motorsteuerung für Stufenantwort		Conrad Elektronik, Hirschau
Atemventile		Jaeger, Würzburg
2L-Pumpe zur externen Flussvorgabe		"
Flussmeßgerät (bubble flow meter)	Optiflow 650	Humonics, Fairfield, Ca., USA
Wasserspirometer zur Eichung der Widerstände	VT	Mijnhardt, Zeist, Holland
Kühlaggregat	Julabo F34	Julabo Labortechnik, Seelbach
Fluorometer (H ₂ O ₂ -Messung)	LS 50	Perkin-Elmer, Norwalk, Co., USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2	Christ, Osterode
Laborautomat (LDH-Messung)	COBAS Integra	Roche, Basel
Ozonanalysator	Model 49	Thermo Environmental Instruments Inc., Franklin, Ma., USA
Mobiles Lungenfunktionsmessgerät	AMOS	Jaeger, Würzburg
Pulsoximeter	OxImeter	Radiometer, Copenhagen, Dänemark

4 Ergebnisse

4.1 Entstehung des ausgeatmeten NO

4.1.1 Das NO-Transportmodell

Zum Zweck der Analyse liegt es nahe, zunächst ein Modell mit nur zwei Kompartimenten zu analysieren, das eine Verfeinerung und Verallgemeinerung auf komplexere Verhältnisse zulässt. Das Modell sollte in der Lage sein, chemische Prozesse innerhalb der Schleimhaut zu integrieren und ihren Einfluß auf das Verhalten der Konzentrations-Fluß-Beziehung quantitativ anzugeben. In seiner grundlegenden Form umfasst es zum einen ein zentrales Kompartiment, das die Gesamtheit der Bronchien bzw. Atemwege darstellt, zum anderen ein peripheres Kompartiment als gesamten alveolären Raum. Die Raten von Diffusionsprozessen, insbesondere solchen zwischen Wandung und Lumen, sind als proportional zur jeweiligen Konzentrationsdifferenz angesetzt. Ferner sollten hypothetische chemische Reaktionen nur erster Ordnung sein, indem die jeweils anderen Komponenten als im Überschuß angesehen wurden. Der Grund für diese Beschränkung lag in der Tatsache, dass ein Input-Output-Modell notwendigerweise nur ein begrenztes strukturelles Auflösungsvermögen besitzen kann.

Im folgenden werden die quantitativen Beziehungen anhand des einfachst-möglichen Falls veranschaulicht. Hierzu stelle man sich das zentrale, bronchiale Kompartiment in Form einer einzigen, sowohl bezüglich des Querschnitts als auch anderer Eigenschaften homogenen Röhre vor, welche die Gesamtheit der Bronchien darstellt.

Zunächst sei die NO-Konzentration der Luft, die von distal in die Röhre eintritt, Null. Gesetzt den Fall, die Transportrate von NO in den Luftraum wäre konstant und hinge nicht von der Konzentrationsdifferenz zum Lumen ab, so wäre zu erwarten, dass die Konzentration von NO beim Austritt aus der Röhre proportional der zur Verfügung stehenden Zeit, d.h. der Transitzeit, und somit umgekehrt proportional zur Flussrate wäre. Die Gesamtrate des abgegebenen NO, d.h. das Produkt von Konzentration und Flussrate, wäre konstant. Jedoch wurde gezeigt, dass diese Rate mit der expiratorischen Flußrate ansteigt [z.B. SILKOFF 1997]. Demzufolge nimmt die Konzentration nicht so rasch mit zunehmender Flussrate ab, wie dies von einer einfach inversen Beziehung zu erwarten wäre. Nimmt man eine primär bronchiale

NO-Produktion an, so impliziert dies, daß der Transport von NO seitens der Wandung mit steigender Flussrate wächst.

Die einfachste Erklärung dieser Beobachtungen ist, daß die niedrigeren Konzentrationen von NO im Lumen, die bei höheren Flussraten notwendigerweise auftreten, für die höhere Transportrate verantwortlich sind. Dieser Fall wäre dann gegeben, wenn der Transport von NO dem Konzentrationsgradienten zwischen Lumen und Wandung proportional ist. In jedem Fall nimmt der Konzentrationsgradient wegen der Abnahme der Konzentration im Lumen mit steigender Flussrate zu, falls die NO-Konzentration der Wandung näherungsweise konstant ist. Entsprechend wird der lokale Konzentrationsgradient kleiner, wenn - wie empirisch gezeigt - die NO-Konzentration im Lumen mit fallender Flussrate steigt. Dies würde automatisch nach sich ziehen, daß Gesamtabgabe von NO mit der Flussrate zunimmt. Dieser Logik zufolge ist es also die Abweichung der NO-Konzentration von der umgekehrten Proportionalität zur Flussrate, die es erlauben sollte, Kenngrößen für den Transfer von NO aus der Wandung abzuleiten. Als Voraussetzung ist zu fordern, daß die Wandung, d.h. Atemwegsmukosa, eine endliche, wohldefinierte - oder zumindest als Mittelwert sinnvoll definierbare - NO-Konzentration als treibende Kraft für den Transport von NO in das Lumen aufweist.

Aus der Abweichung von der umgekehrten Proportionalität sollten Informationen über die Höhe der Transportrate unter sonst identischen Bedingungen, d.h. die „Leichtigkeit“ des Übergangs von NO in das Lumen zu gewinnen sein. Diese Informationen sollten primär in dem Verhalten bei niedrigen Flussraten verborgen sein, da bei hohen Raten die Konzentration im Lumen in jedem Falle gegen Null geht, mit der Folge, dass die Konzentrationsdifferenz zwischen Lumen und Wand nahezu gleich der Konzentration in der Wand selbst ist. Da diese als konstant angenommen wird, wäre somit der Fall umgekehrter Proportionalität bei hohen Flussraten näherungsweise erreicht. Diese Überlegungen setzen niedrige distal eingespeiste NO-Werte voraus, doch läßt sich diese Einschränkung beheben. Folglich lassen sich bereits durch eine qualitative Betrachtung ohne Hinzuziehung mathematischer Formeln wesentliche Eigenschaften der Prozesse erschließen, die dem ausgeatmeten NO zugrundeliegen.

Zum Zweck der genauen Analyse stelle man sich das periphere, alveoläre Kompartiment in Form eines homogenen, gut durchmischten Raumes vor, das zentrale, bronchiale Kompartiment in Form einer einzigen Atemwegsröhre der Länge L , des Durchmessers D und des Volumens V_c (Abb. 4.1). Wegen des großen Querschnitts ist die Flussgeschwindigkeit im peripheren Kompartiment vernachlässigbar, während sie in der Atemwegsröhre merkliche

NO-Transportmodell

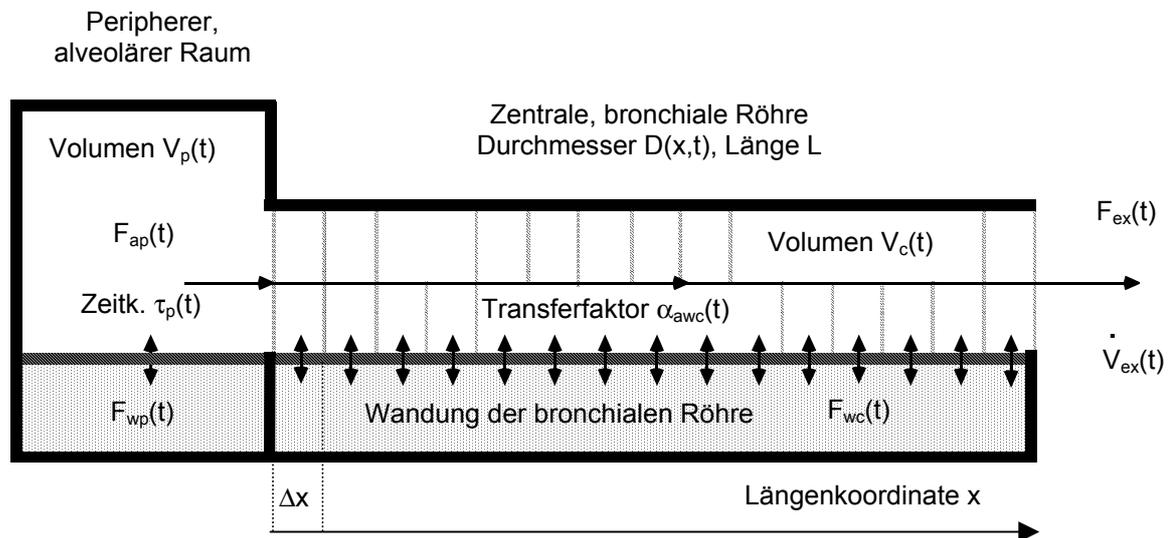


Abbildung 3.1: Schema des NO-Transportmodells in der allgemeinsten Form mit einem peripheren, alveolären und einem zentralen, bronchialen Kompartiment sowie mit NO-Reservoiren in den Wandungen der Kompartimente (schattiert). In der Wandung der Peripherie sei die Konzentration von NO $F_{wp}(t)$ und in der Wandung der Atemwegsröhre $F_{wc}(x,t)$. Hierbei bezeichnet x die Längenkoordinate und t die Zeit. Die ausgeatmete Luft bewegt sich aus dem alveolären Raum des Volumens $V_p(t)$ mit der Flussrate $\dot{V}_{ex}(t)$ durch die bronchiale Röhre der Länge L und des Durchmessers $D(x,t)$. Die Transportrate von NO zwischen Wandung und Luftraum im alveolären Kompartiment bestimmt die alveoläre Luftraumkonzentration $F_{ap}(t)$ und ist durch die Zeitkonstante τ_p gekennzeichnet, mit der ein Gleichgewichtswert erreicht wird. In analoger Weise ist die Transportrate an jeder Stelle der Atemwegsröhre und somit die lokale NO-Konzentration $F_{ac}(x,t)$ durch einen lokalen NO-Transferfaktor $\alpha_{awc}(x,t)$ bestimmt (pro Einheit der Konzentrationsdifferenz, Oberfläche und Zeit). Allerdings wird wegen des Vorüberströmens der Luft, d.h. der endlichen Kontaktzeit, im allgemeinen kein Gleichgewichtswert erreicht. Die Konzentration des mit der Flussrate $\dot{V}_{ex}(t)$ ausgeatmeten NO beträgt $F_{ex}(t)$ und ist gleich $F_{ac}(x,t)$ an der Stelle $x=L$. Zum Zwecke der Analyse denke man sich die Atemwegsröhre, wie durch gestrichelte Linien angedeutet, in viele kleine Volumenelemente der Länge Δx zerlegt und berechne dann den lokalen Transport während eines kleinen Zeitintervalls Δt (vgl. 8.1).

Werte annehmen und über einen großen Bereich variieren kann. Da die Länge der Röhre endlich ist, ist die Transitzeit T , die ein Volumenelement zum Durchqueren von distal nach proximal benötigt, ebenfalls endlich und umgekehrt proportional zur Strömungsgeschwindigkeit. Diese wiederum ist wegen des konstanten Querschnitts über die Länge der Röhre konstant und proportional zur Volumenflussrate, \dot{V}_{ex} . Im Gegensatz dazu hängt die Verweilzeit der Luft im alveolären Kompartiment nicht direkt von der Flussrate ab, sondern stellt eine eigenständige Größe dar.

Da der Transfer von NO proportional der Konzentrationsdifferenz zwischen Lumen und Wandung der Atemwegsröhre ist, müssen abhängig von den Eigenschaften der Wandung geeignete Löslichkeits- bzw. Partitionskoeffizienten von NO eingesetzt werden, um zwischen den NO-Konzentrationen in der Wandung (wässrige Lösung) und im Lumen zu vermitteln. Für den Zweck der Modellanalyse sind diese Koeffizienten entbehrlich, da alle Konzentrationen in Form fraktioneller Gaskonzentrationen ausgedrückt werden können, wobei die Konzentration der Wandung ihr Gleichgewichtsäquivalent in der Gasphase darstellt.

Die NO-Konzentration der Wandung der Atemwegsröhre sei mit F_{wc} bezeichnet. In der gegenwärtigen vereinfachenden Betrachtung ist dieser Wert konstant, im allgemeinen Fall hingegen ein mittlerer Wert entlang der Röhre. Aus diesem Grunde wird er effektiver Wert genannt. Die Konzentration des ausgeatmeten NO wird mit F_{ex} bezeichnet; sie stellt denjenigen Wert dar, der im Luftraum am Ausgang der Atemwegsröhre erreicht wird (vgl. Abb. 4.1).

Der Proportionalitätskoeffizient, der den lokalen Transfer von NO in das Lumen beschreibt, wird mit α_{awc} bezeichnet (Glg. A2.1) und „lokaler Transferfaktor“ genannt. Er charakterisiert den Transport (flux) pro Konzentrationsdifferenz, Oberfläche und Zeit. Als phänomenologischer Parameter umfasst dieser Koeffizient die Diffusionslimitationen innerhalb der Atemwegswand und des Flüssigkeitsfilmes (Mucus, ELF), der die Wand auskleidet, wie auch Diffusionslimitationen innerhalb des Luftraumes selbst, z.B. radiale Gradienten. Unter vereinfachenden Annahmen, die jedoch eine breite Klasse von Modellen beschreiben, kann der lokale Transferfaktor über die gesamte Oberfläche der Atemwegsröhre integriert werden und liefert dann einen totalen effektiven Transferfaktor pro Konzentrationsdifferenz und Zeiteinheit, K_{awc} , (Glg. A2.5, A2.9). Dieser Faktor ist demjenigen analog, der mittels Messungen der sog. Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO) für den alveolären Raum definiert wird. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass der hier definierte Transfer-

faktor die Abgabefähigkeit der Atemwege für NO anstelle einer alveolären Aufnahmefähigkeit beschreibt.

Im alveolären Kompartiment gilt eine ähnliche Argumentation für den Transport zwischen Wandung und Lumen. Allerdings geht die Zeit *per se* und nicht vermittelt der Flussabhängigkeit ein. Der lokale periphere Transferfaktor kann näherungsweise über die Oberfläche integriert werden. Es resultiert eine exponentielle Änderung der NO-Konzentration im Luftraum, F_{ap} , über die Zeit (Glg. A1.2). Die Zeitkonstante kann zu der konventionellen alveolären Diffusionskapazität für NO in Beziehung gesetzt werden (Glg. A1.3). In der Analyse der Messdaten konnte F_{ap} teils als konstant oder sogar Null angenommen werden, da sich das zentrale Kompartiment beim Asthma als dominierende Quelle des ausgeatmeten NO erwies und sich ein Gleichgewicht der alveolären Luftraumkonzentration offenbar rasch einstellt.

Um das Verhalten des Modells bei konstanten expiratorischen Flussraten zu analysieren, werden zunächst alle Modellparameter als zeitlich konstant und homogen entlang der Atemwegsröhre angenommen. Die Konzentration von NO im alveolären Raum, F_{ap} , kann von Null verschieden, soll jedoch ebenfalls konstant sein. Ferner sollen keine radialen Konzentrationsgradienten in der Atemwegsröhre bestehen. Wenn ein Volumenelement (in Form einer „Scheibe“) die Röhre entlangläuft, diffundiert NO aus der Wandung in den Luftraum (oder umgekehrt) gemäß dem Konzentrationsgradienten an jeder longitudinalen Position unter Berücksichtigung des lokalen Transferfaktors und der lokalen Oberfläche (Abb. 4.1). Bei konstanter Flussrate wird ein steady-state-Wert erreicht, da jedes durchlaufende Volumenelement die gleiche Historie und folglich die gleiche NO-Konzentration aufweist.

Nimmt man an, dass die expiratorische Flussrate gegen Null geht, so geht die Transitzeit gegen Unendlich und es wird ein Äquilibrium zwischen Wandung und Luftraum erreicht. Daher nähert sich die Konzentration von NO und folglich diejenige des exhalierten NO, F_{ex} , derjenigen der bronchialen Wandung, F_{wc} , an. Ist umgekehrt die expiratorische Flussrate hoch und geht gegen Unendlich, so ist die Transitzeit kurz und läuft gegen Null. Die Ausatemkonzentration F_{ex} nähert sich unter diesen Bedingungen derjenigen des alveolären Raumes, F_{ap} , an, da keine Zeit mehr für einen Austausch mit der bronchialen Wand zur Verfügung steht. Somit erlauben es die asymptotischen Werte der Konzentrations-Flusskurve für die Flussraten Null bzw. Unendlich, zwei der Parameter des Modells, nämlich die effektive bronchiale mukosale Konzentration von NO, F_{wc} , und die alveoläre Luftraumkonzentration, F_{ap} , zu ermitteln (Abb. 4.2).

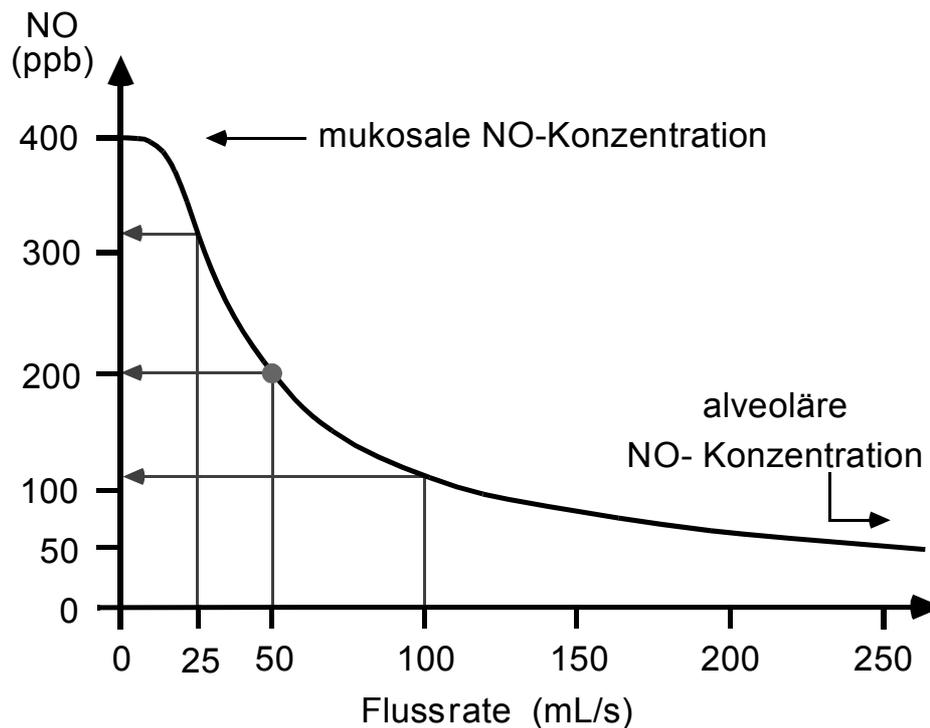


Abbildung 4.2: Prinzipieller Verlauf der durch das NO-Transportmodell beschriebenen Konzentrations-Fluss-Kurven. Die asymptotische Annäherung an die Flussrate Null erlaubt es, die zentrale, mukosale Konzentration, F_{wc} , zu ermitteln, und die asymptotische Annäherung an die Flussrate Unendlich, die periphere, alveoläre Konzentration, F_{ap} , zu ermitteln. Die Steilheit des Abfalls ist ein inverses Maß des Transferfaktors K_{awc} . Je größer dieser bei gegebenem Anfangs- und Endpunkt F_{wc} bzw. F_{ap} ist, desto höher liegt der Wert beispielsweise bei 50 mL/s. Zugleich ist durch die eingezeichneten Linien veranschaulicht, dass die NO-Werte für hohe Flussraten weniger stark als invers zur Flussrate abfallen und für niedrige Flussraten weniger stark als invers ansteigen.

Darüber hinaus kann man sich klarmachen, dass bei gegebener alveolärer Konzentration, Schleimhautkonzentration und Flussrate die Ausatemkonzentration F_{ex} um so höher sein sollte, je höher der totale Transferfaktor K_{awc} ist, denn dieser Wert beschreibt die Rate des Überganges von NO in das Lumen unter sonst gleichen Bedingungen. Anders formuliert: bei gegebenem asymptotischem Anfangs- und Endwert sollte der Abfall der Ausatemkonzentration mit der Flussrate um so flacher ausfallen, je größer K_{awc} ist (Abb. 4.2 und 4.3). Daher ist die relative Steilheit der Kurve ein inverses Maß für den totalen Transferfaktor K_{awc} .

Beispiele für verschiedene Parameterkonstellationen sind in Abb. 4.3A gezeigt. Dargestellt sind Kurven für zwei verschiedene Schleimhautkonzentrationen, F_{wc} , und drei verschiedene totale Transferfaktoren, K_{awc} . Mathematisch läßt sich die Beziehung zwischen Ausatemfluss, \dot{V}_{ex} , und Ausatemkonzentration, F_{ex} , als Funktion der drei Modellparameter F_{ap} , F_{wc} und K_{awc} in Form der Lösung einer Differentialgleichung (Glg. A2.3) wie folgt formulieren:

$$(1) \quad F_{ex} = F_{wc} - (F_{wc} - F_{ap}) \cdot \exp\left(-\frac{K_{awc}}{\dot{V}_{ex}}\right).$$

Verallgemeinerungen dieser Beziehung sind in Kap. 8.2 gegeben. Trägt man Glg. (1) doppelt-logarithmisch auf, so ergibt sich eine näherungsweise lineare Beziehung für Flussraten oberhalb von 30-50 mL/s (Abb. 4.3B). Mit den in den Graphiken angegebenen numerischen Werten der Parameter resultieren bei Flussraten ≥ 50 mL/s näherungsweise Steigungen zwischen -0,74 und -0,49, mit einem Mittel von -0,60. Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit empirischen Werten [z.B. SILKOFF 1997].

Lässt man zu, daß einzelne Parameter entlang der bronchialen Röhre variieren, jedoch weiterhin zeitlich konstant sind, so führen Inhomogenitäten des Durchmessers sowie des lokalen Transferfaktors wiederum auf die einfache Beziehung, die durch Glg. (1) gegeben ist. Jedoch ergibt sich nun der totale Transferfaktor, K_{awc} , als gewichtetes Mittel (Integral) über die gesamte Atemwegsröhre (Gln. A2.5 and A2.7). Folglich werden Inhomogenitäten der lokalen Oberfläche und des Mukus- bzw. Flüssigkeitsfilmes ausgemittelt; ihr Vorhandensein tangiert offenbar nicht die Gültigkeit von Glg. (1). Auf der anderen Seite heißt dies, daß Inhomogenitäten dieser Parameter durch eine Analyse der Form der Konzentrations-Flusskurven nicht zu eruieren sein dürften.

Führt man dagegen Inhomogenitäten der Schleimhautkonzentration, F_{wc} , ein, so resultiert ein zusätzlicher Term (letzter Term in Glg. A2.6), der eine Abweichung von der durch Glg. (1) gegebenen Form bewirkt. Doch ist bei realistischen Werten für die Variation von F_{wc} der Zusatzterm klein gegenüber dem Hauptterm. Daher dürfte ein eventueller longitudinaler Gradient der Schleimhautkonzentration schwer zu entdecken sein. Umgekehrt unterstreicht dieses Ergebnis die Robustheit des durch Glg. (1) beschriebenen Modells und lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass die effektiven, über die Gesamtheit der bronchialen Röhre

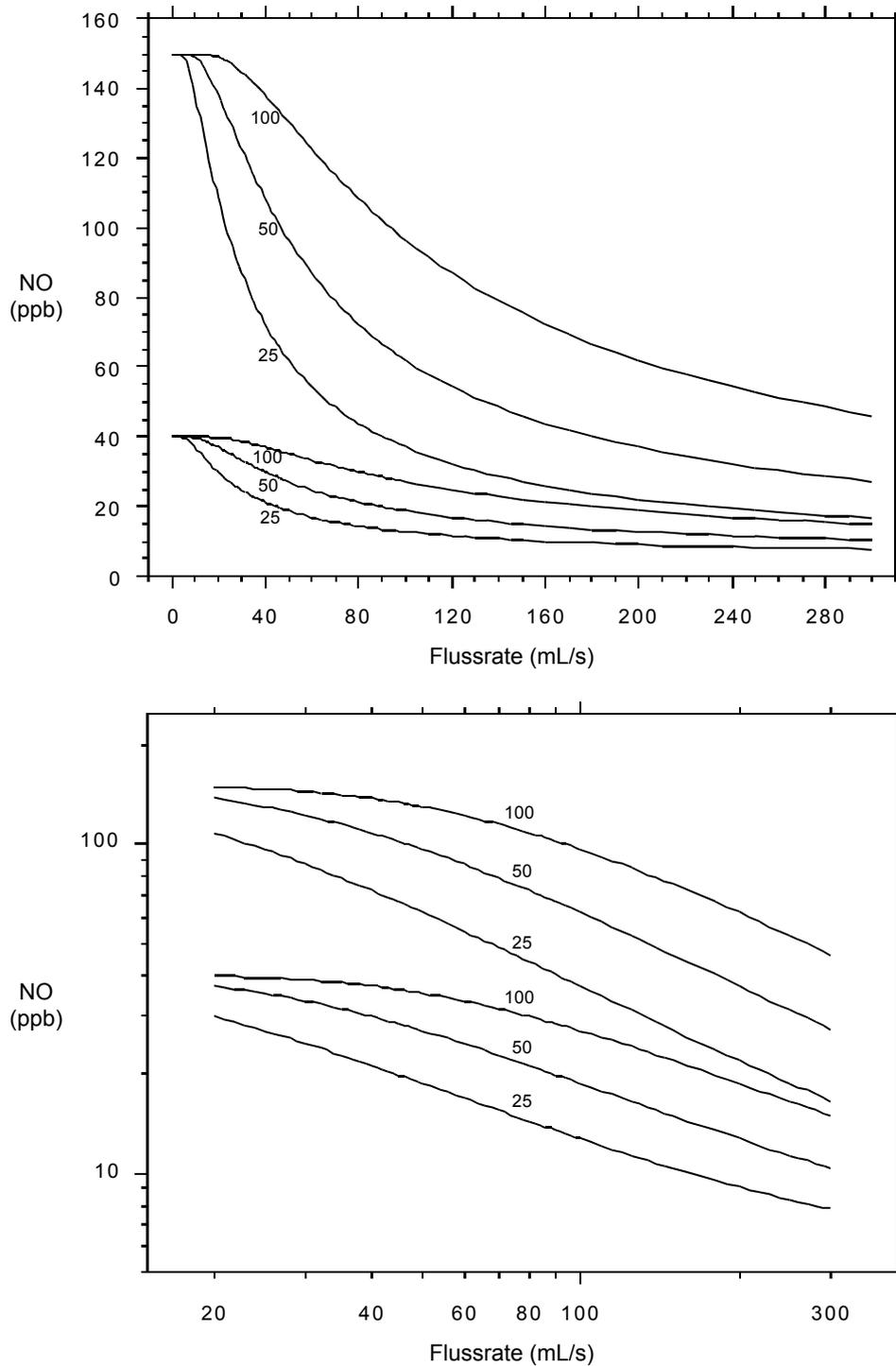


Abbildung 4.3: Expiratorische NO-Konzentration bei konstanter Flussrate gemäß Glg. (1) für Beispielwerte der Parameter. Die alveoläre NO-Konzentration ist konstant, $F_{ap} = 5$ ppb. Die jeweils oberen drei Kurven entsprechen einer mukosalen NO-Konzentration von $F_{wc} = 150$ pp, die unteren drei einer solchen von 40 ppb. Die Zahlen an jeder der Kurven geben den zugehörigen Wert des totalen Transferfaktors, K_{awc} , an (in mL/s). A: Originaldarstellung, B: doppelt-logarithmische Darstellung.

gemittelten Parameterwerte für praktische Zwecke hinreichend stabile Kenngrößen darstellen, vorausgesetzt, die derartigen Gleichungen inhärenten numerischen Probleme werden gelöst.

Will man die Konzentration des ausgeatmeten NO als Funktion einer zeitlich veränderlichen Flussrate darstellen, so ist es zweckmäßig, die Parameter als zeitlich konstant und räumlich homogen anzunehmen. Unter diesen Annahmen ist es allein die Transitzeit T , die den bronchialen Transport von NO und die Konzentration des ausgeatmeten NO bestimmt (Glg. A2.12). Allerdings wird als Folge der zeitlichen Veränderung der Flussrate die Transitzeit $T(t)$ eines Volumenelementes, das die Atemwegsröhre zur Zeit t verlässt, selbst zeitabhängig. Die Zeit $T(t)$ ist gerade diejenige Zeit, welche der von distal kommende Luftstrom benötigt, die Atemwegsröhre des Volumens V_c zu durchqueren (Glg. A2.13). Hierbei ist ein Signal von speziellem Interesse: eine plötzliche Änderung der Flussrate zur Zeit $t = t_s$ vom Wert $\dot{V}_{ex,1}$ auf den Wert $\dot{V}_{ex,2}$, d.h. eine stufenförmige Änderung. Dies induziert eine Stufenantwort der Transitzeit (Glg. A2.14) und in der Folge der Konzentration des exhalierten NO.

Zur Vervollständigung und Annäherung an die physiologisch-anatomischen Verhältnisse wird ein Totraum des Volumens V_d an das proximale, d.h. mundseitige Ende der bronchialen Röhre angefügt (Abb. 4.4). In diesem Raum wird definitionsgemäß NO weder produziert noch absorbiert, d.h. die Luft passiert diesen Raum bezüglich NO unverändert. Den Totraum kann man sich aus dem apparativen Totraum, $V_{d,app}$, und dem anatomischen Totraum, $V_{d,anat}$, zusammengesetzt denken. Letzterer umfaßt definitionsgemäß das Volumen zwischen Lippen und proximalem Ende der bronchialen Röhre, an dem die NO-Produktion beginnt und sich nach distal fortsetzt. Da NO in den Bronchien erzeugt wird, ist der NO-Totraum spezifisch auf NO bezogen und darf auf keinen Fall mit dem üblichen anatomischen Totraum verwechselt werden, der gerade die Gesamtheit der nicht am alveolären Gasaustausch beteiligten Bronchien umfasst. Letzterer wird üblicherweise mittels CO_2 bestimmt. Es ist zu erwarten, dass der NO-Totraum sehr viel kleiner als der konventionelle anatomische Totraum ausfällt und dieser wiederum in der gleichen Größenordnung liegt wie die Summe des Volumens von NO-Totraum (V_d) und NO-produzierender bronchialer Röhre (V_c).

Das Prinzip der Stufenantwort ist in Abb. 4.4 erläutert. Vor dem Umschalten der Flussrate beträgt die Flussrate $\dot{V}_{ex,1}$, die Transitzeit T_1 und die zugehörige NO-Konzentration $F_{ex,1}$. Es sei angenommen, daß die konstante Flussrate lange genug bestand, um einen steady-state des NO-Transfers, d.h. eine konstante Ausatemkonzentration (Plateauwert) zu bewirken.

Stufenantwort des exhalierten NO

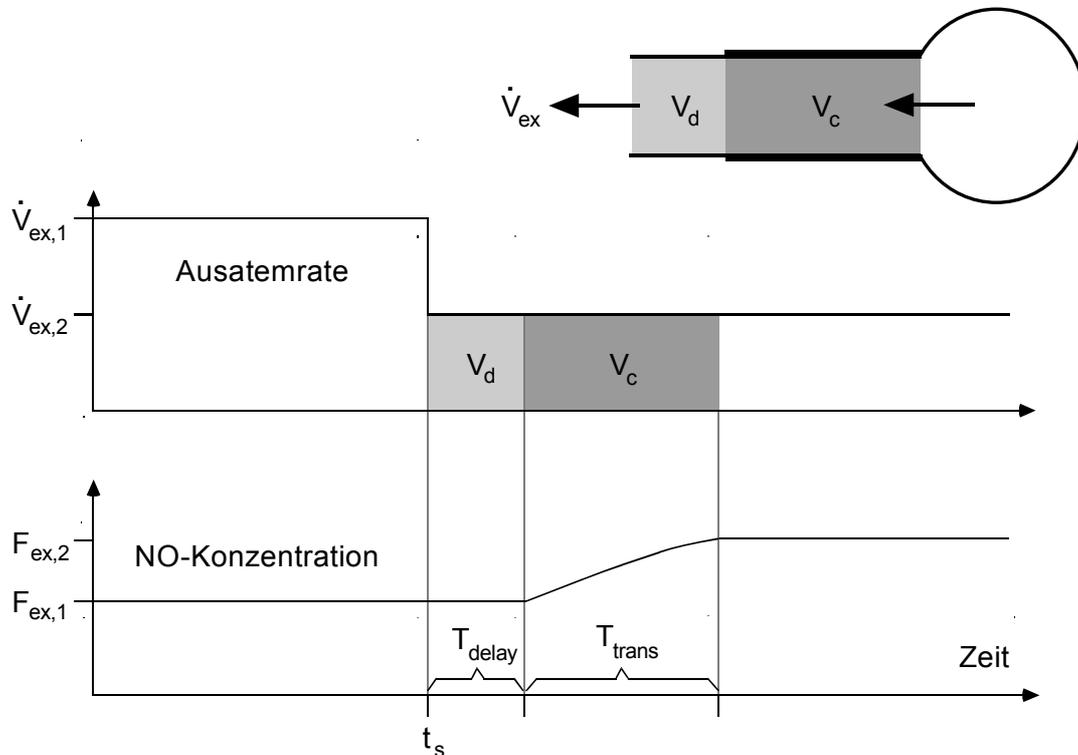


Abbildung 4.4: Schema der NO-Stufenantwort. Dargestellt ist das anhand des NO-Transportmodells vorhergesagte NO-Signal bei einer plötzlichen Senkung der Ausatemrate von $\dot{V}_{ex,1}$ auf $\dot{V}_{ex,2}$ zum Zeitpunkt t_s . Das ursprüngliche Zweikompartimentmodell (vgl. Abb. 4.1) wurde erweitert um einen NO-Totraum (apparativ plus anatomisch) des Volumens V_d , der an das proximale Ende der bronchialen Röhre des Volumens V_c angefügt ist (siehe Graphik). Da die Zeit T_{delay} benötigt wird, um den Totraum zu durchqueren, ist das NO-Signal, welches das Volumen V_c verläßt, um T_{delay} verzögert. Zum Zeitpunkt $t_s + T_{delay}$ sind die ersten Änderungen der NO-Konzentration sichtbar. Während einer Übergangsphase der Länge T_{trans} nimmt die Transitzeit der Volumenelemente, die V_c verlassen, linear von T_1 auf T_2 zu (Glg. A2.14). Entsprechend steigt das NO-Signal von $F_{ex,1}$ auf $F_{ex,2}$; seine genaue Form als Funktion der Transitzeit ist durch Glg. (A2.12) gegeben. Die Konzentrationen $F_{ex,1}$ und $F_{ex,2}$ entsprechen den steady-state-Werten, die zu den Flussraten $\dot{V}_{ex,1}$ und $\dot{V}_{ex,2}$ gehören. Im Idealfall ist T_{trans} mit T_2 identisch. Folglich können die Volumina V_d und V_c direkt aus den Zeiten T_{delay} bzw. T_{trans} durch Multiplikation mit der Flussrate $\dot{V}_{ex,2}$ berechnet werden.

Aufgrund des NO-Totraumes wird das expiratorische NO-Signal um eine Verzögerungszeit, T_{delay} , verschoben. Dies ist die Zeit, die zwischen dem Umschalten der Flussrate und dem Zeitpunkt verstreicht, an dem die erste Änderung der NO-Konzentration sichtbar wird. Multipliziert man die Zeit T_{delay} mit der Flussrate $\dot{V}_{ex,2}$, mit der nach dem Umschalten die Luft diesen Raum durchquert, so ergibt sich das Volumen des NO-Totraumes, V_d (Abb. 4.4). Jede noch so kleine Änderung der Flussrate zieht eine Änderung der Transitzeit und somit eine Änderung der NO-Konzentration nach sich. Daher bewirkt eine sprungförmige Änderung der Flußrate immer eine „augenblickliche“, im vorliegenden Falle allerdings durch den Totraum verzögerte und die Charakteristik des Systems geglättete Antwort des NO-Signals.

Nach der initialen Änderung der NO-Konzentration ändert sich diese kontinuierlich, bis ein neuer steady-state-Wert, $F_{ex,2}$, erreicht ist. $F_{ex,2}$ ist derjenige Wert, welcher gemäß Glg. (1) der Flussrate $\dot{V}_{ex,2}$ korrespondiert, mit der zugehörigen Transitzeit T_2 . Die Zeit, die für den Übergang von einem steady-state-Wert zum nächsten benötigt wird, wird mit T_{trans} bezeichnet. Es ist diejenige Zeit, die erforderlich ist, um nach dem Umschalten der Flussrate mit der Rate $\dot{V}_{ex,2}$ die NO-produzierende bronchiale Röhre einmal vollständig zu füllen. Alle nach diesem „Spülvorgang“ von distal einströmende Luft besitzt die gleiche Transitzeit T_2 und weist daher die konstante Ausatemkonzentration $F_{ex,2}$ auf.

Die Luft, die während der Übergangszeit ausgeatmet wird, hat den ersten Teil ihrer Strecke mit der Flussrate $\dot{V}_{ex,1}$ und den zweiten Teil mit der Flussrate $\dot{V}_{ex,2}$ zurückgelegt, entsprechend den Transitzeiten T_1 und T_2 . Daher liegen die NO-Konzentrationen zwischen beiden steady-state-Werten. Die Änderung der Transitzeit $T(t)$ für die zur Zeit t ausgeatmeten Luftvolumina ist linear (Glg. A2.14) und mit der NO-Konzentration über Glg. (A2.12) verknüpft. Daher ist der Verlauf der NO-Konzentration zwischen den beiden Plateauwerten nichtlinear.

Für numerische Zwecke kann dieser Verlauf jedoch über eine stückweise lineare, rampenförmige Funktion approximiert werden, deren beide Eckpunkte durch die Zeitspanne T_{trans} getrennt sind. Alternativ kann eine exponentielle Funktion entsprechend Glg. (A2.12) verwandt werden. Allerdings erzeugt diese zusätzliche Probleme in der Definition des zweiten Eckpunktes, sofern die zweite Flussrate groß genug ist, um in den flachen Teil der durch Glg. (1) beschriebenen Beziehung zu gelangen. Daher bieten sich Abwärtssprünge der Flussrate eher als Aufwärtssprünge an. Darüber hinaus sind zusätzliche Probleme durch zeitlich variab-

le Terme nicht ausgeschlossen, wie kurzzeitige Akkumulations- oder Depletionsvorgänge von NO in der Atemwegsmukosa. Derartige Einschwingvorgänge sollten insbesondere bei hoher bronchialer NO-Produktion vorkommen und zu einer Abflachung am Ende der Transition führen, die dem zweiten steady-state-Wert vorausgeht. In den vorliegenden Berechnungen wurde durchgehend die stückweise lineare Approximation verwandt, da sie sich numerisch am stabilsten erwies. Auch wiesen die untersuchten Probanden in der Regel keine extremen Werte der NO-Produktion auf.

Das Volumen der NO-produzierenden bronchialen Röhre, V_c , ergibt sich nach Definition der Transitzeit T_2 durch Multiplikation mit der Flussrate $\dot{V}_{ex,2}$. Es ist evident, daß unter idealen Bedingungen die Zeit T_2 mit der empirisch ermittelten Übergangszeit T_{trans} identisch ist. Daher kann das Volumen der bronchialen Röhre, V_c , durch Multiplikation der Flussrate $\dot{V}_{ex,2}$ mit dem Zeitintervall T_{trans} geschätzt werden. Dieser Ansatz erlaubt es, auf nicht invasive Weise volumetrische Charakteristika der NO-produzierenden bronchialen Region zu bestimmen. Der anatomische NO-Totraumes gibt an, in welcher Tiefe die NO-Produktion beginnt, von den Lippen ab gerechnet. Daran schließt sich das NO-produzierende bronchiale Volumen an, das definitionsgemäß am Übergang zum alveolären Raum endet.

Addiert man anatomischen NO-Totraum, $V_{d,anat}$, und bronchiales Volumen, V_c , so erhält man ein Maß für die volumetrische Tiefe, in welche eine signifikante NO-Produktion bzw. NO-assoziierte Atemwegsentzündung reicht (V_{NOai}). Hierbei handelt es sich um eine rein phänomenologische Größe, die allein auf dem in die Atemwege abgegebenen und ausgeatmeten NO basiert. Ändert sich eine konkurrierende Absorption von NO in der Lungenperipherie, so kann dies das geschätzte Volumen der Atemwegsröhre am distalen Ende beeinflussen, ohne dass sich das NO-produzierende bronchiale Volumen selbst ändert. Ungeachtet derartiger, unvermeidlicher Schwächen bietet sich das neuartige Verfahren an, um die lokale Modulation der NO-assoziierten bronchialen Entzündung zu messen (vgl. 4.4).

4.1.2 NO-Konzentration bei konstanter Flussrate

Abb. 4.5 zeigt als Beispiel die NO-Konzentration eines Probanden mit Asthma bei verschiedenen expiratorischen Flussraten einschließlich sehr niedriger Werte sowie eine angepasste Kurve. Analoge Beziehungen zwischen Konzentration und Flussrate sind in Abb. 4.6A für 4 Gesunde und in Abb. 4.6B für 4 Asthmatiker dargestellt. Die mittleren Schätzwerte der

zentralen, bronchialen Wandkonzentration von NO (F_{wc}), der peripheren, alveolären Konzentration von NO (F_{ap}), des totalen Transferfaktors (K_{awc}) und des NO-Wertes bei einem Fluss von 48 mL/s sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Verglichen mit den Gesunden lagen in der Gruppe der Asthmatiker die Werte von F_{wc} signifikant höher ($p < 0,001$) und diejenigen von K_{awc} signifikant niedriger ($p < 0,001$). Das dreiparametrische Modell lieferte periphere, alveoläre Werte von Null bei 10 von 27 Probanden. Im Mittel (Maximum) betragen die Konzentrationen 3,2 (7,4) ppb bei den Gesunden und 0,8 (3,0) ppb bei den Asthmatikern; diese Werte unterschieden sich nicht statistisch signifikant zwischen den Gruppen. Die Differenzen zwischen den Werten von F_{wc} und den bei einem Fluß von 48 mL/s gemessenen Werten, als Maß der „initialen Überhöhung“ der Kurve (vgl. Abb. 4.2), waren bei den Asthmatikern signifikant größer als bei den Gesunden ($p < 0,001$).

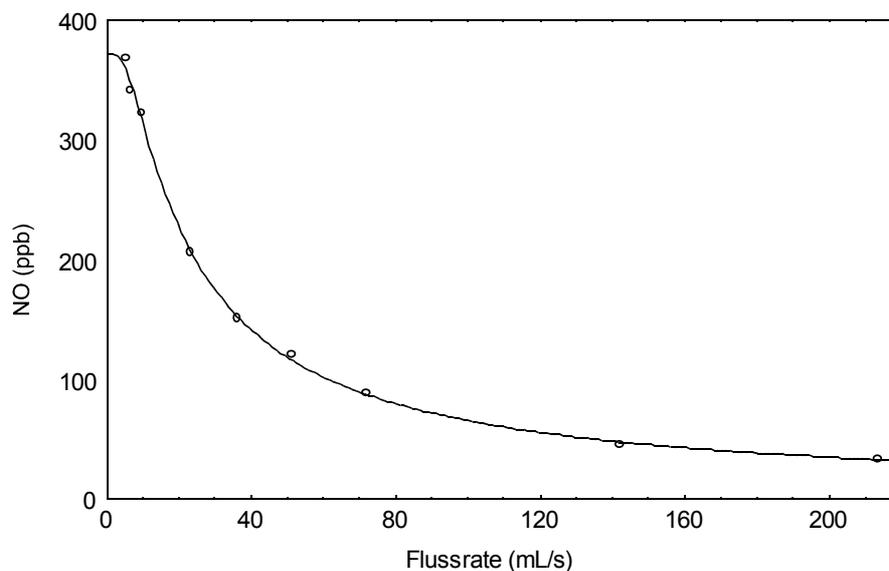


Abbildung 4.5: Beispiel von Messwerten der steady-state-Konzentration (Plateauwerte) von NO unter verschiedenen Ausatemraten sowie mittels Glg. (1) angepasste Kurve bei einem Probanden mit Asthma. Die Abbildung veranschaulicht, dass das NO-Transportmodell auch bei sehr niedrigen Flussraten die Daten gut beschreibt. In Bereich niedriger Flussraten treten die Unterschiede zwischen dem Modell aus Glg. (1) und anderen - oberflächlich gesehen ähnlichen - exponentiellen Kurvenverläufen zutage. Deutlich sichtbar ist auch das durch Glg. (1) vorhergesagte Abflachen der Kurve, wenn sich die Flussrate dem Wert Null nähert.

Tabelle 4.1 - Parameter des NO-Transportmodells

		<i>Gesund</i>	<i>Asthma</i>
n		20	7
F_{ex} ($\dot{V}_{ex} = 48$ mL/s) [§]	ppb	21,9 ÷ 1,10 10,3-53,2	70,5 ÷ 1,24 32,6-149,4
F_{wc} [§]	ppb	38,4 ÷ 1,15 12,6 - 123,2	247,2 ÷ 1,22 112,5 - 453,1
K_{awc} ^{&}	mL/s	42,8 ÷ 1,11 21,4 - 106,0	16,3 ÷ 1,16 10,2 - 27,6

Dargestellt sind geometrische Mittelwerte und SEM (gekennzeichnet durch ÷) sowie Bereiche (min-max) der Parameter, die unter Annahme einer alveolären NO-Konzentration von Null (siehe 3.1.1) geschätzt wurden. [§] NO-Konzentration bei einer Flussrate von 48 mL/s, [§] effektive zentrale mukosale Wandkonzentration von NO, [&] effektiver totaler bronchialer Transferfaktor für NO

4.1.3 NO-Konzentration bei zeitlich variabler Flussrate - Stufenantwort

Beispiele von durch willkürliche, kontrollierte Atemmanöver erhaltenen Stufenantworten sind in Abb. 4.7 gegeben. Insgesamt wurden 134 technisch akzeptable Messungen erzielt. Individuelle Werte des anatomischen Totraums ($V_{d,anat}$) und des zentralen NO-Produktionsvolumens (V_c) sind in Tabelle 4.2 gezeigt, ebenso wie die Summe dieser beiden Werte (V_{NOai}) als Maß der volumetrischen Tiefe der NO-assoziierten Atemwegsentzündung. Die Schätzwerte von V_c und V_{NOai} , nicht jedoch diejenigen von $V_{d,anat}$ waren signifikant mit den Werten der langsamen inspiratorischen Vitalkapazität (VC), als Maß des Lungenvolumens, korreliert ($r=0,70$, $p=0,008$ bzw. $r=0,62$, $p=0,025$; Abb. 4.8).

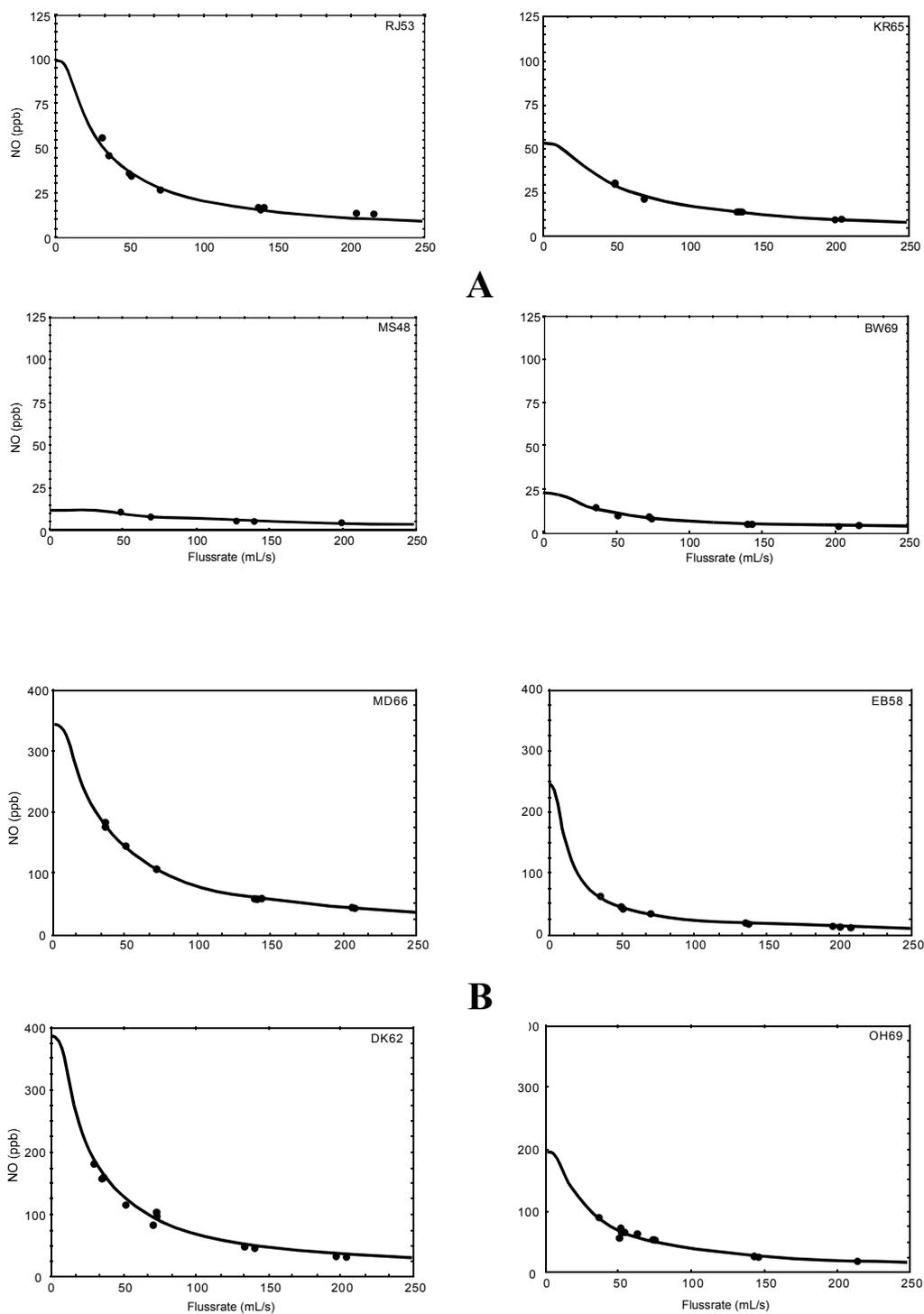


Abbildung 4.6: Beispiele von NO-Messwerten bei konstanten Ausatemraten sowie mittels Glg. (1) angepasste Kurven bei 4 Gesunden (A) sowie 4 Asthmatikern (B). Es wurden repräsentative Kurven ausgewählt, um ein Bild der Streuung zu vermitteln. Man beachte, dass die Werte bei den Asthmatikern höher liegen und die Kurven steiler verlaufen.

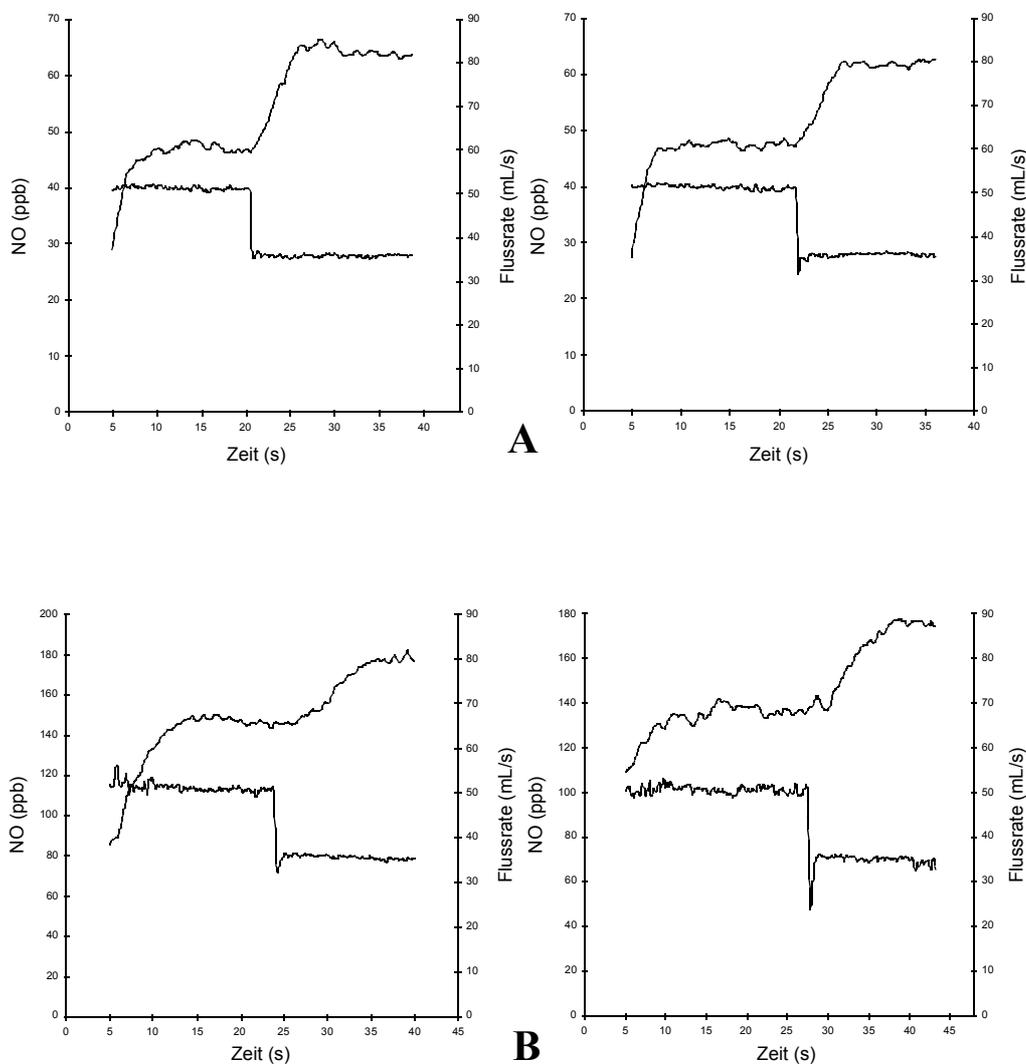


Abbildung 4.7: Stufenantworten des NO-Signals nach willkürlichen, abrupten Reduktionen der Ausatemrate um ca. den Faktor 2 (von 20 mbar auf ca. 10 mbar, mit „Überschießen“). Die Ausgangsflussraten lagen bei ca. 50 mL/s. Gut erkennbar ist der rampenförmige Anstieg der NO-Konzentration, bis ein neuer Plateauwert erreicht ist (vgl. Abb. 4.4). A: Kurven von Gesunden, B: Kurven von Asthmatikern. Man beachte die höheren NO-Konzentrationen bei letzteren.

Tabelle 4.2 - Ergebnisse der Stufenantworten

Proband	Gruppe	n [§]	Geschlecht	Alter Jahre	FEV ₁ [§] %Soll	VC [§] L	Anatomischer NO-Totraum		Zentrales NO-Produktionsvolumen		Summe $V_{NO_{ai}}$ mL
							$V_{d,anat}$ mL	V_c mL	V_c mL	$V_{NO_{ai}}$ mL	
OH	G	9	m	35	124	5,88	38,3 ± 5,4	194,7 ± 13,5	233,0		
MB	G	12	w	33	121	4,45	65,2 ± 3,6	138,2 ± 4,2	203,4		
MM	G	11	w	38	88	3,23	55,2 ± 3,9	101,0 ± 4,3	156,2		
SJ	G	8	w	41	105	3,50	20,0 ± 3,7	57,5 ± 5,3	77,5		
JL	G	17	m	26	96	5,48	42,2 ± 3,5	93,3 ± 3,7	135,5		
RJ	G	10	m	44	120	5,82	50,2 ± 3,6	228,6 ± 11,6	278,8		
KR	G	8	m	32	93	5,04	22,6 ± 4,8	173,4 ± 13,9	196,0		
JH	G	6	m	19	92	4,89	102,8 ± 8,4	201,0 ± 7,2	303,8		
KW	G	12	w	31	81	3,34	19,3 ± 1,2	101,4 ± 4,5	120,7		
MD	A	4	m	30	95	4,90	69,8 ± 10,0	146,6 ± 12,9	216,4		
MS	A	12	m	30	92	5,05	93,0 ± 6,5	246,6 ± 14,4	339,6		
DS	A	7	w	29	110	4,68	65,9 ± 5,4	126,0 ± 7,9	191,9		
LG	A	18	m	28	97	6,50	56,6 ± 4,5	202,1 ± 9,1	258,7		

Angegeben sind neben anthropometrischen Charakteristika der Probanden individuelle Werte (jeweils arithmetisches Mittel ± SEM wiederholter Messungen) des anatomischen NO-Totraums, des zentralen NO-Produktionsvolumens und ihrer Summe, der volumetrischen Tiefe der NO-assoziierten Atemwegsentsündung.

[§] Zahl der auswertbaren Messungen pro Proband, [§] Einsekundenvolumen, [§] inspiratorische Vitalkapazität

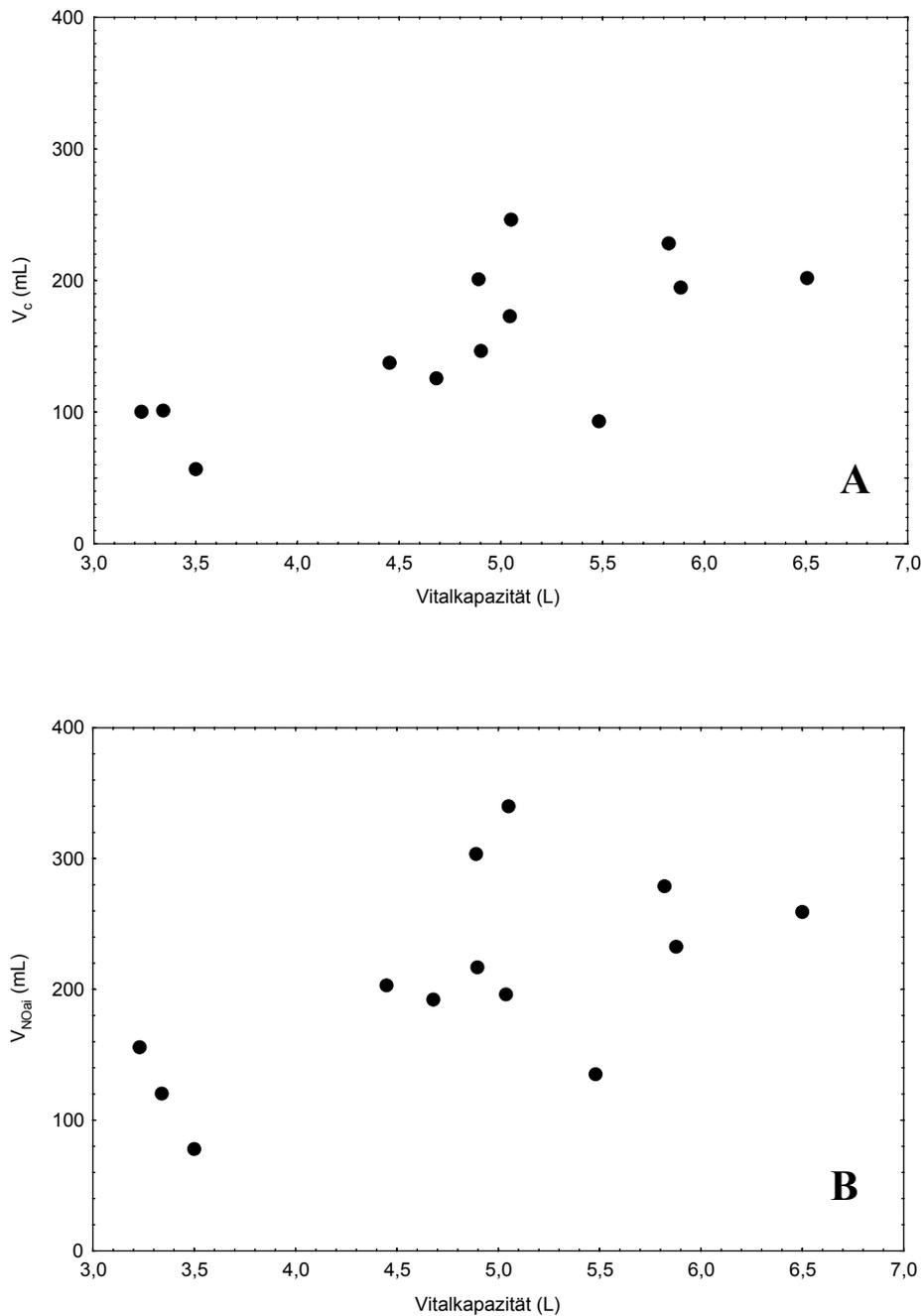


Abbildung 4.8: Beziehungen zwischen der spirometrisch gemessenen inspiratorischen Vitalkapazität, VC als Maß der Lungengröße und dem zentralen NO-Produktionsvolumen, V_c , (A) sowie der Tiefe der NO-assoziierten Atemwegsentszündung, V_{NOai} (B). Die Werte entsprechen denen von Tabelle 4.2.

4.2 Flussabhängigkeit des ausgeatmeten H₂O₂

4.2.1 Abhängigkeit der Konzentration von der Ausatemrate

In keiner der Proben war α -Amylase nachweisbar, so dass Kontaminationen des Atemkondensats mit Speichel auszuschließen waren. Dies war von besonderer Bedeutung, da Assays für H₂O₂ einschließlich des hier verwandten in der Regel mit Speichelkomponenten stark reagieren.

Das mittlere (\pm SEM) Volumen an Atemkondensat betrug 660 ± 9 , 445 ± 7 und 304 ± 10 μ L bei Flussraten von 140, 69 bzw. 48 mL/s. Die Auftragung der Menge des Atemkondensates gegen das ausgeatmete Luftvolumen ergab keine wesentlichen Abweichungen von der Proportionalität. Dieser Befund bezeugt zum einen, dass die unterschiedlichen Ausatemraten nicht in unterschiedlichen Freisetzungsraten von Exhalat resultierten, etwa aufgrund einer Depletion oder Akkumulation, zum anderen, dass das zur Sammlung des Atemkondensates verwandte Gerät bei allen Atemraten vergleichbar effizient arbeitete.

Die Konzentration von H₂O₂ zeigte sich flussabhängig bei jedem einzelnen Probanden, wenngleich in unterschiedlichem Ausmaß und auf unterschiedlichem mittleren Niveau. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ein wesentlicher Teil des ausgeatmeten H₂O₂ seinen Ursprung innerhalb der Atemwege hat. Einzelwerte pro Messung und Proband sind in Abb. 4.9 gegeben, Mittelwerte pro Proband in Abb. 4.10. Es fanden sich keine erkennbaren Unterschiede der H₂O₂-Konzentration zwischen Probanden mit Asthma oder Rhinitis und Gesunden.

Die über alle Probanden und Wiederholungsmessungen gemittelten (\pm SEM) Konzentrationen von H₂O₂ betragen $0,125 \pm 0,016$ μ M bei 140 mL/s, $0,193 \pm 0,021$ μ M bei 69 mL/s, und $0,319 \pm 0,030$ μ M bei 48 mL/s (Abb. 4.11). Wurde die Gesamtgruppe der Probanden zur Auswertung herangezogen, waren die Unterschiede zwischen den drei Flussraten in jedem der möglichen paarweisen Vergleiche statistisch hochsignifikant (jeweils $p < 0,001$). Die Werte hingen nicht in erkennbarer Weise von der Reihenfolge der Messungen ab.

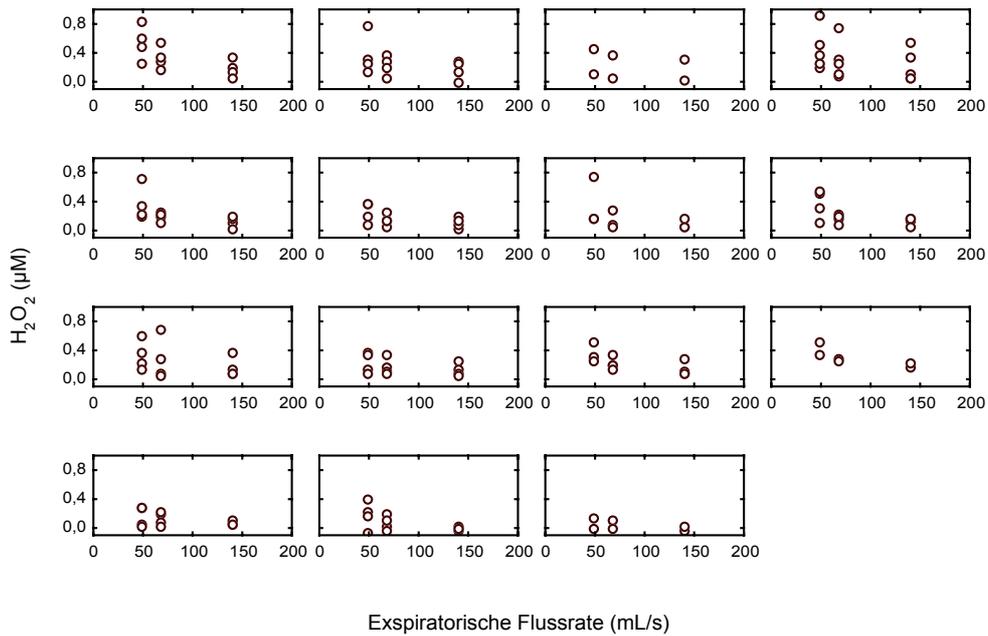


Abbildung 4.9: Einzelmessungen von H₂O₂ bei drei verschiedenen Ausatemraten bei 15 Probanden. Gezählt von oben links zeilenweise hatten die Probanden folgende Diagnosen: Asthma: Nr. 1, 5, 6, 15; Rhinitis: Nr. 3, 12, 14; Gesund: Nr. 2, 4, 7-11, 13.

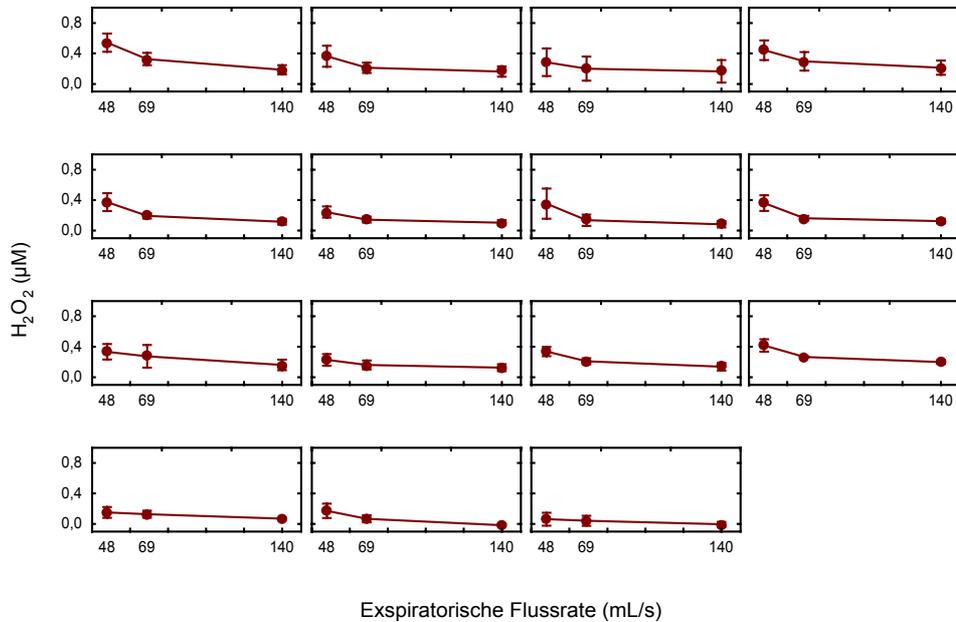


Abbildung 4.10: Individuelle Mittelwerte (±SEM) der wiederholten Einzelmessungen von H₂O₂ bei drei Ausatemraten bei 15 Probanden (Diagnosen wie in Abb. 4.9).

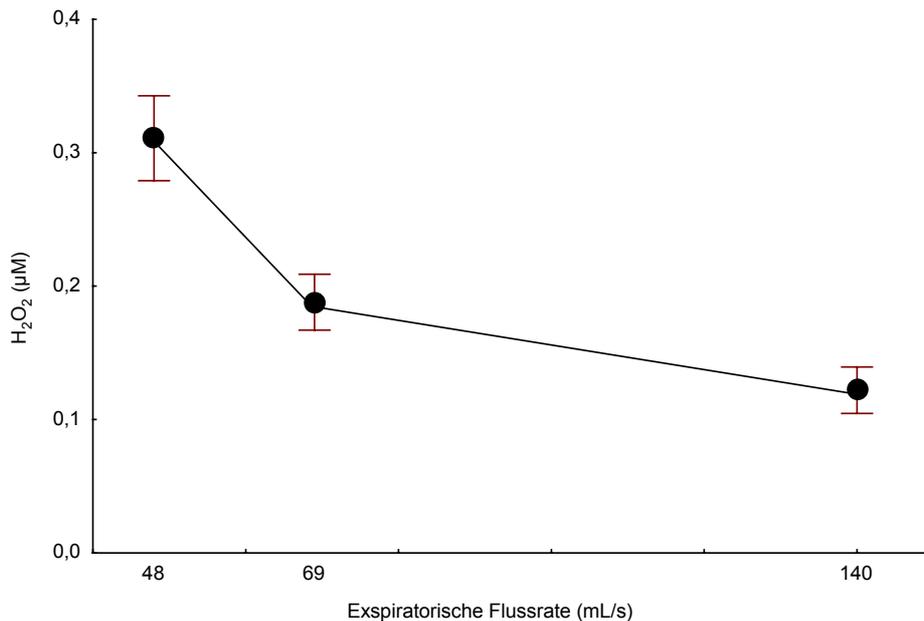


Abbildung 4.11: Gesamtmittel (\pm SEM) aller Messungen bei drei verschiedenen expiratorischen Flussraten. Die SEM geben die interindividuelle Streuung wieder, da sie sich auf die individuellen Mittelwerte beziehen.

4.2.2 Variabilität der H₂O₂-Konzentration

Die geometrischen Mittelwerte (Bereiche) der individuellen Variationskoeffizienten wiederholter Messungen betragen 68 (28; 193) % bei einer Flussrate von 140 mL/s, 62 (5; 227) % bei 69 mL/s und 82 (17; 930) % bei 48 mL/s. Somit verblieb ungeachtet der Standardisierung der Ausatembedingungen eine beachtliche Variabilität methodologischen oder biologischen Ursprungs.

Um die intraindividuelle Variabilität mit dem Ausmaß der Unterschiede bei verschiedenen Flussraten zu vergleichen, wurden die prozentualen Differenzen zwischen den H₂O₂-Konzentrationen unterschiedlicher Flussraten berechnet; hierbei wurden einmal die niedrigeren und einmal die höheren Flussraten als Bezugsgrößen zugrundegelegt. Relativ zur jeweils höheren Flussrate betragen die geometrischen Mittelwerte (Bereiche) der Änderungen 44 (22; 82) % von 48 nach 69 mL/s, 61 (19; 159) % von 69 nach 140 mL/s, und 136 (72; 324) % von 48 nach 140 mL/s. Relativ zur jeweils niedrigeren Flussrate betragen die Änderungen 30 (18; 45) % von 48 nach 69 mL/s, 36 (16; 61) % von 69 nach 140 mL/s, und 57 (42; 76) % von

48 nach 140 mL/s. Diese Daten zeigen, dass die mittleren prozentualen Änderungen der H₂O₂-Konzentration bei Änderung der Ausatemrate von der gleichen Größenordnung wie die mittleren Variationskoeffizienten bei fester Ausatemrate waren. Die Variation des Atemflusses scheint somit nicht die primäre Quelle der Variabilität.

4.2.3 Modellanalyse der Flussabhängigkeit

Aufgrund der relativ hohen Streuung der Messwerte und des begrenzten Bereiches, innerhalb dessen die Ausatemrate variiert werden konnte, erschien es vom numerischen Standpunkt aus problematisch, Modelle, die mindestens zwei bzw. bei Einschluss des peripheren Kompartiments drei Parameter aufweisen (siehe Glg. (1) in 4.1), auf Daten anzuwenden, die nur drei verschiedene Flussraten umfassen. Um sowohl die Stabilität des Modells zu testen als auch einen, wenn auch nur mit Vorbehalt zu nehmenden Hinweis auf den relativen Anteil der peripheren und zentralen H₂O₂-Produktion zu gewinnen, wurde dennoch dieser Versuch unternommen.

Gab man alle Einzelmessungen eines Probanden in die numerische Prozedur ein (vgl. 3.1.1), konvergierte sie in jedem einzelnen Fall. Dies ist nach den Erfahrungen mit NO keineswegs zwangsläufig der Fall. Der Median (Interquartilbereich) der peripheren, alveolären H₂O₂-Konzentration betrug -0,05 (-0,11; 0,02) μM und derjenige der bronchialen mukosalen H₂O₂-Konzentration 2,85 (1,63; 3,52) μM . Da die alveoläre Konzentration als nichtnegativ gefordert werden muss, liegt es demzufolge nahe, sie in erster Näherung gleich Null zu setzen. Diese Daten sprechen zusätzlich für einen vorwiegend bronchialen Ursprung des ausgeatmeten H₂O₂.

4.3 Wirkung entzündlicher Stimuli (Ozon/Allergen) auf NO und H₂O₂

4.3.1 Effekt von Ozon auf das ausgeatmete NO

Bei der Einschlussuntersuchung zeigten die Probanden mit Rhinitis eine signifikant niedrigere Konzentration von NO als die Probanden mit Asthma ($p < 0,001$; Tab. 4.3). Da keine wesentlichen Unterschiede im Reaktionsmuster auf Ozon bzw. Allergen bestanden, wurden Gruppen nicht nur einzeln, sondern auch gemeinsam analysiert, um die Teststärke für die Detektion möglicher Änderungen zu erhöhen. Alle folgenden statistischen Vergleiche beziehen sich auf die Gesamtgruppe, wenn nicht anders angegeben.

Um einen möglichen Effekt der Expositionen zu entdecken, wurden zunächst die unmittelbar nach Einzelexposition bzw. der letzten der vier Expositionen gemessenen Werte mit dem Wert der Einschlussuntersuchung verglichen (Tab. 4.3). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0004$). Dieser äußerte sich darin, dass im multiplen Vergleich nach Newman-Keuls ($p < 0,05$) zwei disjunkte, homogene Gruppen in Erscheinung traten: zum einen die Einschlussuntersuchung und der nach 250 ppb gemessene Wert, zum anderen die nach gefilterter Luft, 125 ppb Ozon und 4x125 ppb Ozon gemessenen Werte. Der Interaktionsterm war ebenfalls signifikant ($p = 0,027$), so dass man von einem nicht-parallelen Verlauf in beiden Gruppen ausgehen kann. Der Unterschied zwischen den genannten Werten war ebenfalls signifikant, wenn Rhinitis ($p = 0,0003$) oder Asthma ($p = 0,009$) separat analysiert wurden, allerdings ohne klare Trennung im *post-hoc*-Vergleich.

Kein signifikanter Effekt fand sich beim Vergleich der Werte, die unmittelbar nach jeder der vier aufeinanderfolgenden Expositionen gegenüber 125 ppb Ozon gemessen wurden ($p = 0,22$). Jedoch war die Interaktion statistisch signifikant ($p = 0,0008$), so dass das Verhalten beider Gruppen als unterschiedlich gelten muss (Tab. 4.3). Die Einzelanalyse ergab einen signifikanten Verlauf bei der Rhinitis ($p = 0,0002$), wobei der erste der Werte niedriger lag ($p < 0,05$). Dies war beim Asthma nicht der Fall ($p = 0,18$).

4.3.2 Effekt von Allergen auf das ausgeatmete NO

Die 1 h nach Allergengabe erhaltenen Werte von NO unterschieden sich nicht signifikant zwischen den vier Expositionsmodi ($p = 0,16$; Interaktion: $p = 0,21$). Gleiches galt für Rhinitis

Tabelle 4.3 - Konzentration des ausgeatmeten NO (ppb)

	<i>Rhinitis</i> (n=22)	<i>Asthma</i> (n=11)	<i>Alle</i> (n=33)
Einschlusstest	23,8 ÷ 1,09	43,2 ÷ 1,17	29,0 ÷ 1,10
Gefilterte Luft			
Exposition	27,2 ÷ 1,12	63,7 ÷ 1,10	36,1 ÷ 1,12
Allergen: 1 h	23,7 ÷ 1,12	49,0 ÷ 1,10	30,2 ÷ 1,11
6 h	29,9 ÷ 1,12	57,2 ÷ 1,11	37,1 ÷ 1,11
125 ppb Ozon			
Exposition	32,2 ÷ 1,13	52,1 ÷ 1,14	37,8 ÷ 1,10
Allergen: 1 h	25,7 ÷ 1,15	44,8 ÷ 1,15	31,1 ÷ 1,12
6 h	32,4 ÷ 1,14	49,7 ÷ 1,14	37,3 ÷ 1,11
250 ppb Ozon			
Exposition	25,4 ÷ 1,14	43,1 ÷ 1,15	30,5 ÷ 1,11
Allergen: 1 h	22,2 ÷ 1,11	37,9 ÷ 1,15	26,6 ÷ 1,10
6 h	30,4 ÷ 1,11	45,8 ÷ 1,15	35,3 ÷ 1,09
4x125 ppb Ozon			
Exposition 1	29,0 ÷ 1,13	53,6 ÷ 1,19	35,6 ÷ 1,12
Exposition 2	33,3 ÷ 1,15	48,6 ÷ 1,17	37,9 ÷ 1,12
Exposition 3	33,8 ÷ 1,14	48,0 ÷ 1,19	38,0 ÷ 1,11
Exposition 4	36,1 ÷ 1,13	49,9 ÷ 1,16	40,2 ÷ 1,10
Allergen: 1 h	27,6 ÷ 1,14	40,4 ÷ 1,17	31,3 ÷ 1,11
6 h	33,0 ÷ 1,13	48,9 ÷ 1,14	37,6 ÷ 1,10

Angegeben sind die bei einem Ausatemfluss von 50 mL/s unmittelbar nach Exposition sowie 1 h und 6 h nach Allergeninhalation gemessenen Werte in Form geometrischer Mittelwerte und SEM (gekennzeichnet durch ein vorangehendes ÷). Die Ergebnisse der statistischen Vergleiche mittels Varianzanalyse sind im Text dargestellt (siehe 4.3.1 und 4.3.2).

($p=0,11$) und Asthma ($p=0,16$) separat. Ein ähnliches Ergebnis resultierte für die 6 h nach Allergen gemessenen Werte ($p=0,20$; Interaktion: $p=0,31$). Wiederum fanden sich weder bei der Rhinitis ($p=0,24$) noch beim Asthma ($p=0,17$) signifikante Effekte.

Andererseits ergaben sich für jeden der Expositionsmodi signifikante Unterschiede beim Vergleich der jeweils drei erhaltenen Werte (unmittelbar nach Exposition vs. 1 h vs. 6 h nach Allergen). Dies galt für gefilterte Luft ($p<0,0001$; Interaktion: $p=0,043$), 125 ppb Ozon ($p=0,0004$; Interaktion: $p=0,67$), 250 ppb Ozon ($p<0,0001$; Interaktion: $p=0,71$) sowie 4x125 ppb Ozon (in Bezug auf den letzten der vier Werte unmittelbar nach Exposition) ($p<0,0001$; Interaktion: $p=0,61$). In jedem einzelnen Fall ergab ein *post-hoc*-Vergleich ($p<0,05$), dass der 1 h nach Allergen ermittelte Wert signifikant niedriger lag als die Werte unmittelbar nach Exposition und der Wert 6 h nach Allergen; diese bildeten eine homogene Gruppe. Die separate Analyse der Gruppen erfolgte nur für die nach gefilterter Luft erhaltenen Werte. Sowohl bei der Rhinitis als auch beim Asthma (jeweils $p=0,0002$) fand sich ein ähnlicher Effekt wie in der Gesamtgruppe, einschließlich des Ergebnisses der *post-hoc*-Vergleiche ($p<0,05$). In der Gruppe der Asthmatiker waren sogar alle drei Werte signifikant verschieden.

4.3.3 Reproduzierbarkeit der Effekte auf NO

Da die Effekte der Expositionen gering waren im Vergleich zu den Unterschieden der NO-Konzentration zwischen den Probanden, lieferte der Vergleich von Messungen, die am gleichen Tage erfolgten, sowie von Messungen, die im Abstand von Wochen erfolgten, ein Maß für die Reproduzierbarkeit. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Messungen 1 und 6 h nach Allergen betragen $r=0,93$, $0,97$, $0,93$ und $0,93$ für die vier Expositionsmodi (jeweils $p<0,0001$). Hingegen rangierten die Korrelationskoeffizienten der Werte, die unmittelbar nach Exposition gemessen wurden, zwischen $r=0,54$ und $r=0,82$ und lagen somit deutlich niedriger (für die Analyse wurde aus den wiederholten Expositionen die erste gewählt). Zur Veranschaulichung sind in Abb. 4.12A die nach Exposition gemessenen NO-Konzentrationen gegen die bei der Einschlussuntersuchung gemessenen Werte aufgetragen.

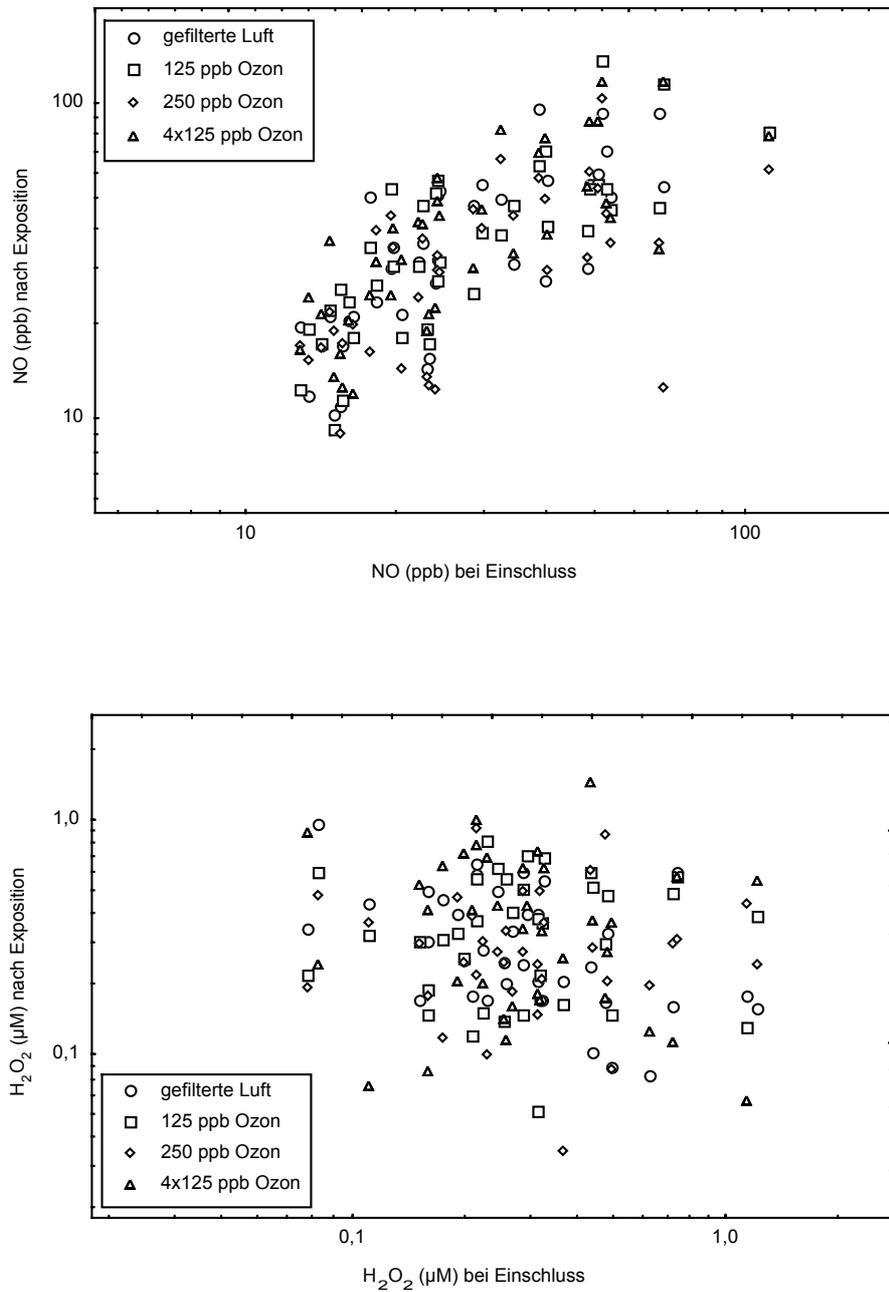


Abbildung 4.12: Beziehung zwischen den Werten der Einschlussuntersuchung und den nach Exposition, d.h. ohne Allergenwirkung gemessenen Konzentrationen von NO (A) bzw. H₂O₂ (B). Die Symbole stehen für die vier verschiedenen Expositionsmodi.

4.3.4 Effekt von Ozon auf das ausgeatmete H₂O₂

In der Einschlussuntersuchung zeigten die Probanden mit Rhinitis keine statistisch signifikant verschiedenen Werte im Vergleich zu den Probanden mit Asthma (Tab. 4.4).

Die unmittelbar nach Einzelexposition bzw. der letzten der vier Expositionen gemessenen Werte und der Wert der Einschlussuntersuchung waren nicht signifikant voneinander verschieden (Varianzanalyse: $p=0,94$; Interaktion: $p=0,25$) (Tab. 4.4). Ebenso fanden sich keine Unterschiede, wenn die Probanden mit Rhinitis ($p=0,23$) oder Asthma ($p=0,81$) separat analysiert wurden.

Beim Vergleich der Werte, die unmittelbar nach den vier aufeinanderfolgenden Expositionen gegenüber 125 ppb Ozon gemessenen wurden, ergab sich für die Gesamtgruppe kein signifikanter Unterschied ($p=0,68$; Interaktion: $p=0,68$). Gleiches war bei den Probanden mit Rhinitis ($p=0,66$) oder Asthma ($p=0,70$) der Fall.

4.3.5 Effekt von Allergen auf das ausgeatmete H₂O₂

Die 1 h nach Allergenprovokation erhaltenen Werte von H₂O₂ unterschieden sich nicht signifikant zwischen den vier Expositionsmodi ($p=0,25$; Interaktion: $p=0,27$). Gleiches traf für die Gruppe mit Rhinitis ($p=0,27$) oder Asthma ($p=0,29$) zu. In ähnlicher Weise waren die 6 h nach Allergengabe erhaltenen Werte nicht verschieden ($p=0,39$; Interaktion: $p=0,57$), ebensowenig wie bei den Probanden mit Rhinitis ($p=0,39$) oder Asthma ($p=0,50$).

Andererseits zeigten sich für gefilterte Luft signifikante Effekte beim Vergleich der jeweils drei erhaltenen Werte ($p=0,026$; Interaktion: $p=0,24$); hierbei ergab der *post-hoc*-Vergleich, dass die Werte 1 und 6 h nach Allergen als voneinander verschieden gelten konnten ($p<0,05$). 125 ppb Ozon übte keinen signifikanten Effekt aus ($p=0,060$; Interaktion: $p=0,19$), ebensowenig wie 250 ppb Ozon ($p=0,11$; Interaktion: $p=0,36$) und 4x125 ppb Ozon (in Bezug auf den letzten der vier Werte nach Exposition) ($p=0,53$; Interaktion: $p=0,26$).

Tabelle 4.4 - Konzentration des ausgeatmeten H₂O₂ (µM)

	<i>Rhinitis</i> (n=22)	<i>Asthma</i> (n=11)	<i>Alle</i> (n=33)
Einschlusstest	0,295 ÷ 1,14	0,255 ÷ 1,26	0,280 ÷ 1,12
Gefilterte Luft			
Exposition	0,257 ÷ 1,14	0,326 ÷ 1,19	0,278 ÷ 1,11
Allergen: 1 h	0,184 ÷ 1,15	0,335 ÷ 1,15	0,225 ÷ 1,12
6 h	0,268 ÷ 1,17	0,415 ÷ 1,22	0,310 ÷ 1,14
125 ppb Ozon			
Exposition	0,291 ÷ 1,14	0,303 ÷ 1,24	0,295 ÷ 1,12
Allergen: 1 h	0,255 ÷ 1,15	0,378 ÷ 1,22	0,292 ÷ 1,13
6 h	0,368 ÷ 1,15	0,390 ÷ 1,20	0,375 ÷ 1,11
250 ppb Ozon			
Exposition	0,232 ÷ 1,16	0,329 ÷ 1,16	0,262 ÷ 1,12
Allergen: 1 h	0,202 ÷ 1,10	0,248 ÷ 1,20	0,216 ÷ 1,09
6 h	0,292 ÷ 1,12	0,286 ÷ 1,28	0,290 ÷ 1,12
4x125 ppb Ozon			
Exposition 1	0,363 ÷ 1,18	0,328 ÷ 1,22	0,350 ÷ 1,14
Exposition 2	0,325 ÷ 1,14	0,358 ÷ 1,19	0,335 ÷ 1,11
Exposition 3	0,418 ÷ 1,16	0,329 ÷ 1,27	0,386 ÷ 1,13
Exposition 4	0,349 ÷ 1,17	0,260 ÷ 1,29	0,316 ÷ 1,15
Allergen: 1 h	0,248 ÷ 1,12	0,254 ÷ 1,23	0,250 ÷ 1,10
6 h	0,251 ÷ 1,20	0,320 ÷ 1,23	0,272 ÷ 1,15

Angegeben sind die unmittelbar nach Exposition sowie 1 h und 6 h nach Allergeninhalation gemessenen Werte in Form geometrischer Mittelwerte und SEM (gekennzeichnet durch ein vorangehendes ÷). Die Ergebnisse der statistischen Vergleiche mittels Varianzanalyse sind im Text dargestellt (siehe 4.3.4 und 4.3.5).

4.3.6 Reproduzierbarkeit der Effekte auf H₂O₂

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Messungen 1 und 6 h nach Allergen betragen $r=0,85$, $0,72$, $0,79$ und $0,45$ für die vier Expositionsmodi (jeweils $p<0,01$). Hingegen lagen die Korrelationskoeffizienten der Werte, die unmittelbar nach Exposition gemessen wurden (für die wiederholten Expositionen der erste Wert), bei $r=0,074$ bis $r=0,26$. Analog der für NO gegebenen Darstellung sind in Abb. 4.12B die Beziehungen zwischen den H₂O₂-Werten dargestellt, die in Abwesenheit von Allergen ermittelt wurden.

4.3.7 Beziehung zwischen NO und H₂O₂

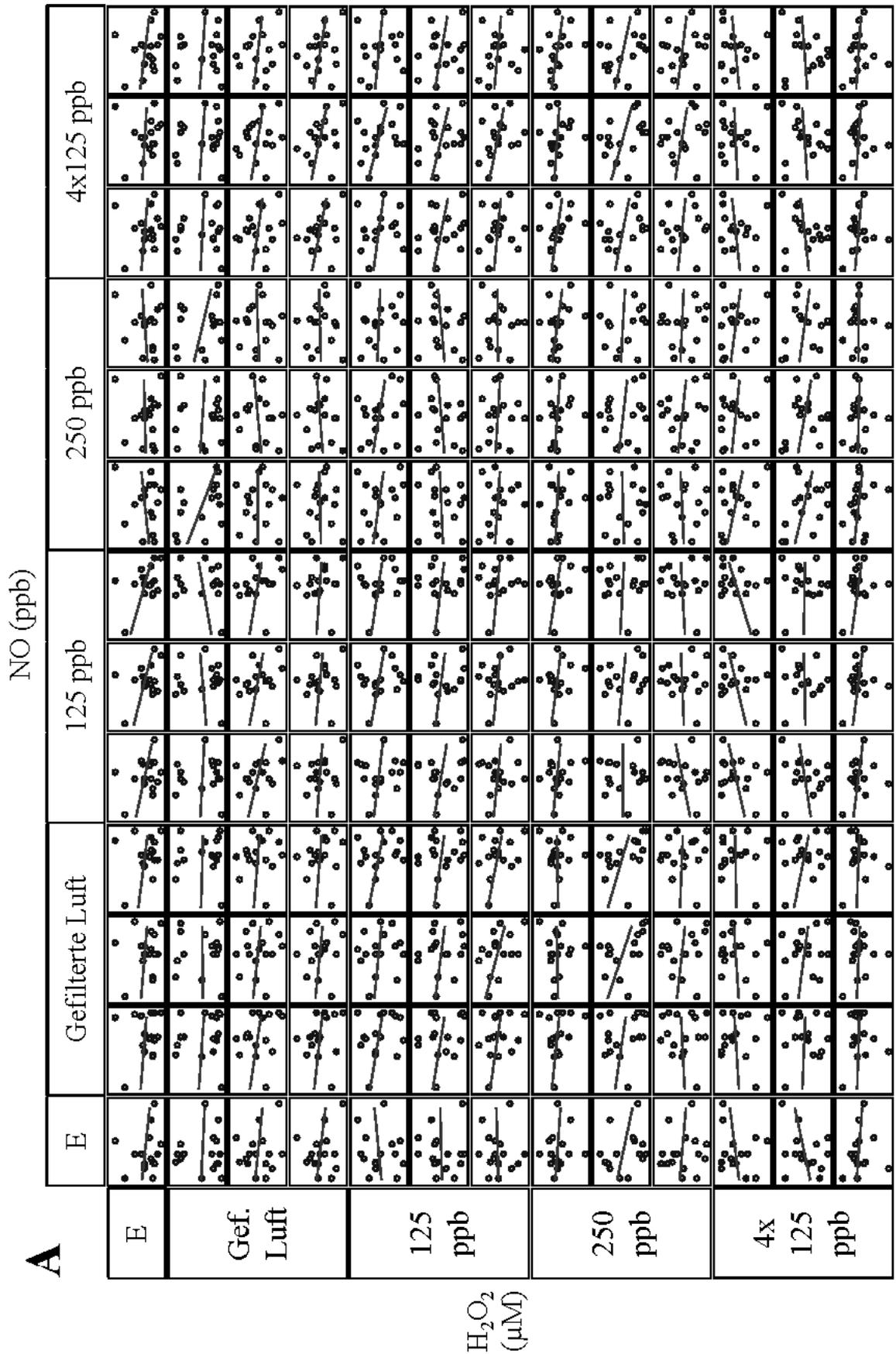
Trug man die Werte von NO gegen die zugehörigen Werte von H₂O₂ auf, sei es für den Einschlusstest oder die Messungen unmittelbar nach Exposition, so war keine Beziehung augenfällig oder statistisch signifikant. Gleiches galt für den Fall, dass man die Werte in Beziehung zueinander setzte, die 1 h oder 6 h nach Allergen bei jeder der verschiedenen Expositionen gewonnen wurden. Da dieser Mangel an Korrelation durch die Tatsache bedingt sein konnte, dass zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in der Konzentration von NO bestanden, nicht jedoch in H₂O₂, wurde die Analyse getrennt für beide Gruppen wiederholt.

Ihr Ergebnis ist in explorativer Form in Abb. 4.13 gezeigt. Während bei den Probanden mit Rhinitis das Muster der Korrelationen uneinheitlich war und in der Regel keine Beziehungen zu erkennen waren (Abb. 4.13A), traten bei den Patienten mit Asthma überzufällig häufig tendenzielle positive Beziehungen auf (Abb. 4.13B). Dies galt in besonderem Maße, wenn vorher 250 ppb oder 4x125 ppb Ozon geatmet wurde ("rechter unterer Block" in Abb. 4.13B), war aber ansatzweise auch bereits bei 125 ppb Ozon zu erkennen. Da die Werte statistisch gekoppelt waren, wurden zur Quantifikation der Korrelation Kovarianzanalysen bezüglich H₂O₂ eingesetzt, mit NO als Kovariater. Jedoch waren die Ergebnisse heterogen und nicht zu interpretieren. Aus diesem Grunde beschränkt sich die gegenwärtige Darstellung auf Abb. 4.13. Aufgrund der hohen Streuung lieferte auch die Korrelation von Änderungen der H₂O₂-Konzentration von mit solchen der NO-Konzentration keine verwertbare Aussage.

Abbildung 4.13: (folgende zwei Seiten) Beziehungen zwischen zum gleichen Zeitpunkt gemessenen Konzentrationen von NO (waagerechte Achsen) und H₂O₂ (senkrechte Achsen) für alle Expositionsmodi. A gibt die Ergebnisse der Rhinitis und B diejenigen des Asthma wieder. In jede der Einzelgraphiken sind zur Verdeutlichung Regressionslinien eingetragen. Die Skaleneinheiten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Man beachte, dass bei den Probanden mit Asthma insbesondere im „rechten unteren Block“ (also nach Exposition gegenüber 250 und 4x125 ppb Ozon) positive Korrelationen zwischen NO und H₂O₂ zu bestehen schienen. Dies war bei der Rhinitis nicht der Fall. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass pro-inflammatorische Effekte auf NO und H₂O₂ bei den Probanden mit der schwereren Grunderkrankung eher miteinander assoziiert waren.

Die Tests sind von oben nach unten bzw. von links nach rechts:

Einschlussuntersuchung (bezeichnet mit „E“)	
Gefilterte Luft	unmittelbar danach
"	1 h nach Allergen
"	6 h nach Allergen
125 ppb Ozon	unmittelbar danach
"	1 h nach Allergen
"	6 h nach Allergen
250 ppb Ozon	unmittelbar danach
"	1 h nach Allergen
"	6 h nach Allergen
4x125 ppb Ozon	unmittelbar danach (vierte Ozonexposition)
"	1 h nach Allergen
"	6 h nach Allergen



4.3.8 Ergebnisse der anderen Messgrößen

Unmittelbar nach Ozonexposition wurden Reduktionen von FEV₁ sowie der inspiratorischen Vitalkapazität (VC) beobachtet, die dem bekannten Muster einer vorwiegend restriktiven Ventilationsstörung folgten [HOLZ [2002]. Bei den Probanden mit Rhinitis trat zusätzlich die Abschwächung der Lungenfunktionsantwort bei wiederholter Exposition zutage. Die Probanden mit Rhinitis zeigten eine Steigerung der unspezifischen Atemwegempfindlichkeit gegenüber Methacholin nach Einatmung von 250 ppb Ozon, wie bekannt [JÖRRES 1996], sowie eine Abnahme der Empfindlichkeit bei wiederholter Exposition. Dies deutet auf eine Toleranzentwicklung analog der Lungenfunktion hin.

Ein Abfall des FEV₁ ≥ 20 % als Kennzeichen einer Frühreaktion auf Allergen trat bei Probanden mit Rhinitis sowie in der Gesamtgruppe gehäuft nach 250 und 4x125 ppb Ozon auf. Analog fand sich ein Abfall von FEV₁ ≥ 15 % als Kennzeichen einer allergischen Spätreaktion bei der Rhinitis gehäuft nach 250 und 4x125 ppb Ozon. Exposition gegenüber gefilterter Luft und nachfolgende Allergengabe bewirkten eine Zunahme der Zahl der Neutrophilen und Eosinophilen sowie der Konzentrationen von Histamin, Tryptase und LDH, als Kennzeichen einer allergeninduzierten entzündlichen Reaktion. Verglichen damit führte die viermalige Exposition gegenüber 125 ppb Ozon zu einem weiteren Anstieg der Zahl der Neutrophilen und Eosinophilen. Bei den Patienten mit Asthma fanden sich zusätzlich erhöhte Konzentrationen von Histamin, Tryptase und LDH. Diese Daten belegen, dass die wiederholte Exposition gegenüber 125 ppb Ozon zu einer Steigerung der Zahl klinisch bedeutsamer Früh- und Spätreaktionen sowie der entzündlichen Antwort auf ein Allergen führen kann.

4.4 NO-Messungen zur Lokalisation anti-entzündlicher Steroideffekte

4.4.1 Wirkung von Steroiden auf NO bei leichtgradigem Asthma

Die Konzentration des ausgeatmeten NO bei einer Flussrate von 50 mL/s nahm sowohl nach FCKW-BDP als auch nach HFA-BDP signifikant ab (jeweils $p < 0,002$); diese Effekte waren nicht statistisch voneinander verschieden. Gleiches galt für die Werte bei 100 mL/s (jeweils $p < 0,002$). Die Werte waren unverändert nach Inhalation von Placebo (Tab. 4.5).

Weder das NO-Produktionsvolumen (V_c) noch der NO-Totraum ($V_{d,anat}$) noch die volumetrische Tiefe der NO-assoziierten Atemwegsentszündung (V_{NOai}) zeigten statistisch signifikante Effekte unter einer der drei Behandlungen (Abb. 4.14). Jedoch sei vermerkt, dass V_{NOai} eine tendenzielle Abnahme von ca. 10 mL nach HFA-BDP aufwies, wohingegen die Werte unter FCKW-BDP oder Placebo stabil blieben (Tab. 4.5).

Sowohl nach FCKW-BDP als auch nach HFA-BDP, nicht jedoch nach Placebo, fanden sich signifikante Verbesserungen des Einsekundenvolumens, FEV₁, (jeweils $p < 0,04$); diese betragen im Mittel 2,6 bzw. 2,4 %. Der Prozentsatz der eosinophilen Granulozyten fiel nach HFA-BDP signifikant um den Faktor 3,8 ($p = 0,022$). Nach FCKW-BDP nahm der Prozentsatz um Faktor 1,3 ab und nach Placebo um Faktor 1,4 zu; beide Effekte waren nicht signifikant.

Tabelle 4.5 - Ergebnisse der NO-Messungen beim leichten Asthma (n=15)

	<i>Placebo</i>		<i>200 µg CFC-BDP</i>		<i>200 µg HFA-BDP</i>		
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	
<i>NO-Konzentration</i> [§]							
bei 50 mL/s	ppb	34,0 ÷ 1,18	32,7 ÷ 1,19	35,5 ÷ 1,22	18,7 ÷ 1,19	33,4 ÷ 1,23	20,2 ÷ 1,20
bei 100 mL/s	ppb	19,4 ÷ 1,16	18,6 ÷ 1,18	20,1 ÷ 1,20	10,9 ÷ 1,17	18,8 ÷ 1,22	11,7 ÷ 1,18
<i>NO-Volumina (Stufenantwort)</i> [§]							
NO-Totraum (<i>V_d</i>)	mL	46,1 ± 4,5	54,5 ± 12,9	37,8 ± 3,9	33,6 ± 3,7	39,8 ± 3,7	36,6 ± 3,9
NO-Produktionsvolumen (<i>V_o</i>)	mL	151,7 ± 11,3	142,6 ± 13,5	149,4 ± 7,8	153,0 ± 11,0	149,8 ± 11,4	143,4 ± 10,7
Summe (<i>V_{NOai}</i>)	mL	197,5 ± 14,4	197,3 ± 12,7	187,2 ± 10,2	186,5 ± 10,9	189,3 ± 14,5	180,0 ± 12,9

Angegeben sind [§]arithmetische (±SEM) oder [§]geometrische Mittelwerte (÷SEM).

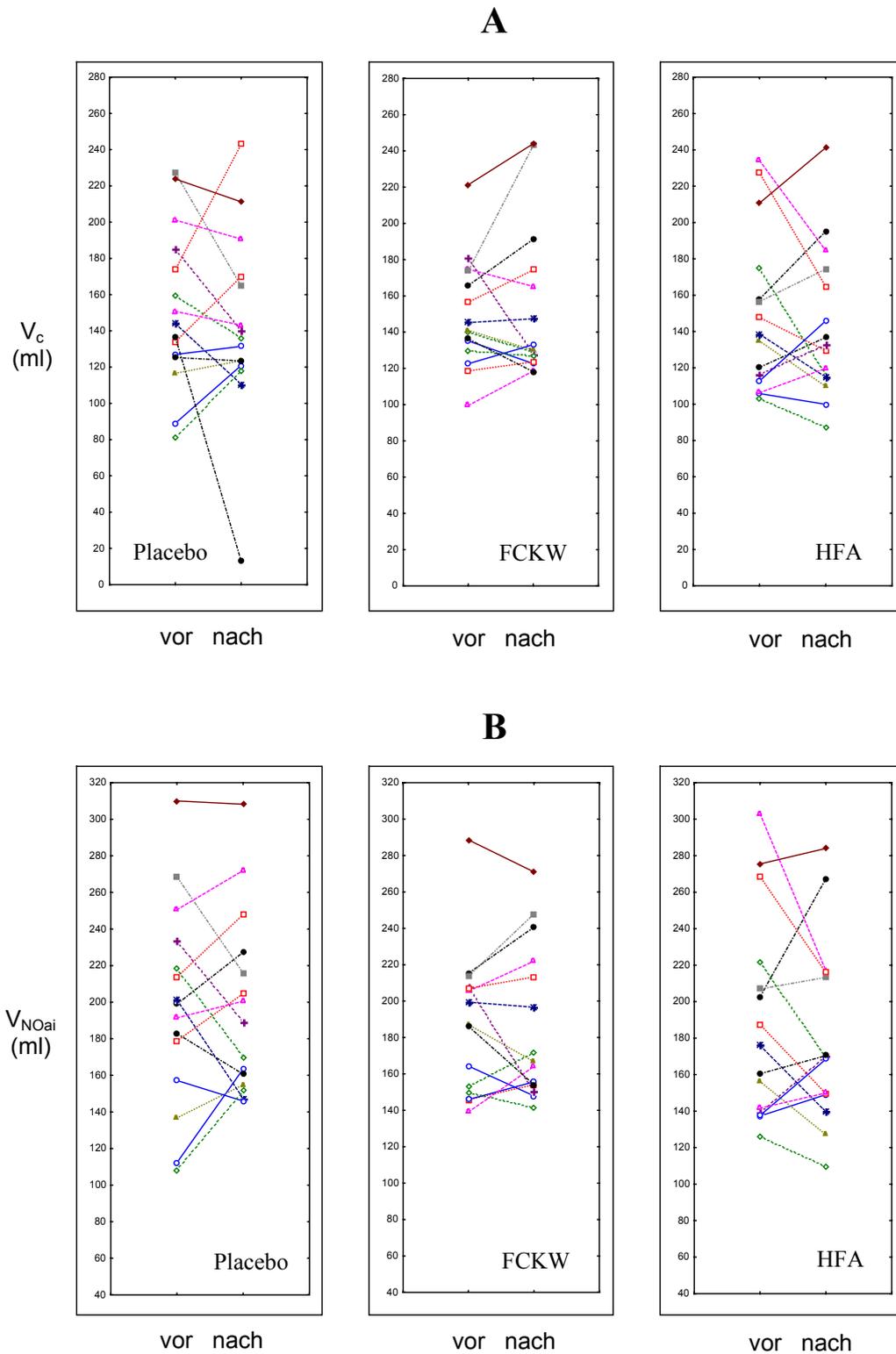


Abbildung 4.14: Untersuchung zum leichtgradigen Asthma. Individuelle Werte des NO-Produktionsvolumens, V_c , (A) und der volumetrischen Tiefe der NO-assoziierten Atemwegs-entzündung, V_{NOai} , (B) vor und nach Inhalation von Placebo (links), FCKW-BDP (Mitte) oder HFA-BDP (rechts) entsprechend Tab. 4.5 (jeweils n=15).

4.4.2 Wirkung von Steroiden auf NO bei mittelschwerem Asthma

Die Konzentration des ausgeatmeten NO bei 50 sowie 100 mL/s zeigte eine statistisch signifikante (jeweils $p < 0,001$) Reduktion nach Gabe von 200 μg FCKW-BDP oder HFA-BDP (Tab. 4.6). Die Effekte unterschieden sich nicht zwischen den beiden Formulierungen, und die Verdopplung der Dosis bewirkte keine weiteren signifikanten Änderungen (Tab. 4.7).

Die Werte des NO-Produktionsvolumens (V_c), des NO-Totraumes ($V_{d,anat}$) sowie ihrer Summe (V_{NOai}) sind in Tab. 4.6 und 4.7 angegeben. Keiner dieser Parameter zeigte einen statistisch signifikanten Effekt von 200 oder 400 μg BDP (Abb. 4.15 und 4.16). Allerdings bestand bei Dosisverdopplung des HFA-BDP eine Tendenz in Richtung einer Abnahme von V_{NOai} , als des numerisch stabilsten und aussagekräftigsten Parameters; diese lag in der Größenordnung von 10 mL und war der oben genannten ähnlich (vgl. 4.4.1).

Sowohl nach 200 μg FCKW-BDP als auch nach 200 μg HFA-BDP zeigte sich eine Verbesserung des FEV_1 (jeweils $p < 0,003$); der Gewinn betrug im Mittel 12,6 bzw. 13,8 %. Die Verdopplung der Dosis brachte keine weitere Zunahme. 200 μg BDP bewirkte eine Reduktion des Prozentsatzes der Sputumeosinophilen (jeweils $p < 0,006$), ohne signifikanten Unterschied zwischen den Formulierungen. Bei Gabe von FCKW-BDP fielen die Werte nach Inhalation von 3, 4 und 5 % Kochsalzlösung um den Faktor 2,2 bzw. 4,5 bzw. 1,4. Nach Gabe von HFA-BDP fielen sie um den Faktor 3,9 bzw. 1,8 bzw. 1,9.

Tabelle 4.6 - Ergebnisse der NO-Messungen beim mittelschweren Asthma im cross-over-Vergleich (n=18)

	Einschluß	200 µg CFC-BDP		200 µg HFA-BDP	
		vor	nach	vor	nach
NO-Konzentration[§]					
bei 50 mL/s	ppb	77,2 ± 1,13	77,4 ± 1,14	38,8 ± 1,08	71,8 ± 1,13
bei 100 mL/s	ppb	44,0 ± 1,12	43,1 ± 1,15	22,1 ± 1,08	39,7 ± 1,13
					32,4 ± 1,12
					19,1 ± 1,12
NO-Volumina (Stufenantwort)[§]					
NO-Totraum (V _a)	mL	10,5 ± 2,6	9,7 ± 2,3	6,8 ± 2,0	8,1 ± 2,0
NO-Produktionsvolumen (V _c)	mL	113,0 ± 8,6	110,3 ± 7,8	106,6 ± 4,8	104,7 ± 5,9
Summe (V _{NOai})	mL	123,5 ± 9,8	119,9 ± 8,8	113,3 ± 5,2	112,8 ± 7,1
					4,2 ± 2,1
					107,4 ± 5,6
					111,6 ± 6,8

Angegeben sind [§] arithmetische (±SEM) oder [§] geometrische Mittelwerte (÷SEM).

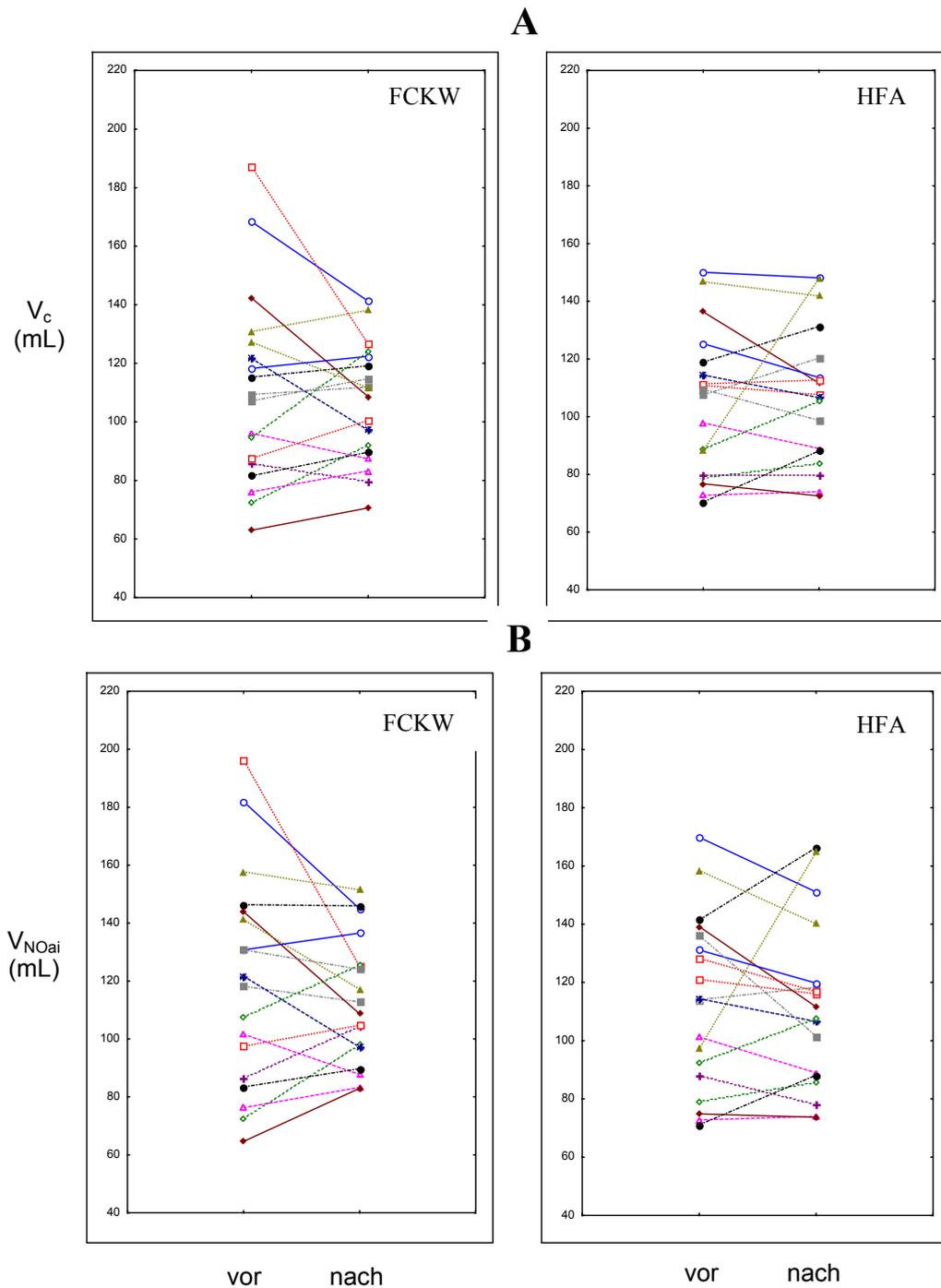


Abbildung 4.15: Untersuchung zum mittelschweren Asthma. Individuelle Werte des NO-Produktionsvolumens, V_c , (A) und der volumetrischen Tiefe der NO-assoziierten Atemwegs-entzündung, V_{NOai} , (B) vor und nach Inhalation von FCKW-BDP (links) oder HFA-BDP (rechts). Dargestellt sind die Ergebnisse des Vergleichs der Inhalation von 200 μg täglich entsprechend Tabelle 4.6 (jeweils $n=18$).

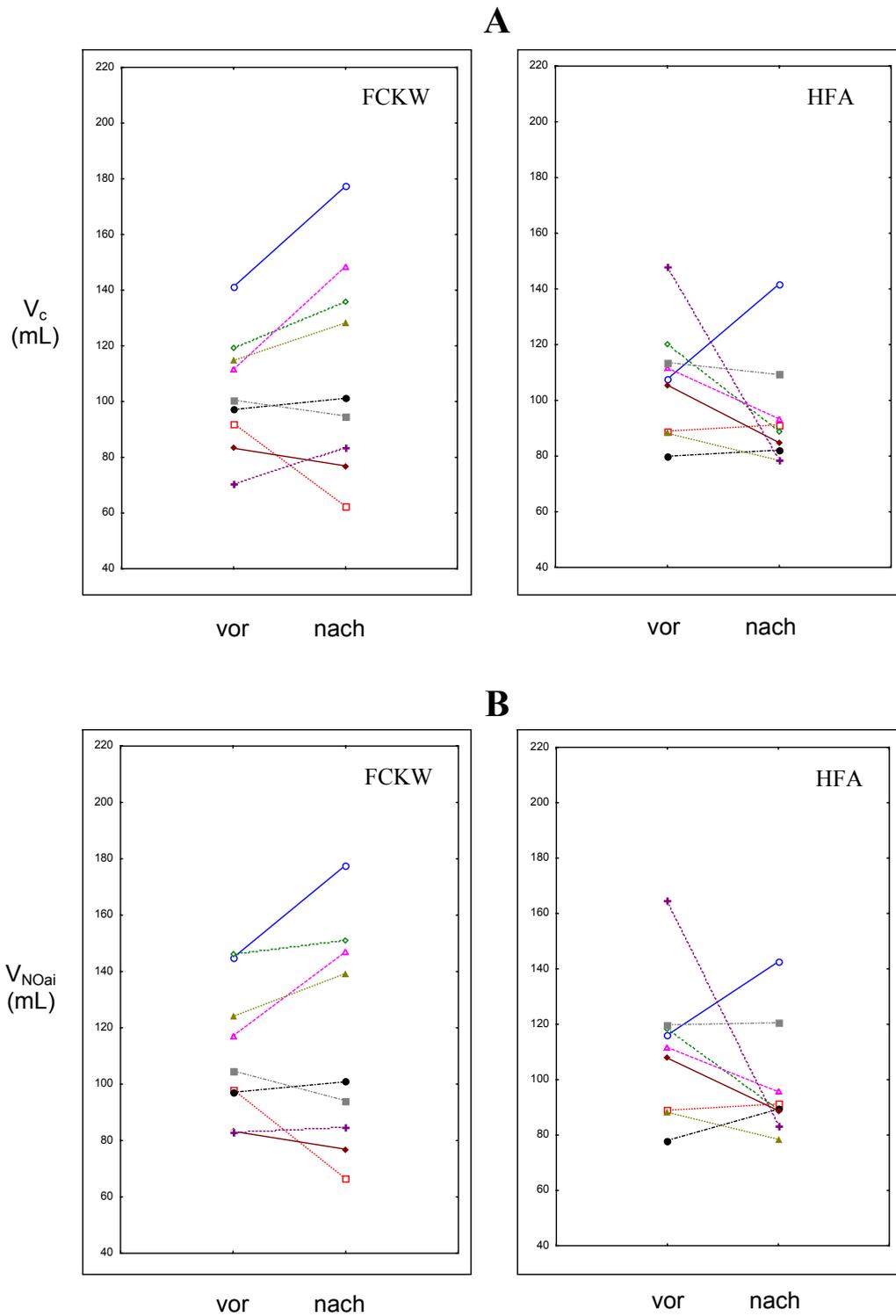


Abbildung 4.16: Untersuchung zum mittelschweren Asthma. Individuelle Werte des NO-Produktionsvolumens, V_c , (A) und der volumetrischen Tiefe der NO-assoziierten Atemwegs-entzündung, V_{NOai} , (B) vor und nach Dosisverdopplung (von 200 auf 400 μg täglich) von FCKW-BDP (links) oder HFA-BDP (rechts) entsprechend Tabelle 4.7 (jeweils $n=9$).

5 Diskussion

5.1 Entstehung des ausgeatmeten NO

Eine Vielzahl von Methoden zur Messung des exhalierten NO wurden bislang eingesetzt, einschließlich kontinuierlicher Messungen während Expiration [KHARITONOV 1996 und 1997, BYRNES 1997, SILKOFF 1997] und der Sammlung der ausgeatmeten Luft in einem Beutel [MASSARO 1995, ROBBINS 1996, SATO 1996, TSUJINO 1996]. Dies ist insofern bedeutsam, als die gemessenen Konzentrationen stark von der Methode abhängen, auch dann, wenn der Beitrag der nasalen NO-Produktion, als einer wesentlichen Quelle von NO in den oberen Atemwegen, ausgeschlossen ist. Obgleich nach wie vor verschiedene Verfahren angewandt werden, insbesondere bei Kindern, wurde die Messung bei einer konstanten Ausatemrate von 50 mL/s inzwischen als Standard etabliert [ATS 1999]. Allerdings ist zu fragen, ob nicht bei einer derartigen, rein phänomenologisch aufgefassten Messung wichtige Informationen über das NO-erzeugende System verlorengehen. Diese potentielle Information wurde in der vorliegenden Arbeit ausgearbeitet.

Grundsätzlich könnte man argumentieren, dass ein Anstieg der Verweilzeit in einem peripheren, alveolären Kompartiment, wie er sich als Folge einer verringerten Ausatemrate ergibt, ebenfalls zu einem Anstieg der NO-Konzentration führen könnte, sogar in Abwesenheit jeder bronchialen NO-Produktion. Jedoch sollte dieser Mechanismus eine Änderung der NO-Konzentration über die Zeit produzieren und nach genügend langer Zeit in einem Gleichgewichtswert von NO resultieren, der nicht von der Ausatemrate abhängt. Die Bronchien fungieren nach dieser Vorstellung als inerte leitende Röhren, die eine zeitliche Verschiebung des Signals hervorrufen. Dieses Argument trifft besonders dann zu, wenn die Einstellung des Gleichgewichts in den Alveolen sehr rasch erfolgt, wie die hohen Werte der Diffusionskapazität für NO nahelegen [BORLAND 1989]. Als Folge dürften die NO-Werte nicht flussabhängig sein, im Gegensatz zur inzwischen vielfach belegten Beobachtung. Ginge andererseits die Einstellung des Gleichgewichts so langsam vor sich, dass sich - gemittelt über unterschiedliche Zeitspannen entsprechend unterschiedlichen Flussraten - deutlich verschiedene NO-Werte ergäben, so wäre die Zeitabhängigkeit von NO im Ausatemsignal klar zu erkennen, wieder im Gegensatz zu der Beobachtung, dass Plateauwerte durchgängig rasch angenommen werden (vgl. Abb. 4.7).

Geht man von der Annahme einer inerten bronchialen Röhre ab, hält jedoch an der Behauptung fest, es bestehe keine signifikante bronchiale NO-Produktion, so müssten die Bronchien während der Ausatmung vermittels Absorption als Senke für alveolär produziertes NO fungieren. Die Folge wäre, dass die NO-Werte mit steigender Flussrate zunehmen müssten, da ja eine kürzere Verweilzeit eine geringere Absorption nach sich zöge. Diese Folgerung widerspricht erneut den Beobachtungen.

Aus diesen Gründen scheint die Annahme eines primär bronchialen Ursprungs des ausgeatmeten NO die einzige Erklärung zu sein, welche sowohl die beobachtete Flussabhängigkeit als auch das rasche Erreichen eines Plateauwertes zu erklären imstande ist. Folgt man dieser Argumentation, so lässt sich vereinfachend konstatieren, dass die Flussabhängigkeit auf die bronchiale Komponente des ausgeatmeten NO verweist, die Zeitabhängigkeit hingegen auf die alveoläre Komponente. Allerdings gilt dieses Argument nur, wenn bei konstanter Ausatemrate die innerhalb der Bronchien selbst verursachten Einstellvorgänge (Transienten) abgeschlossen sind. Die Stufenantworten machen sich gerade derartige Transienten zunutze. Ungeachtet dessen beleuchtet das Argument die grundlegenden Charakteristika der NO-Produktion in der Lunge. Ein Ursprung von NO in den Bronchien wird auch durch direkte intrabronchiale Messungen [SILKOFF 1998] nahegelegt.

Über diese Möglichkeit der Erklärung und Quantifikation hinaus erlaubt das Modell durch Anwendung von Glg. (1), die alveoläre Konzentration von NO, F_{ap} , als unverfälschten Wert zu bestimmen. Im Prinzip ist auch die Zeitkonstante der alveolären Aufnahme, τ_p , bestimmbar, vorausgesetzt, sie ist groß genug, um von bronchial erzeugten Transienten getrennt werden zu können. Da die NO-Abgabe der Bronchien selbst bei hohen Flussraten unvermeidlich ist, lässt sich ohne Anwendung des Modells der alveoläre Wert auch nicht näherungsweise erhalten, wie die großen Unterschiede zwischen F_{ap} und den gemessenen NO-Konzentrationen bei 48 mL/s verdeutlichen. Selbst bei hohen Flussraten um 200 mL/s sind die Unterschiede noch beachtlich.

Ein weiterer Kritikpunkt könnte sein, dass die Vielfalt der parallel und seriell angeordneten Atemwege durch eine einzelne bronchiale Röhre dargestellt wird. Diese Annahme ist jedoch nicht entscheidend für die Gültigkeit des Modells, solange die Atemwege in der Weise parallel arbeiten, dass die mittlere Verweilzeit bzw. Transitzeit sich invers zur Ausatemrate verhält. Nur unter extremen Strömungsbedingungen bzw. bei extremen Änderungen des Aus-

atemmusters sind Abweichungen von dieser Annahme zu erwarten. Das Modell ist in seiner mathematischen Formulierung bemerkenswert robust gegenüber Inhomogenitäten. Ferner waren die angewandten Ausatemraten weit entfernt von extremen Änderungen. Darüber hinaus kann für den Fall einer überwiegend bronchialen Produktion durch die Analyse von Stufenantworten direkt die Gültigkeit der verwandten Annahmen gezeigt werden (vgl. 4.1). Diese Vorgehensweise ist nur beim exhalieren NO möglich, da sie einen schnellen Analysator erfordert, der eine on-line-Messung auch rascher Konzentrationsänderungen erlaubt. Fasst man diese Argumente zusammen, so sprechen sie dafür, den experimentellen Ansatz für stimmig und die Interpretation der Daten für valide zu halten.

Um die theoretische Rate der Abgabe von NO (NO-Output) zu errechnen, müssen die aus Glg. (1) erhaltenen NO-Konzentrationen im steady-state, F_{ex} , mit der jeweiligen Flussrate, \dot{V}_{ex} , multipliziert werden. Da sich die Konzentration des ausgeatmeten NO für hohe Flussraten nur geringfügig ändert, sollte der NO-Output mit steigender Flussrate fast linear zunehmen, in Übereinstimmung mit experimentellen Befunden [SILKOFF 1997]. In der gegenwärtigen Analyse spielte diese Messgröße nur eine untergeordnete Rolle, da sie leicht zu irreführenden Schlüssen verleitet. Insbesondere gibt sie nicht die endogene NO-Produktion an. Vielmehr führt die Abhängigkeit der NO-Transportrate vom Konzentrationsgradienten zwischen bronchialer Wandung und Lumen notwendigerweise zu einem mit der Flussrate veränderlichen Output. Darüber hinaus können im Prinzip Änderungen der alveolären Diffusionskapazität für NO eventuell peripher erzeugtes NO beeinflussen [HYDE 1997]. Daher könnte es sich erweisen, dass die hier vorgeschlagene zentrale, bronchiale, effektive Schleimhautkonzentration von NO (F_{wc}) als atemunabhängige Kenngröße der bronchialen NO-Produktion sowohl der Angabe bloßer Ausatemkonzentrationen als auch der Angabe des NO-Outputs überlegen ist.

Die Unterteilung zwischen zentralem und peripherem Kompartiment ist rein funktionaler Natur. Die Kompartimente dürfen daher nicht ohne weiteres mit anatomischen Kompartimenten identifiziert werden. Das hier vorgestellte Modell erlaubt nur phänomenologische Werte der hypothetischen Parameter zu schätzen, d. h. Werte, welche die Beziehung zwischen den Signalen korrekt beschreiben unter der Annahme, dass das Zweikompartimentenmodell mit seinen unumgänglichen Vereinfachungen zutrifft. Führt man zusätzliche Kompartimente ein, beispielsweise solche, in denen NO durch chemische Reaktionen verlorengeht oder erzeugt wird, so sind diese aufgrund der robusten Struktur des Modells schwerlich als

Änderungen der Form der Eingangs-Ausgangs-Beziehung zu entdecken. Sie können vermutlich nur durch Interventionen beispielsweise pharmakologischer Natur apparent gemacht werden. Auch wenn derartige Eingriffe nicht die prinzipielle Form der Kurve verändern, so beeinflussen sie doch die numerischen Werte der Parameter, die sich aus einem Zusammenspiel der Mechanismen ergeben (vgl. 8.2.5).

Der totale effektive Transferfaktor, K_{awc} , umfasst alle Einzelmechanismen, welche den Gastransport innerhalb der zentralen Atemwege bestimmen. Limitationen des Transports können durch eine Reduktion von Volumen und Oberfläche, eine Zunahme der Dicke der Mukus- bzw. Flüssigkeitsschicht (ELF), welche die Atemwege auskleidet (vgl. Glg. A2.15) oder durch Diffusionsinhomogenitäten innerhalb der Atemwege entstehen. Derartige Begrenzungen bestehen bei Patienten mit Asthma im Zusammenspiel mit veränderten zentralen, mukosalen NO-Konzentrationen. In der Tat deuteten die geschätzten Werte der Parameter an, dass die Probanden mit Asthma eine erhöhte effektive Konzentration von NO in der bronchialen Wandung, jedoch eine niedrigere Transportrate für NO in Form von K_{awc} aufwiesen. Es liegt nahe, erniedrigte Werte von K_{awc} auf Bronchokonstriktion oder Mukus zurückzuführen, doch lässt sich auf der anderen Seite argumentieren, dass eine weiter in die Lungenperipherie reichende Entzündung zu einer größeren NO-abgebenden Oberfläche und somit zu einem höheren Wert führen sollte [SILKOFF 2000]. Zugleich ist zu beachten, dass die korrekte Schätzung von K_{awc} numerischen Schwierigkeiten unterworfen und keineswegs gelöst ist.

Da die Unterschiede zwischen Asthmatikern und Gesunden bei hohen Flussraten unterschätzt werden, ist es ratsam, bei möglichst niedrigen Raten zu messen. Dies hat sich in internationalen Empfehlungen niedergeschlagen, an deren Ausarbeitung der Autor dieser Untersuchung beteiligt war [ATS 1999]. Danach soll eine Flussrate von 50 mL/s gewählt werden, da sie einen guten Kompromiß zwischen Auflösungsvermögen und Störanfälligkeit darstellt. In der vorliegenden Untersuchung war bereits vorausschauend aufgrund der vorgestellten Argumente der Wert von 48 mL/s als Bezugsgröße gewählt worden.

Die Beziehung zwischen den Charakteristika der Atemwegsröhre, dem ausgeatmeten NO und der Flussrate, wie sie durch Glgn. (A2.4), (A2.5) und (A2.12) gegeben ist, bietet gleichzeitig die Möglichkeit, Änderungen der NO-Konzentration nach Gabe von Bronchodilatoren oder -konstriktoren [DE GOUW 1998] zu verstehen. Eine versuchsweise Analyse lässt sich leisten, wenn man unter Annahme des Gesetzes von Hagen-Poiseuille die Änderungen der

Lungenfunktion in entsprechende Änderungen des Atemwegsquerschnitts übersetzt. Während einer Histaminprovokation beispielsweise korrespondiert statistisch gesehen ein Abfall des Einsekundenvolumens FEV_1 von 16-20 % einer Zunahme des Atemwegswiderstandes um 100-147 % [MAGNUSSEN 1985]. Nimmt man in erster Näherung an, dass der Durchmesser der Atemwegsröhre hierbei um 16-20 % abnimmt, so reduziert sich die Oberfläche der Röhre ebenfalls um 16-20 % und das Volumen um 29-36 %. Bei konstanter Volumenflussrate entspricht eine Reduktion des Volumens einer Reduktion der Transitzeit, so dass der NO-Wert fallen sollte. Ebenso sollte die Abnahme der Oberfläche in einem erniedrigten NO-Wert resultieren. Allerdings verbessert sich das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Der totale Transferfaktor (Gln. A2.5 oder A2.9) sollte analog der Oberfläche um 16-20 % abnehmen. Nimmt man probenhalber repräsentative Werte der Parameter von $F_{ap} = 5$ ppb, $F_{wc} = 150$ ppb und $K_{awc} = 25$ oder 50 mL/s an (Abb. 4.3), ferner ein Volumen von 250 mL und eine Flussrate von $\dot{V}_{ex} = 100$ mL/s entsprechend einer Transitzeit von $T = 2,5$ s, so ergibt Glg. (1), dass der NO-Wert der Ausatemluft um 12-16 % fallen sollte. Stärkere Effekte sind zu erwarten, wenn zusätzlich die Dicke der Mukusschicht zunimmt (vgl. Glg. A2.15), sei es aufgrund der Abnahme der Oberfläche, sei es durch Erhöhung der Sekretion. Publierte Daten legen nahe, dass während einer Histaminprovokation ein Abfall des FEV_1 um 15-22 % einem Abfall der NO-Konzentration von 13-20 % im genannten Flussbereich entspricht [DE GOUW 1997].

Ferner wurde gezeigt, dass Bronchodilatoren zu einem Anstieg der NO-Werte führen können, falls die Ausgangswerte der Lungenfunktion niedrig genug liegen, um eine signifikante Verbesserung zu ermöglichen [HO 1997]. Derartige Effekte traten auch bei Patienten mit nahezu normaler Lungenfunktion der Tendenz nach auf, wenngleich sie aufgrund ihres begrenzten Ausmaßes keine statistische Signifikanz erreichten [YATES 1997]. Der Einfluss der Lungenfunktion auf die Konzentration des ausgeatmeten NO ist in jeder Untersuchung zu beachten, die durch Maßnahmen, welche die NO-assoziierte Atemwegsentzündung verändern, parallel die Lungenfunktion des Patienten beeinflusst. Daher wurde beispielsweise in einer der folgenden Untersuchungen (siehe 4.4) der Ansatz gewählt, NO-Messungen nur nach vorheriger Gabe eines Bronchodilators durchzuführen, um nach Möglichkeit die immer gleiche Weite der Atemwege sicherzustellen.

Aufgrund der unvermeidlichen Streuung der Daten und bekannter Schwierigkeiten bei der Anpassung bestimmter Typen von Exponentialfunktionen konvergierte der Anpassungsalgorithmus nicht oder ergab negative Werte der alveolären NO-Konzentration, F_{ap} , bei insge-

samt 37 % der Probanden. Bei den übrigen Probanden fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in F_{ap} zwischen Gesunden und Asthmatikern. Die Werte lagen um mehr als den Faktor 10 niedriger als die geschätzten Werte der bronchialen Schleimhautkonzentration F_{wc} (vgl. Tab. 4.1). Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden daher alle weiteren Schätzwerte anhand des vereinfachten Modells gewonnen, in dem F_{ap} von vornherein auf Null gesetzt und somit die Nichtnegativitätsforderung automatisch erfüllt war. Im Lichte der Zeit und Kooperationsfähigkeit, die erfordert wird, eine große Zahl genauer Messwerte zu erhalten, scheint es für praktische Zwecke ratsam, Glg. (1) in dieser vereinfachten Form zu verwenden. Dies gilt auch für das inzwischen routinemäßig angewandte (vgl. 4.3 und 4.4) und mit vorliegender Arbeit in die Praxis eingeführte Verfahren, angesichts der unvermeidlichen Abweichungen der aktuellen von den Soll-Flussraten die gewünschten NO-Werte bei exakt 50 oder 100 mL/s durch Interpolation mittels Glg. (1) zu gewinnen.

Bei Erkrankungen, die mit einer alveolären Entzündung einhergehen, können die alveolären NO-Werte erhöht sein und sich auch die peripheren NO-Konzentrationen als pathophysiologisch relevant erweisen [LEHTIMAKI 2001]. Diese Werte können durch Anwendung des Modells bzw. der dem Modell zugrundeliegenden Schlussweisen auf valide Weise gewonnen werden. Im Falle des Asthma bronchiale scheint die Hauptinformation in der bronchialen NO-Produktion enthalten zu sein. Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass bei verfeinerter Messtechnik auch den Werten von F_{ap} in Zukunft Bedeutung zukommen wird, zumal eine zusätzliche Entzündung der kleinen Atemwege oder des Lungenparenchyms auch beim Asthma diskutiert wird [KRAFT 1999 und 2001].

Nach Beendigung der Arbeiten, die in dem hier vorgestellten NO-Diffusionsmodell resultierten [vgl. KIRSTEN 1997, JÖRRES 1998], erschienen Publikationen, die in anderer Terminologie ähnliche Ideen verfolgten [TSOUKIAS 1998a,b, PIETROPAOLI 1999, SILKOFF 2000], wiewohl ohne die detaillierte Ausarbeitung, die das Modell nicht als willkürlichen Ansatz, sondern als logische Konsequenz einer Analyse der Daten erscheinen lässt. Diese Arbeiten wurden in der Darstellung des Modells nicht berücksichtigt, da sie zum einen später erschienen und zum anderen nicht über die vorliegende Analyse hinausgeführt haben [JÖRRES 2000a]. In einem Modell, welches nur ein einziges am Gasaustausch beteiligtes Kompartiment beinhaltet [HYDE 1997], muss die Konzentration des ausgeatmeten NO sowohl von der Produktion als auch der Aufnahme von NO bestimmt werden. Ein derartiges Modell erscheint primär geeignet, Phänomene zu beschreiben, die während der Einatmung von NO auftreten.

Das hier beschriebene Zweikompartimentenmodell zielte von vornherein darauf ab, die Vorgänge während der Ausatmung und im besonderen die Abhängigkeit von der Flussrate zu verstehen. Ungeachtet dessen ist es in seiner allgemeinen Formulierung als Differentialgleichung (Glg. A2.3) ebenso geeignet, die Prozesse während Einatmung zu quantifizieren, sofern geeignete Randbedingungen vorgegeben werden. Die Methode der NO-Stufenantwort, als des ersten nicht invasiven Verfahrens zur Lokalisierung der Atemwegsentszündung, wurde darüber hinaus nur in der vorliegenden Untersuchung ausgearbeitet und in der Folge mit verbesserter apparativer Technik eingesetzt, um Effekte einer lokal unterschiedlichen Beeinflussung der NO-Produktion zu messen (vgl. 4.4).

Aufgrund der hohen Diffusionskapazität für NO [BORLAND 1989], die in seiner hohen Affinität zum Hämoglobin begründet ist, ist im alveolären Kompartiment der Transport von NO gegen die Wand gerichtet. Daher wird NO sehr effizient absorbiert. Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit ergab sich, dass die alveoläre NO-Konzentration, die auf distaler Seite als Input in die Atemwegsröhre dient, gering war und verglichen mit den bronchial bedingten Prozessen als zeitunabhängig angesehen werden durfte. Die NO-Konzentrationen änderten sich nicht merklich über die Zeit, wenn konstante Flussraten appliziert wurden und die offenkundigen Einstellvorgänge beendet waren. In dem Modell von HYDE et al. [1997] wurde die Rate des NO-Transportes in den Luftraum mit der NO-Produktion identifiziert und konstant gesetzt. Dementsprechend wurde sie als unabhängig von der Konzentration im Luftraum, d.h. dem „NO-Gegendruck“ angesehen. Die Abhängigkeit von den Atembedingungen wurde durch differentielle Reabsorption erreicht. Ein derartiges Modell kann offenbar allenfalls auf die Lungenperipherie zutreffen, wo die NO-Konzentrationen im Luftraum sehr niedrig sind, muss aber zur Erklärung der Vorgänge in den Bronchien versagen.

Das hier entwickelte Modell baute hingegen auf dem universellen Konzept des Transportes entlang eines Konzentrationsgradienten auf. Nimmt man die NO-Produktion in der Mukosa der Atemwege als konstant an, so würde eine konzentrationsabhängige Transportrate implizieren, dass die NO-Konzentration in der Mukosa stiege, wenn der Nettotransport pro Zeiteinheit, d.h. die Ausatemrate abnähme, und *vice versa*. Grundsätzlich erlaubt das vorgestellte Modell, auch derartige Akkumulations- und Depletionsvorgänge zu berücksichtigen, ebenso wie konkurrierende Austauschraten von NO mit anderen Kompartimenten, insbesondere solchen, die überschüssiges NO entfernen.

Das Modell kann statt auf dem Konzept einer konstanten Schleimhautkonzentration von NO analog auf dem Konzept einer konstanten NO-Produktion in der Mukosa aufgebaut werden. Es fordert dann eine beispielsweise durch chemische Reaktionen realisierte Senke für NO, damit die Schleimhautkonzentration nicht ins Unendliche steigt. Die umfangreiche formal-mathematische Analyse dieses Konzeptes wie auch der Erweiterungen des hier vorgestellten Modells durch zusätzliche Kompartimente wird in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt, da sie in den grundsätzlichen Eigenschaften nicht über die einfachere Beschreibung hinausführt. Nachteil dieser Konzepte ist, dass zusätzliche Parameter eingeführt werden müssen, die phänomenologisch in die apparenten Parameter F_{wc} und K_{awc} eingehen, ohne selbst schätzbar zu sein. Dieser Fall ist beispielsweise gegeben, wenn die zusätzlichen Parameter Quotienten bilden; als einfaches Beispiel vergleiche man Glg. (A2.15). Somit eignen sie sich nur in minderm Maße für praktische Anwendungen, die einen überschaubaren Satz unbekannter Parameter erfordern.

Eben dieser Nachteil ist auch derjenige umfassender Modelle, die im Prinzip analog dem hier dargestellten aufgebaut sind, jedoch eine Vielzahl nicht schätzbarer Parameter enthalten [TSOUKIAS 1998a,b]. Für diese müssen *a priori*-Werte eingesetzt werden, von denen weder bekannt ist, ob sie unter physiologischen Verhältnissen lokal in den Atemwegen zutreffen, noch, ob sie nicht wesentliche Unterschiede zwischen Individuen aufweisen. Die Vielzahl der Parameter ist im Gegenteil geeignet, den Blick auf die wesentlichen Charakteristika des Systems zu verstellen. Dessen ungeachtet sind die Modelle, kontrahiert man sie auf ihre wesentlichen Eigenschaften, dem hier beschriebenen sehr ähnlich. Ein von SILKOFF und Mitarbeitern [2000] vorgestelltes einfaches Modell ist mit dem hier beschriebenen praktisch identisch. Die Autoren verwenden allerdings eine andere Terminologie und eine andere Schätzprozedur, die auf dem NO-Output aufbaut. Sie kommen zu dem Ergebnis, Asthmatiker wiesen höhere statt niedrigere Werte von K_{awc} auf. Zur Zeit ist diese Frage wegen der numerischen Probleme, die bei Flussraten eines begrenzten Variationsbereichs auftreten, ungelöst. Als Ergebnis lässt sich jedoch festhalten, dass das hier beschriebene NO-Transportmodell eine ebenso genaue wie einfache Erklärung der Flussabhängigkeit des ausgeatmeten NO zu bieten vermag. Die dem Modell eigenen Parameter besitzen eine natürliche und physiologisch offenkundige Interpretation. Ferner legen die Stufenantworten nahe, dass das ausgeatmete NO in einer volumetrisch wohldefinierten Region der Atemwege seinen Ursprung hat.

5.2 Flussabhängigkeit des ausgeatmeten H_2O_2

Der experimentelle Ansatz (vgl. 4.2) leitete sich von Argumenten ab, die denjenigen für das exhalierte NO analog waren. Die Ergebnisse der Modellanalyse (vgl. 4.2.3) zeigen, dass die alveoläre Konzentration von H_2O_2 vermutlich verschwindend gering ist verglichen mit der bronchialen Konzentration, ungeachtet des Augenscheins in Abb. 4.10 und 4.11, der bei Flussraten, die gegen Unendlich gehen, auf ein Konvergieren merklich über Null deutet. Ob dies in einer geringen Produktion oder einer hohen Absorptions- bzw. Umsatzrate gründet, ist unbekannt und anhand der Analyse nicht zu eruieren. In jedem Fall scheint die Behauptung belegbar, dass das in 4.1 entwickelte Modell selbst bei Daten mit relativ hoher Variabilität interessante Ergebnisse zu liefern imstande ist.

Die Behauptung, dass das exhalierte H_2O_2 zum größten Teil aus den Bronchien stammt, beruht auf einem indirekten Schluss. Als möglicher Einwand ließe sich anführen, dass dieser Schluss entweder in kritischer Weise von den Details des Modells abhängt oder gar das Modell inadäquat ist. Zunächst mag das Argument zugunsten des Modells zirkulär scheinen, indem es auf der *a priori*-Annahme basiert, dass die alveoläre H_2O_2 -Konzentration niedrig ist. Jedoch ist dies eine der Folgerungen und nicht eine der Voraussetzungen. Der Anstieg der H_2O_2 -Konzentration bei abnehmender Ausatemrate innerhalb eines relativ engen Flussbereiches lässt unter den experimentellen Bedingungen kaum einen anderen Schluss zu als denjenigen, dass die bronchiale H_2O_2 -Erzeugung groß ist im Vergleich zur alveolären (vgl. 4.1). Ferner ist innerhalb der Logik des Modells evident, dass hohe alveoläre H_2O_2 -Konzentrationen bei der Ausatmung zur Absorption innerhalb der Bronchien führen müssten und also die Konzentration von H_2O_2 mit abnehmender Ausatemrate, im Gegensatz zum Messergebnis, fallen müsste. Diese Argumente sprechen dafür, das ursprünglich für NO entwickelte Transportmodell auch im Falle des H_2O_2 für anwendbar und die Schlussfolgerungen für valide zu halten.

Bei der Konzeption der Experimente lag großer Wert darauf, nicht nur die Ausatemrate, sondern auch die Ausatemzeit zu standardisieren. Es ist denkbar, dass die Konzentration von H_2O_2 innerhalb des alveolären Raumes über die Zeit zunimmt, wenn beispielsweise Alveolar-makrophagen viel H_2O_2 produzieren. Daher wäre es möglich, dass bei Sammlung eines fest vorgegebenen Volumens die in der Ausatemluft gemessenen, über die Länge der Ausatmung gemittelten Konzentrationen deshalb ansteigen, weil die Sammlung des Volumens bei niedri-

ger Flussrate mehr Zeit erfordert. Mit den zur Verfügung stehenden Analyseverfahren sind nur mittlere Konzentrationen von H_2O_2 messbar. Somit könnte eine Flussabhängigkeit vorge-täuscht werden, die in Wirklichkeit einer Zeitabhängigkeit entspringt.

Um diesen Fehlschluss zu vermeiden, wurde die Zeit der Ausatmung bei allen Flussraten auf 20 s festgelegt. Dies allerdings resultierte in unterschiedlichen Volumina gesammelter Ausatemluft. Dementsprechend erhöhte sich bei niedrigen Flussraten der Volumenanteil der Bronchien bzw. des Totraumes im Vergleich zum Anteil der Alveolen. Ein derartiger Fehler würde jedoch eine Flussabhängigkeit eher abschwächen als erzeugen. Ferner war zu erwarten, dass dieser Effekt nur gering war, sofern man die niedrigste und die höchste verwandte Flussrate einem bronchialen Gesamtvolumen von 100-200 mL gegenüberstellte. Selbst bei der niedrigsten Ausatemrate entfielen demgemäß nur maximal 4 von 20 s auf den initialen Beitrag des bronchialen Volumens. Der Fall gegenläufiger, sich zufällig aufhebender systematischer Fehler in der Sammlung des Atemkondensats kann als unwahrscheinlich gelten. Diese Argumente sprechen dafür, die beobachtete Flussabhängigkeit des ausgeatmeten H_2O_2 als real anzusehen trotz des methodologisch bedingt kleinen Bereiches der untersuchten Flussraten.

Die Probanden mit Asthma wiesen nur eine leichtgradige Erkrankung auf, da als Therapie die gelegentliche Inhalation von β_2 -Agonisten genügte. Daher stehen die vorliegenden Daten nicht im Widerspruch zu Arbeiten, in denen eine erhöhte H_2O_2 -Konzentration bei Asthmatikern berichtet wurde [JÖBSIS 1997, HORVATH 1998]. Dies gilt um so mehr, stellt man die erhebliche Streuung der publizierten Daten und die kleine Fallzahl der vorliegenden Untersuchung in Rechnung.

Die Ausatemraten in der vorliegenden Untersuchung lagen niedriger als die Raten, die im Mittel während normaler Ausatmung erzielt werden. Dies bot den Vorteil, die Flussabhängigkeit leichter auffinden zu können, da sie bei niedrigen Ausatemraten stärker zutage tritt. Auch ließe sich argumentieren, dass in der Praxis die Gewinnung des Atemkondensates bei geringen, exakt standardisierten Flussraten zu höheren H_2O_2 -Konzentrationen führt und somit die Zahl von Messungen, deren Werte unterhalb der Nachweisgrenze fallen, kleiner sein sollte. Allerdings verlangen die Atemmanöver eine wesentlich stärkere Mitarbeit des Probanden als die Messung während Normalatmung. Aufgrund des flachen Verlaufs der Konzentrations-Fluss-Kurve bei höheren Flussraten schlägt im Frequenzbereich der Ruheatmung die Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration von der Ausatemrate nicht wesentlich zu Buche. Daher

ist es wenig wahrscheinlich, dass die Flussabhängigkeit eine wesentliche Ursache der Variabilität ist [z.B. JÖBSIS 1997, 1998]. Aus diesem Grunde wurde in der folgenden Untersuchung (vgl. 4.3) Ruheatmung gewählt, um die zur Probensammlung notwendige Zeit so kurz wie möglich zu halten. Ferner wurde als Konsequenz der hohen Variabilität die Messung von H_2O_2 derart in das Protokoll integriert, dass ein Vergleich von Werten primär zwischen solchen erfolgte, die innerhalb eines Tages erhoben wurden.

Da eine Analyse der hier durchgeführten Art standardisierte Atemmanöver verlangt, sollte sie zugleich in der Lage sein, die Untergrenze der Variabilität wiederholter Messungen zu liefern. Die Analyse des exhalieren H_2O_2 erfolgte bislang, indem Probanden in unkontrollierter Weise in ein Gerät atmeten, das der Gewinnung von Atemkondensat diene, und die methodologischen Fragen waren im wesentlichen auf solche nach geeigneten Nachweisverfahren beschränkt [vgl. DE BENEDETTO 2000, ZAPPACOSTA 2001, VAN BEURDEN 2002b]. Angesichts des Fehlens von real-time-Messmöglichkeiten von H_2O_2 ist eine Korrektur während des Messvorgangs praktisch unmöglich. Selbst unkritisch nachzuweisende Gase wie CO_2 zeigen darüber hinaus eine Abhängigkeit vom Atemmuster. Somit erschien es möglich, dass die verglichen mit NO hohe Variabilität [vgl. JÖBSIS 1997, 1998] zumindest teilweise in einer mangelhaften Kontrolle der Atmung begründet war. Die gegenwärtigen Daten lassen dies jedoch fraglich erscheinen und ergeben Variationskoeffizienten ähnlich in der Literatur berichteten Werten von ca. 50 % [VAN BEURDEN 2002a]. Diese Werte scheinen zu hoch im Lichte der Anforderungen an ein individuelles Monitoring. Auf den zusätzlichen Beitrag der circadianen Rhythmik zur Variabilität sei ausdrücklich verwiesen (vgl. 5.3). Die vorliegenden Daten erlauben somit keinen Schluss darüber, ob und inwieweit das exhalierete H_2O_2 einen Stellenwert im Monitoring der Atemwegsentzündung besitzen wird.

Trotz der geringen Reproduzierbarkeit ist möglicherweise ein Nutzen bereits anhand qualitativer Ergebnisse zu erzielen, insbesondere bei Entwicklung halbleiterbasierter, rasch anzeigender Sensoren für H_2O_2 , die eine breitere Datenbasis zu liefern instande sind. Dies gilt in besonderem Maße für die große Gruppe der Patienten mit COPD, da bei diesen in der Mehrzahl der Fälle weder eine NO-Messung noch eine Sputuminduktion relevante Informationen erbringt. Hier erscheint die H_2O_2 -Messung auch deshalb interessant, weil H_2O_2 nach den vorliegenden Ergebnissen seinen Ursprung in den Bronchien hat und somit helfen könnte, die bronchitische Teilkomponente innerhalb des Gesamtkomplexes der COPD zu isolieren. Gleiches trifft zu für Noxen wie Ozon, die bekanntermaßen einen oxidativen Stress ausüben.

Die wissenschaftliche Anwendung erscheint von den genannten Einschränkungen weniger berührt, da sie sich geeigneter Designs bedienen kann, um die Variabilität in Grenzen zu halten.

5.3 Wirkung entzündlicher Stimuli (Ozon/Allergen) auf NO und H₂O₂

Die Änderungen bzw. Unterschiede der Konzentrationen von NO und H₂O₂ in der Ausatemluft nach Ozonexposition und/oder Allergeninhalation (vgl. 4.3) folgten keinem einfachen Muster, das als Verstärkung entzündlicher Effekte oder als ihre Interaktion zu deuten wäre. Ferner waren sie von Änderungen anderer Variablen begleitet, die vermutlich mit den Messungen interferierten.

Vor Beginn der Untersuchung war unklar, welche Beziehungen zwischen den Konzentrationen von NO und H₂O₂ in der Ausatemluft bei Probanden mit allergischer Rhinitis oder leichtgradigem allergischem Asthma zu erwarten waren. Einerseits ließ sich argumentieren, dass beides Marker entzündlicher Aktivität seien, die einen weitgehend parallelen Verlauf zeigen sollten, andererseits erschienen unabhängige Verläufe möglich, sofern man NO vorzugsweise mit eosinophilen Granulozyten und H₂O₂ mit anderen Entzündungszellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten assoziierte (vgl. 1.1 und 1.2). Somit erschien als plausible Hypothese, unmittelbar nach Ozon erhöhte Werte von H₂O₂, nicht jedoch von NO zu erwarten. Diese Hypothese ist sinnvoll, da der Einstrom von Neutrophilen sehr rasch erfolgt und bereits kurze Zeit nach einer 3 h dauernden Ozonexposition nachzuweisen ist [HOLZ 1999].

Im Gegensatz zu dieser Erwartung induzierte in der vorliegenden Untersuchung Ozon auch in einer Konzentration von 250 ppb keine wesentlichen Änderungen der H₂O₂-Konzentration (Tab. 4.4). Dass die Werte von H₂O₂ bei den wiederholten Expositionen von Anfang an tendenziell höher lagen, muss als Abweichung innerhalb der Grenzen der Variabilität gewertet werden.

Das exhalierete NO zeigte in der Regel verglichen mit der Einschlussuntersuchung erhöhte Werte unmittelbar nach Exposition, nicht jedoch nach 250 ppb Ozon. Die Tatsache, dass auch nach Einatmung gefilterter Luft die Werte höher lagen, muss als Indiz dafür gelten, dass die 3-stündige intermittierende Fahrradbelastung selbst die Ursache einer erhöhten NO-Abgabe

war. Wollte man diesen Effekt auf Veränderungen der Lungenfunktion zurückführen, die in einem vermehrten Transport von NO in die Bronchien resultierten (vgl. 4.1), so hätte man erhebliche Verbesserungen der Funktion fordern müssen. Diese wurde jedoch von gefilterter Luft, 125 ppb Ozon oder 4x125 ppb Ozon nicht oder nur unwesentlich beeinflusst, und keinesfalls im Sinne einer Verbesserung. Die vor den NO-Messungen erfolgenden Lungenfunktionsmessungen hätten ebenfalls im Prinzip die Werte beeinflussen können, jedoch eher im Sinne einer Ab- als einer Zunahme [SILKOFF 1999].

Mögliche Erklärungen verbleiben somit weitgehend im Spekulativen [vgl. SHEEL 1999]. Denkbar wäre weniger eine Zunahme der NO-Produktion in der relativ kurzen, zur Verfügung stehenden Zeit als rasch eintretende Änderungen der Fähigkeit, NO in die Bronchien abzugeben. Da eine Vergrößerung der bronchialen Oberfläche ausscheidet, könnten u.a. Effekte der Zirkulation eine Rolle gespielt haben. Wenn die NO-Aufnahme in den Kreislauf sich verringert, ist eine mit dem bronchialen Lumen konkurrierende Senke für NO in ihrer Wirkung reduziert, so dass sich erhöhte Werte ergeben sollten. Andererseits könnten Änderungen der Zusammensetzung des bronchialen Flüssigkeitsfilmes eine Erklärung bieten. Da die eingeatmete Luft eine Relative Feuchte von ca. 50 % besaß, sind Austrocknungseffekte denkbar, die zu einer Reduktion der Barrierefunktion oder konkurrierender chemischer Reaktionen von NO führten. Austrocknungseffekte allerdings wurden dadurch minimiert, dass die Probanden zu reichlicher Flüssigkeitsaufnahme angehalten waren. Diese Fragen sind nur durch Vergleich verschiedener Expositionsbedingungen im Rahmen neuer Untersuchungen zu klären.

Einzig nach Inhalation von 250 ppb Ozon war die Konzentration von NO niedriger als nach Einatmung gefilterter Luft. Jedoch war dieser Effekt von einer Verschlechterung der Lungenfunktion begleitet. Auch wenn diese vorwiegend den Charakter einer restriktiven Ventilationsstörung trug [vgl. JÖRRES 1996] und die obstruktive Komponente gering war, so ist nicht auszuschließen, dass diese Änderung zu einer Erschwerung des NO-Transports in das bronchiale Lumen geführt hat und daher die Reduktion der Ausatemkonzentration erklärt. Ebenso ist denkbar, dass Residuen der Ozonreaktion in Form vermehrten Mukus oder leichtgradiger ödematöser Veränderungen zu einer Abnahme der gemessenen Werte geführt haben. Auffällig war, dass die NO-Werte am nächsten Morgen, 1 h nach Inhalation des Allergens, noch erniedrigt waren relativ zu denen der anderen Expositionsbedingungen. Auch hier ist jedoch zu beachten, dass die per Lungenfunktion quantifizierte Allergenreaktion durch 250 ppb Ozon verstärkt wurde (vgl. 4.3.8). Andererseits war diese Verstärkung derjenigen von

4x125 ppb Ozon gleichwertig, und hier war die NO-Konzentration 1 h nach Allergen nicht reduziert. Die beobachteten Effekte waren insgesamt relativ klein, und statistisch abgesicherte Schlussfolgerungen erscheinen nicht möglich, zumal in der Analyse vermieden wurde, durch eine übergroße Zahl von Vergleichen den Fehler I. Art anzuheben und falsche Signifikanzen zu produzieren.

Bisherige Daten zur Wirkung von Ozon auf NO beim Menschen sind widersprüchlich. Einerseits wurden erhöhte Werte des ausgeatmeten NO mit Spitzenwerten der Ozonkonzentration am Arbeitsplatz in Verbindung gebracht und als Indikatoren einer bronchialen Entzündung gewertet [OLIN 1999]. Andererseits jedoch fiel nach einer kontrollierten Exposition, in der 200 ppb Ozon über 2 h eingesetzt wurde, sowohl die bronchiale als auch die nasale NO-Konzentration leicht ab und war 6 und 24 h nach Exposition wieder auf Normalniveau [OLIN 2001]. Es ist offen, ob diese Diskrepanzen Wirkungen einer temporären Änderung der Lungenfunktion waren, analog den hier nach 250 ppb Ozon beobachteten Effekten, oder einen differentiellen Effekt hoher und niedriger Ozonkonzentrationen widerspiegelten.

In jedem Falle jedoch war es plausibel, erhöhte Werte von NO nach der Inhalation des Allergens während der Phase der allergischen Spätreaktion zu erwarten. Hierbei stand zu beachten, dass die Effekte nicht maximal sein konnten, da aus Gründen der zeitlichen Realisierbarkeit der Untersuchung und wegen der Sputuminduktion die Messung von NO nur ca. 6 h nach Allergengabe erfolgen konnte. Möglicherweise wären zu einem späteren Zeitpunkt stärkere Effekte aufgetreten [KHARITONOV 1995]. Ungeachtet dessen waren die Werte von NO 6 h nach Allergen relativ zu denen 1 h nach Allergen erhöht. Auch hier ist ein *caveat* angebracht insofern, als Änderungen der Lungenfunktion die Werte beeinflusst haben könnten. Die Messung 1 h nach Allergengabe erfolgte in der Regel zu einem Zeitpunkt, an dem der allergeninduzierte Abfall des FEV₁ auf 10 % oder weniger zurückgegangen war. Die mittlere Abnahme des FEV₁ während der allergischen Spätreaktion lag ebenfalls um 10 % [HOLZ 2002] und war somit der Änderung während der Frühreaktion ähnlich. Daher erscheint ein Effekt der Lungenfunktion wenig wahrscheinlich. Die Zunahme von NO ist vermutlich direkter Ausdruck der entzündlichen, eosinophilen Atemwegsreaktion, welche ebenfalls mittels des induzierten Sputum nachgewiesen werden konnte (vgl. 4.3.8).

Beim Versuch einer Erklärung des Befundes, dass die NO-Konzentration 1 h nach Allergen niedriger lag als 6 h nach Allergen bzw. unmittelbar nach Exposition, ist neben den

genannten physiologischen oder zellulären Faktoren in Rechnung zu stellen, dass die erstgenannte Messung in der Regel morgens stattfand, die anderen Messungen hingegen mittags oder nachmittags. Dies hatte seinen Grund darin, dass die Exposition in der Regel vormittags erfolgte und die Allergenprovokation am nächsten Morgen 20 h nach der (letzten) Exposition. Aus diesem Grunde könnte eine circadiane Rhythmik zu dem beobachteten Verlauf beigetragen haben, sofern man eine Zunahme der NO-Werte über den Tagesverlauf annimmt.

Diese Möglichkeit gilt es besonders zu beachten angesichts der Homogenität des beobachteten Musters unter allen Expositionsbedingungen. Leider ist die Literatur zur circadianen Rhythmik von NO spärlich. Sie weist allenfalls auf marginale Unterschiede im Tagesverlauf hin. Es wurden sowohl erhöhte morgendliche im Vergleich zu abendlichen Werten [MATTES 2002] als auch erniedrigte nächtliche im Vergleich zu nachmittäglichen Werten [GEORGES 1999] berichtet, letzteres bei Patienten mit nächtlichem Asthma. Im Falle, dass NO mit akuten Änderungen der eosinophilen Entzündung gekoppelt ist, wären morgens höhere NO-Konzentrationen zu erwarten gewesen statt niedrigerer Konzentrationen wie beobachtet. Ein möglicher Indikator der akuten Eosinophilie ist die bronchiale Überempfindlichkeit [GRÖNKE 2002]. Eine circadiane Rhythmik der Überempfindlichkeit ist beim Asthma mehrfach nachgewiesen [BONNET 1991], und eine nächtliche Zunahme der Eosinophilie im Lungengewebe wurde ebenfalls berichtet [KRAFT 1999]. Auffällig ist, dass die Werte 1 h nach Allergengabe im gleichen Bereich lagen wie die Werte der Einschlussuntersuchung und die anderen Werte vergleichsweise erhöht waren. Da die Einschlussuntersuchungen in der Regel gegen Mittag oder Nachmittag erfolgten, könnte eine morgendliche Depression der NO-Werte in der Tat eine Erklärung sein. Diese Möglichkeit ist nicht zweifelsfrei gegen die alternativen Erklärungen (s.o.) abzusetzen bzw. auszuschließen.

Die Werte des ausgeatmeten H_2O_2 zeigten ein ähnliches Muster wie das NO. Allerdings erreichten die Effekte in der Regel nicht die statistische Signifikanz, da die Variabilität wesentlich höher war. Bemerkenswert war, dass - im Gegensatz zum NO - die H_2O_2 -Konzentrationen 1 h nach Allergen in der Gruppe mit Rhinitis und der Gesamtgruppe niedriger lagen als die Werte der Einschlussuntersuchung (Tab. 4.4).

Daten zur circadianen Rhythmik des ausgeatmeten H_2O_2 sind ebenfalls rar. Nur zwei Arbeiten wurden unlängst publiziert. Die eine berichtete niedrigere Werte um 8 Uhr morgens verglichen mit 12 Uhr mittags; allerdings nahmen die Werte gegen 20 Uhr wieder ab [NOWAK

2001]. Die andere fand eine stete Zunahme von 9 bis 15 Uhr sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit leichtgradiger COPD [VAN BEURLEN 2002a]. Da ein Tagesgang der H_2O_2 -Konzentration zur Erklärung der hier dargestellten Befunde beitragen konnte, erfolgten bereits vor Bekanntwerden dieser Arbeiten eine Reihe von Messungen, bei denen Probanden ($n=10$) zu zwei verschiedenen Tageszeiten mittels der hier verwandten Methode gemessen wurden. Im geometrischen Mittel (\pm SEM) und unter Verwendung einer mittleren Eichgeraden ergaben ebenfalls niedrigere Konzentrationen von H_2O_2 am Vormittag ($0,18 \pm 1,2 \mu\text{M}$) als am Nachmittag ($0,46 \pm 1,1 \mu\text{M}$); diese Werte waren im t-Test signifikant verschieden ($p=0,0006$). In der vorliegenden, komplexen Untersuchung, die einen langen Zeitraum in Anspruch nahm, waren jedoch angesichts der hohen Variabilität keine statistisch absicherbaren Aussagen bezüglich H_2O_2 möglich. Überdies müssen wie beim NO zusätzliche Faktoren (s.o.) als Erklärung in Betracht gezogen werden.

Neben den Beziehungen zwischen H_2O_2 und NO, die durch parallele oder divergente zelluläre Reaktionen bedingt sind, sind Korrelationen denkbar, die auf ihre chemische Interaktion innerhalb der Schleimhaut zurückzuführen sind. NO kann mit reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) reagieren und insofern aus dem Pool entfernt werden, der für den Übertritt in die Gasphase bzw. das Atemwegslumen zur Verfügung steht. Dies gilt in besonderem Maße für die Reaktion mit dem Superoxid-Anion-Radikal $\text{O}_2^{\cdot-}$, die zur Bildung von Peroxynitrit führt (vgl. 1.1). Nimmt man an, dass das ausgeatmete H_2O_2 als Indikator der ROS fungieren kann, so bestünde - zumindest oberhalb von Schwellenkonzentrationen - die Möglichkeit, dass sich die Konzentrationen von H_2O_2 und NO wechselseitig begrenzen. Andererseits ist die Produktion von H_2O_2 über die SOD direkt an diejenige von $\text{O}_2^{\cdot-}$ gekoppelt. Dies würde einen parallelen Verlauf bei paralleler Induktion der Produktion von NO und $\text{O}_2^{\cdot-}$ begünstigen.

In den vorliegenden Daten fanden sich keine Hinweise auf wechselseitige Limitationen des exhalieren NO und H_2O_2 , vermutlich weil die Ausgangswerte aufgrund der alleinigen Rhinitis oder des leichtgradigen Asthma nicht in Extrembereichen lagen und die Effekte von Ozon und Allergen moderat waren. Die Beziehungen zwischen den ozon- und allergeninduzierten Änderungen von H_2O_2 und NO ergab keine Häufung von Korrelationen, die sich gegen Zufallseffekte absetzte. Verglich man die absoluten Konzentrationen von NO und H_2O_2 über die Gruppen, so schienen in der Gruppe der Asthmatiker positive Korrelationen überzufällig häufig erkennbar (vgl. Abb. 4.13B). Hingegen zeigten die Probanden mit Rhinitis keinerlei

Muster, vermutlich als Folge der niedrigen Konzentrationen des exhalieren NO. Es sei ausdrücklich bemerkt, dass die Untersuchung daraufhin konzipiert war, im Mittel moderate Effekte auszulösen, um Umweltbedingungen experimentell so weit als möglich zu simulieren. Umwelteinflüsse rufen häufig im Mittel nur geringe Effekte hervor, können aber im Einzelfall zu klinisch bedeutsamen Reaktionen führen.

Als Ergebnis vorstehender Überlegungen ergibt sich, dass - zumindest mit den heute zur Verfügung stehenden Messmöglichkeiten - die Analyse des ausgeatmeten H_2O_2 kein nennenswertes Potential bietet, akute pro-inflammatorische Effekte nachzuweisen, wie sie die Inhalation von Ozon oder Allergenen hervorruft. H_2O_2 zeigte nur dann eine akzeptable Variabilität, wenn im Abstand weniger Stunden gemessen wurde (vgl. Abb. 4.12B). Diese Ergebnisse gehen mit denen aus Kap. 4.2 konform. Die fehlende Reproduzierbarkeit über Wochen und Monate macht Vergleiche unmöglich, die sich aufgrund methodologischer Forderungen, beispielsweise immunologisch bedingter Wartezeiten, über einen langen Zeitraum erstrecken. Obgleich das ausgeatmete H_2O_2 allenfalls geeignet scheint, kurzzeitige Effekte zu erfassen, implizieren diese Ergebnisse keineswegs, dass die Analyse von H_2O_2 nicht von Wert sein könnte, soweit massive Änderungen der Oxidantienproduktion auftreten.

Im Gegensatz zum H_2O_2 zeigte die Messung des ausgeatmeten NO eine wesentliche bessere Reproduzierbarkeit auch über längere Zeiträume (Abb. 4.12A). Dies führte zu einer größeren Zahl als statistisch signifikant erkennbarer Effekte von Ozon und Allergen, sogar separat in den Probanden mit Rhinitis oder Asthma trotz der geringeren Fallzahlen. Allerdings wirft die Interpretation Probleme auf. Betrachtet man die Allergenreaktion für sich, so kann die Erhöhung der NO-Werte 6 h relativ zu 1 h nach Allergengabe noch mit einiger Wahrscheinlichkeit als Indiz der allergischen Spätreaktion gewertet werden. Dies ist ein Erfolg, da das Ergebnis auf vollständig nicht invasive Weise erhalten wurde. Die Effekte des Allergens auf die Eosinophilenzahl im Sputum waren sehr viel größer, aber auch variabler, so dass das Niveau der statistischen Absicherung sogar geringer war [HOLZ 2002].

Andererseits ist bekannt, dass der Expositionstest als solcher bei ähnlichen Probanden und Anwendung ähnlicher Methoden keine Änderung der Eosinophilenzahl im Sputum bewirkt, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Ozon [HOLZ 1999]. Im Gegensatz dazu schien in der vorliegenden Untersuchung bereits die Einatmung von gefilterter Luft zu einem Anstieg der NO-Werte zu führen, die von 250 ppb Ozon hingegen zu einem relativen Abfall.

Darüber hinaus ist unklar, wie die relativ dazu wiederum erniedrigten Werte von NO 1 h nach Allergen zu interpretieren sind. Handelt es sich um den Ausdruck einer circadianen Rhythmik, so wird die Interpretation der Spätreaktion 6 h nach Allergen fraglich. Handelt es sich hingegen um eine Spätfolge der Ozonreaktion, wie durch die bei 250 ppb beobachteten Werte nahegelegt, so gestaltet sich die weitere Deutung schwierig. Persistierende Effekte von Ozon in Abwesenheit von Allergen sind allenfalls durch Analyse der wiederholten Expositionen zu eruieren. In der Gruppe mit Rhinitis zeigte sich ein signifikanter Anstieg, in derjenigen mit Asthma ein signifikanter Abfall der NO-Werte über die vier Expositionen. Da diese Werte als Ausgangswerte der Allergenreaktion fungieren, ist somit bei der Interpretation des Allergeneffektes Vorsicht angebracht.

Aufgrund methodologischer Begrenzungen wurde darauf verzichtet, die Modellanalyse (vgl. 4.1) im gegenwärtigen Fall anzuwenden. Jedoch fand sie insofern Eingang, als durchweg mit Hilfe des zweiparametrischen NO-Transportmodells (vgl. 3.1.1) bei 50 mL/s interpolierte Werte von NO verwandt wurden. Die Tatsache, dass relativ geringe ozon- und allergeninduzierte Effekte einer gegenüber Artefakten anfälligen Messgröße als statistisch signifikant aufgelöst werden konnten, geht vermutlich zu einem Teil auf diesen Gewinn an Genauigkeit zurück. Ungeachtet aller vorgenannten Einschränkungen besitzt die Messung des ausgeatmeten NO ein hohes Potential zur Analyse entzündlicher Atemwegsreaktionen. Hierbei scheint es erstrebenswert, gleichzeitige Änderungen von Variablen, die den Messwert beeinflussen, möglichst gering zu halten; dazu gehört vor allem die Lungenfunktion. Dieses Ziel ist möglicherweise durch die Untersuchung moderater anti-inflammatorischer statt pro-inflammatorischer Effekte leichter zu erreichen.

5.4 NO-Messungen zur Lokalisation anti-entzündlicher Steroideffekte

Es ist bekannt, dass die Reduktion der Partikelgröße beim HFA- verglichen mit dem FCKW-Dosieraerosol zu einer Erhöhung des Anteils von Partikeln führt, die in die kleinen Atemwegen oder Alveolen verbracht werden. Die totale Lungendeposition steigt von <10 % beim FCKW-BDP auf 55-60 % beim HFA-BDP [LEACH 1998a,b]. Darüber hinaus zeigten Messungen radioaktiv markierter HFA-BDP-Aerosole mittels Gamma-Kamera eine weitgehend gleichmäßige bzw. periphere Verteilung in der Lunge verglichen mit der Fokussierung auf wenige große Atemwege beim FCKW-Aerosol. Die Tatsache, dass in der vorlie-

genden Arbeit keine signifikanten Unterschiede im NO-Produktionsvolumen gefunden wurden, kann daher nicht auf zu geringe Unterschiede der Steroid-Deposition zurückgeführt werden.

Zumindest theoretisch stellt das hier entwickelte Verfahren der NO-Stufenantwort (vgl. 4.1) ein Werkzeug dar, um derartige Unterschiede zu messen. Vorversuche hatten ergeben, dass es wenig erfolgversprechend war, das NO-Produktionsvolumen (V_c) bzw. die volumetrische Tiefe der NO-Produktion (V_{NOai}) von Asthmatikern und Gesunden zu vergleichen, da die individuellen, nicht krankheitsassoziierten Unterschiede der Lungen- und Atemwegsgröße viel größer waren als die Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Inhalation eines zentral und eines peripher deponierten Steroids ermöglichte demgegenüber den Vergleich innerhalb eines Individuums und umging die Hürde der anthropometrischen Heterogenität.

Die Analyse der Beziehung zwischen NO und Funktionsänderungen (vgl. 5.1 und 5.3) hatte ergeben, dass Änderungen der Funktion die Interpretation der Marker erschweren. Die Inhalation niedriger Steroiddosen, die nur diskrete Funktionsänderungen hervorriefen, sowie eines bronchialerweiternden Medikaments vor den Messungen war ein Weg, den störenden Einfluss von Funktionsänderungen zu minimieren, ohne zu einer impraktikablen Zahl von Kontrollversuchen Zuflucht zu nehmen. Darüber hinaus schien der beschriebene Ansatz geeignet, festzustellen, ob die numerischen Werte, welche die Stufenantwort liefert, genau genug bestimmbar sind, um lokale Effekte zu erfassen.

Die beobachtete Wirkung des Steroids auf die Konzentration des ausgeatmeten NO bei konstanter Flussrate geht konform mit Literaturdaten, die konsistent eine Reduktion von NO nach Steroidgabe zeigen [KHARITONOV 2001]. Betrug die Reduktion sowohl in der ersten als auch in der zweiten Untersuchung jeweils ungefähr Faktor 2, so fiel doch auf, dass trotz Dosiserhöhung auf 400 µg die Probanden der zweiten Untersuchung nicht die niedrigen NO-Werte der Probanden der ersten Untersuchung erreichten. Letztere lagen nach Gabe von 200 µg Corticosteroid im Normbereich. Diese Beobachtung legt nahe, dass bei schwerer erkrankten Asthmatikern auch nach Steroidgabe eine höhere intrinsische NO-Produktion verbleibt. Ob diese durch Extremdosen in den Normbereich zu senken ist, können die vorliegenden Daten nicht beantworten. Immerhin sei vermerkt, dass auch die Lungenfunktion nicht auf die Dosiserhöhung reagierte und im Mittel unterhalb des 100%-Sollwertes verblieb. Die Ergebnisse erlauben somit keine Aussage darüber, ob die NO-Messung sensitiver als konventionelle

Variablen reagiert und als mögliche Konsequenz dort bereits Sättigungs- bzw. Plateaueffekte zeigt, wo klinische Verbesserungen anhand anderer Messgrößen noch zu erkennen sind.

Die Analyse der NO-Konzentrationen bei konstanten expiratorischen Flussraten stellte sich als unproblematisch heraus, und die Interpolation der Werte bei den Zielflussraten 50 und 100 mL/s mittels des 2-Parameter-Modells bot keine offenkundigen Schwierigkeiten. Zwar verbesserte sich in beiden Untersuchungen die Lungenfunktion geringfügig, doch wiesen diese Effekte keinen Unterschied zwischen den Medikationen auf. Einzig die Eosinophilen im Sputum zeigten eine stärkere Wirkung beim feinen Aerosol, allerdings nur in der Gruppe der leichtgradigen Asthmatiker, deren Eosinophilenzahlen sehr niedrig lagen. Die Streuung der Eosinophilenzahlen war jedoch deutlich größer als die von NO.

Im Gegensatz zur Messung von NO bei konstanten Flussraten erwies sich die Auswertung der Stufenantworten als wesentlich diffiziler als vor Beginn der Untersuchung erwartet. Die Messungen waren immer wieder durch Störungen beeinträchtigt, wie sie insbesondere durch Leckagen aufgrund nicht genügend festen Umfassens des Mundstücks oder durch Bewegungen der Zunge entstanden, die zur Freisetzung von oralem NO führten [ZETTERQUIST 1999] und somit Schwankungen des NO-Signals verursachten. Im Gegensatz zu Kap. 4.1 traten diese Effekte hier aufgrund der großen Zahl von Messungen (i.d.R. ≥ 200 pro Proband) deutlich zutage.

Wenn diese Faktoren ausgeschlossen waren, so war im Regelfall der initiale Knick der rampenförmigen Antwort gut zu erkennen (vgl. Abb. 4.4). In der ersten Untersuchung traten jedoch Probleme dadurch auf, dass die NO-Signale bei einigen der Probanden mit nur leichtestgradiger Erkrankung sehr niedrig lagen und folglich die Signalamplituden klein waren. Dennoch war in vielen Fällen sowohl der erste als auch der zweite Knickpunkt zu erkennen und wurde von dem implementierten iterativen Algorithmus nach dem Kriterium der kleinsten Quadrate adäquat ermittelt. Kleine wellenförmige Störungen des NO-Signals konnten jedoch bereits ausreichen, um bei niedrigen Amplituden die Auswertung der Kurve unmöglich zu machen, insbesondere dann, wenn sie im Bereich der Knickpunkte lagen. Die numerische Stabilität der Summe, V_{NOai} , von anatomischem NO-Totraum, $V_{d,anat}$, und zentralem Produktionsvolumen, V_c , war wie erwartet größer als diejenige der beiden einzelnen Parameter, da ja die Variabilität des ersten Knickpunktes entfiel, die gegenläufige Fehler in $V_{d,anat}$ und V_c produzierte.

In der zweiten Untersuchung wurden schwerergradig erkrankte Probanden aus dem Grunde gewählt, weil die Hoffnung bestand, mittels größerer Signalamplituden zuverlässigere Schätzwerte zu erreichen. Jedoch zeigte sich im Verlauf der Messungen bei diesen Probanden ein wesentlich gravierenderes Problem. Während der erste, aufwärts gerichtete Knick in der Regel gut zu identifizieren war und mit einiger Sicherheit numerisch festgelegt werden konnte, war der zweite, zum neuen steady-state-Wert führende Knick oft schwer erkennbar. Vielmehr gingen die Kurven in den meisten Fällen mit gleichmäßiger Krümmung in den neu erreichten Plateauwert über.

Versuchte man, durch Berücksichtigung der nichtlinearen Abhängigkeit der NO-Werte von der Transitzeit eine gekrümmte Kurve anzupassen (vgl. 3.1.1), so ergaben sich zwei Probleme. Erstens wurden dafür mindestens zwei Modellparameter benötigt (mukosale NO-Konzentration und totaler Transferfaktor). Diese konnten zwar im Prinzip aus den beiden Plateauwerten von NO abgeleitet werden, doch war eine derartige Zweipunkt-Schätzung zweier Parameter statistisch nicht zuverlässig. Gravierender war, dass zum zweiten der flache Verlauf am Ende der Anstiegsphase die Variabilität im gesuchten zweiten Knickpunkt noch vergrößerte. Darüber hinaus erhielten die unvermeidlichen Fluktuationen des NO-Signals in diesem Bereich ein unangemessen hohes Gewicht und konnten somit den Knickpunkt weitgehend vor und zurück schieben.

Aus diesem Grund wurde die stückweise lineare Anpassung beibehalten. Dies führte dazu, dass die linearen Aufwärtsschritte des NO-Signals in den meisten Fällen zu kurz angesetzt schienen, und dürfte einer der wesentlichen Gründe sein, warum das zentrale NO-Produktionsvolumen und die NO-assoziierte Tiefe der Atemwegsentszündung in der zweiten Untersuchung deutlich niedriger als in der ersten Untersuchung waren (Tab. 4.5 und 4.7). Die schwerergradig erkrankten Probanden der zweiten Untersuchung wiesen durchwegs höhere NO-Signale auf. Als zusätzliches Einschlusskriterium war in dieser Untersuchung sogar ein höherer NO-Wert als bei Gesunden erwünscht.

Somit bestätigen die Daten die hohe Sensitivität des exhalieren NO für das Monitoring einer anti-inflammatorischen Intervention, lassen jedoch die Anwendbarkeit der NO-Stufenantwort als zweifelhaft erscheinen. Offenbar ist es schwierig, einen Ausweg aus dem oben beschriebenen Dilemma zu finden, entweder gut geformte, doch niedrige und stör anfällige Signale zur Verfügung zu haben, oder Signale großer Amplitude, aber offenbar nur teilweise

adäquater Form. Möglicherweise jedoch enthalten gerade die Abweichungen vom linearen Übergang vermittelt ihrer Zeitkonstanten wertvolle Information über chemische Einstellvorgänge in der Bronchialschleimhaut, die zu einem jeweils veränderten Gleichgewichtswert der effektiven mukosalen NO-Konzentration führen. Dies hieße, die Annahme einer konstanten mukosalen NO-Konzentration partiell zu revidieren.

Insofern das in 4.1 entwickelte Modell in einer erweiterten Formulierung (vgl. 8.2.5 und 5.1) auch eine konstante mukosale NO-Produktionsrate und eine variable mukosale NO-Konzentration ohne prinzipielle Schwierigkeiten handhaben kann, würden derartige Prozesse keineswegs seine Gültigkeit tangieren. Nimmt man an, dass NO mit Komponenten des mukosalen Flüssigkeitsfilmes rasch reagieren kann, beispielsweise reaktiven Sauerstoffverbindungen, dann würde eine relativ schnelle, doch exponentiell verlaufende Einstellung des neuen Gleichgewichts darauf hindeuten, einen hohen mit dem Transport ins Lumen konkurrierenden Fluss von NO präsent zu haben, und folglich eine hohe Verfügbarkeit dieser Verbindungen nahelegen. Dieses Phänomen könnte mit zur Erklärung der Tatsache beitragen, dass die geschätzten zentralen Volumina in der zweiten Untersuchung deutlich niedriger lagen als in der ersten Untersuchung. Möglicherweise lassen sich derartige Vorgänge dadurch eruieren, dass man auf eine Abwärtsstufe der Flussrate nach Erreichen des NO-Plateauwertes eine Aufwärtsstufe folgen lässt. Eine Abweichung von der „Spiegelbildlichkeit“ wäre teilweise durch chemische Reaktionen erklärbar. Allerdings dürfen auch Änderungen der Geometrie und Ventilation bei fortschreitender Ausatmung nicht vernachlässigt werden.

Als weiterer Faktor ist die periphere NO-Absorption zu berücksichtigen. Der Bereich der Bronchiolen bzw. des lokalen Übergangs in die Alveolen beginnt nicht in gleichmäßiger linearer oder volumetrischer Distanz von den Stimmbändern, sondern in unterschiedlicher Tiefe in verschiedenen Regionen der Lunge, selbst innerhalb eines Lungenlappens. Als Folge sind die Region der kleinen Atemwege und die alveoläre Region untrennbar miteinander verquickt. Daher gibt es einen breiten Übergangsbereich statt einer scharfen Grenze. Dies bedeutet, dass die Absorption von NO aufgrund der hohen pulmonalen Zirkulation, Dichte der Kapillaren und der Affinität von NO zu Hämoglobin vermutlich gerade in denjenigen Regionen, die als kleine Atemwege erfasst werden sollen, auf kürzester Distanz stark zunimmt. Änderungen der pulmonalen Zirkulation sollten demzufolge, bei fester NO-Produktion, die NO-Volumina ändern. Demzufolge kann man auch als Möglichkeit in Betracht ziehen, mittels der Stufenantwort die periphere NO-Absorption statt -Produktion zu messen. Hierzu wären

pharmakologische oder belastungsinduzierte Änderungen der pulmonalen Zirkulation hilfreich.

Ungeachtet dieser Schwierigkeiten erlaubte die Methode der NO-Stufenantwort, sinnvolle Schätzwerte des bronchialen Volumens zu gewinnen. Die statistische Selektion (vgl. 3.2) führte zu einer relativ geringen Zahl zu verwerfender Einzelmessungen - vorausgesetzt, offenkundige Artefakte waren bereits im Vorfeld ausgeschlossen. Ermutigend war auch, dass sich zumindest Tendenzen differentieller Effekte (um ca. 10 mL) bezüglich des numerisch robustesten Parameters (V_{NOai}) ergaben. Insofern das bronchiale NO-erzeugende Volumen bzw. die NO-assoziierte Tiefe der Atemwegsentzündung dem konventionellen CO₂-Totraum ähnlich sein dürfte, die Messung mittels CO₂ aber wesentlich größerer Ungenauigkeit und numerischer Willkür unterliegt [MIDANI 1998], bietet sich die NO-Stufenantwort auch zur Messung des konventionellen anatomischen Totraumes an. Ob darüber hinaus eine Analyse der Form der NO-Stufenantworten auch Informationen über Inhomogenitäten der Belüftung liefern kann, unabhängig von der Amplitude des NO-Signals, bedarf weiterer Abklärung. Derartige Ansätze würden die NO-Stufenmessung auch bei der COPD als interessant erscheinen lassen. In ihrer hier verwandten Form und Interpretation muss die Methode zum gegenwärtigen Zeitpunkt weiterhin als explorativ gelten.

5.5 Kritische Wertung und Ausblick

Die vorliegenden Daten lassen bei kritischer Betrachtung eine Reihe von Schlussfolgerungen zu. Das NO-Transportmodell liefert eine einleuchtende, sowohl qualitative als auch quantitative Erklärung für die Prozesse, welche NO in die Atemluft bringen. Allerdings ist seine Stärke, nämlich die strukturelle Robustheit, zugleich seine Schwäche, da sie bedeutet, dass die Aufschlüsselung weiterer Kompartimente bzw. chemischer Interaktionen von NO nur durch pharmakologische Modulation, d. h. letztlich auf invasive Weise zu erreichen ist. Die Messung von NO scheint gut geeignet zum Monitoring therapeutischer Effekte beim Asthma und brauchbar zur Detektion allergischer, eosinophilengekoppelter Reaktionen. Jedoch sind Interferenzen mit Änderungen des Bronchialsystems, welche den NO-Transport beeinflussen, nicht zu vernachlässigen, und die Anwendung des NO-Transportmodells zwecks Korrektur ist durch die Tatsache beeinträchtigt, dass wesentliche, hierfür notwendige Parameter unbekannt sind. Hier sind heuristische Verfahren und Korrekturen zu entwickeln.

Die NO-Stufenantwort hat nach wie vor ein großes Potential. Jedoch zeigen die Daten der Corticosteroid-Intervention, dass die numerische Schätzung von enormen Schwierigkeiten begleitet ist, insbesondere bezüglich der Endphase der rampenförmigen Zunahme des NO-Signals. Zwar mag in diesem Kurvenverlauf wertvolle Information über Umsetzungszeitkonstanten von NO in der Bronchialschleimhaut enthalten sein, jedoch ist diese schwerlich ohne *ad hoc*-Annahmen zu eruieren, die ihrerseits schwer zu verifizieren sind. Möglicherweise sollte trotz der negativen Ergebnisse versucht werden, an einem großen Kollektiv von Patienten vergleichend den konventionellen CO₂-Totraum und die NO-Produktionstiefe zu messen, in der Erwartung, dass letztere bei Asthmatikern im Mittel relativ erhöht ist.

Die Messung des ausgeatmeten H₂O₂ lieferte einerseits das interessante Resultat, dass H₂O₂ primär den Bronchien entstammt. Andererseits waren weder die Daten zur Variabilität noch die nach Einatmung von Ozon und Allergen erhaltenen Daten ermutigend. Ob die Messung von H₂O₂ sinnvoll ist, muss somit dahingestellt bleiben. Darüber hinaus betreffen die methodologischen Probleme und Quellen der Variabilität vermutlich die gesamte Analytik des Atemkondensats im Vergleich zu direkt gasförmig messbaren Komponenten wie NO.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des ausgeatmeten NO und H₂O₂ zu verstehen. In den beiden ersten Untersuchungen wurde mittels strikt nicht invasiver Messungen geklärt, in welchem Bereich der Lunge NO und H₂O₂ gebildet werden. Sodann wurde ihre Anwendbarkeit als Marker der Atemwegsentzündung geprüft. Dies erfolgte zunächst durch Analyse der pro-inflammatorischen, kombinierten Wirkung von Ozon und Allergenen unter der Hypothese, dass Ozon primär H₂O₂ und Allergene primär NO beeinflusse. In der letzten Untersuchung wurde umgekehrt versucht, anti-inflammatorische Effekte mittels spezieller NO-Messungen zu lokalisieren, die auf den in der ersten Untersuchung entwickelten Vorstellungen basierten.

Die Entstehung des ausgeatmeten NO kann mit Hilfe eines Modells beschrieben werden, das ein bronchiales Kompartiment in Form einer Röhre und ein alveoläres Kompartiment in Form eines homogenen Raumes umfasst. Der Transport wird durch einen bronchialen Transferfaktor für NO, eine mukosale NO-Konzentration als treibende Kraft sowie eine alveoläre NO-Konzentration charakterisiert. Diese Parameter beschreiben die Abhängigkeit des ausgeatmeten NO von der Flussrate und können aus Konzentrations-Fluss-Kurven ermittelt werden. Wichtiges Ergebnis ist die Robustheit des Modells gegenüber einer Anzahl realitätsnaher Verfeinerungen, wie Inhomogenitäten des NO-Transports und chemische Reaktionen von NO. Darüber hinaus ermöglicht der Ansatz der sog. Stufenantwort, das NO-erzeugende Volumen der Atemwege auf nicht invasive Weise zu ermitteln. Anhand der vorhergesagten Beziehungen ergaben sich bei 20 Gesunden und 7 Asthmatikern im Mittel mukosale NO-Konzentrationen von 38,4 bzw. 247,2 ppb sowie bronchiale Transferfaktoren von 42,8 bzw. 16,3 mL/s; die alveolären NO-Konzentrationen lagen nahe Null. Die volumetrische Tiefe der NO-Produktion, von den Lippen ab gemessen, lag zwischen 77,5 und 339,6 mL unabhängig von der Erkrankung. Diese Ergebnisse verweisen auf einen primär bronchialen Ursprung des ausgeatmeten NO. Das Modell erscheint somit als ein potentielles Werkzeug, um globale und lokale Änderungen der NO-Produktion nicht invasiv zu verfolgen.

In der zweiten Untersuchung wurde bestimmt, ob die Konzentration des exhalieren H₂O₂ von der Ausatemrate abhängt. Zu diesem Zweck wurde bei 15 Probanden Atemkondensat bei drei verschiedenen Ausatemraten gewonnen. Zusätzlich wurden die Messungen 2-5mal

wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu ermitteln. Die Konzentration von H_2O_2 fiel in statistisch signifikanter Weise mit steigender Flussrate. Da eine Flussabhängigkeit aufgrund der ersten Untersuchung auf eine Entstehung innerhalb der Bronchien verweist, stammt der Hauptteil des H_2O_2 aus diesen und nicht den Alveolen. Die Flussabhängigkeit trat nur bei niedrigen Ausatemraten zutage; somit erscheinen für praktische Zwecke Messungen unter Normalatmung gerechtfertigt. Allerdings verblieb auch bei strikter Standardisierung der Messbedingungen eine beachtliche Variabilität, welche die Anwendbarkeit der H_2O_2 -Messung als Marker der entzündlichen Aktivität auf kurzzeitige Vergleiche einschränkt.

Die dritte Untersuchung ermittelte die Konzentrationen des ausgeatmeten NO und H_2O_2 nach Einatmung von Ozon vs. Reinluft sowie nach Inhalation eines Allergens. Bei 33 Probanden mit Rhinitis oder Asthma zeigte NO erniedrigte Werte nach 250 ppb Ozon, parallel zur Lungenfunktionsantwort. Bei allen Expositionen waren die Werte von NO 1 h relativ zu 6 h nach Allergen erniedrigt. Dies deutet auf die Induktion einer NO-assoziierten Entzündung während der allergischen Spätreaktion, möglicherweise auch auf einen circadianen Effekt. Eine ähnliche Tendenz fand sich bei H_2O_2 , doch war die Streuung der Werte wesentlich größer als bei NO. Spezifische Reaktionen auf Ozon traten nicht auf. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Atemwegsreaktion auf Ozon und Allergen nur begrenzt durch die Messung von NO und nicht durch diejenige von H_2O_2 zu eruieren ist. Vermutlich hat dies seinen Grund im Falle des H_2O_2 in seiner hohen Reaktivität, im Falle des NO in seiner Sensitivität gegenüber Änderungen der Geometrie des bronchialen Systems.

Die vierte Untersuchung ergab bei 33 Probanden mit verschiedenem Schweregrad eines Asthma bronchiale markante Effekte eines niedrig dosierten, inhalierten Corticosteroids (BDP) auf die Konzentration des ausgeatmeten NO. Dies war sowohl für ein grobes, zentral deponiertes (FCKW) als auch ein feines, peripher deponiertes Aerosol (HFA) der Fall. Die mittels NO-Stufenantwort gemessenen Werte des zentralen NO-Produktionsvolumens, des NO-Totraumes sowie der volumetrischen Tiefe der NO-Produktion zeigten keine statistisch signifikanten Änderungen. Allerdings ließ der letztgenannte Parameter eine Tendenz im Sinne einer Retraktion der NO-assoziierten Atemwegsentzündung aus den peripheren Atemwegen um ca. 10 mL nach Inhalation des HFA-Aerosols erkennen. Dieser Effekt trat sowohl bei leichtem als auch bei mittelgradigem Asthma auf. Trotz des statistisch negativen Ergebnisses ist die Analyse der NO-Stufenantwort weiterhin attraktiv, da sie das einzige nicht invasive Verfahren zur Lokalisierung der NO-Produktion darstellt.

6.1 Summary

The present work aimed at elucidating the origin and pathophysiological role of exhaled NO and H₂O₂ in human subjects. The first two studies were designed to reveal the region of the lung, from which both compounds originate, using strictly noninvasive methods. Based on this, the next two studies tried to assess the usefulness of NO and H₂O₂ as markers of airway inflammation. This was achieved by analysis of pro-inflammatory, combined effects of ozone and allergen under the hypothesis, that ozone would primarily alter H₂O₂ levels and allergen NO levels. Conversely, the fourth study used an approach developed in the first study to localize anti-inflammatory effects of differently deposited corticosteroid aerosols.

According to the first study, the production of exhaled NO can be described by a model comprising a bronchial compartment thought of as a single tube, and an alveolar compartment thought of as homogeneous well-mixed space. The transport of NO is characterised by a bronchial transfer factor, a mucosal NO concentration as the major driving force, and an alveolar airspace concentration of NO. These parameters describe the flow-dependence of exhaled NO and can be estimated from concentration-flow curves. An important characteristic of the model is its robustness against refinements that aim at describing physiological conditions more closely, such as inhomogeneities of NO transport or chemical reactions involving NO. In addition, the approach of so-called step responses offers a method to determine the NO-producing bronchial volume noninvasively. The model was used for analysis in 20 healthy subjects and 7 subjects with asthma. Average mucosal NO concentrations were 38.4 vs 247.2 ppb and transfer factors 42.8 vs 16.3 mL/s. Alveolar NO was always near zero. The volumetric depth of NO-production as measured from the lips ranged between 77.5 and 339.6 mL independently from the diagnosis. These values suggest that the exhaled NO originates primarily within the bronchi. As a result, the model as developed seems to be a potential tool for the noninvasive assessment of global and local changes of NO production.

The second study used the concepts introduced before to identify the region within the lung where the exhaled H₂O₂ originates. Breath condensate was obtained at three different flow rates in 15 subjects to determine whether the concentration of H₂O₂ depends on flow rate. Additionally, measurements were repeated 2-5 times to assess reproducibility. In all subjects the level of H₂O₂ decreased with increasing flow rate. As flow dependence is indicative of

bronchial production, this finding suggests that the airways, not the alveoli, are the primary source of exhaled H_2O_2 . However, flow dependence was pronounced only at very low flow rates. For practical purposes therefore collection of breath condensate during normal breathing seems a valid approach. Despite the standardisation of measurements, variability of data remained significant. This fact limits the usefulness of exhaled H_2O_2 as a marker of airway inflammation to short-term comparisons.

In the third study NO and H_2O_2 were measured after inhalation of ozone vs filtered air as well as after subsequent allergen inhalation. Thirty-three subjects with rhinitis or asthma were enrolled. Compared to other types of exposure, the level of exhaled NO was reduced immediately after exposure to 250 ppb ozone, in parallel to the lung function response. It was also altered by 4x125 ppb ozone. All types of exposure resulted in NO values being lower 1 h as compared to 6 h after allergen inhalation. This finding is compatible with NO-associated inflammation during late phase allergen responses but might also be due to circadian changes. Similar effects were exhibited by H_2O_2 , but variability was much higher and prevented effects from being statistically significant. In addition there was no obvious association with the oxidative stimulus ozone. The data suggest that airway responses to ozone and/or allergen are detectable to some extent by NO but not by H_2O_2 . Presumably the difficulties are related to the chemical reactivity of H_2O_2 and to the fact that NO values measured upon expiration are sensitive to factors affecting NO transfer, such as changes in airway geometry and hydration.

The fourth study demonstrated a marked reduction in the level of exhaled NO after corticosteroid (BDP) inhalation, either by conventional, CFC-driven, centrally deposited aerosol, or by extrafine, HFA-driven, peripherally deposited aerosol. This was observed in two trials performed in 33 subjects with asthma of different severity. NO-step responses as developed in the first study were applied to obtain estimates of central NO-production volume, NO-deadspace and volumetric depth of NO-associated airway inflammation. No statistically significant differences between the differently deposited steroids were observed. However, the depth of inflammation showed a tendency toward a decrease by about 10 mL after HFA-BDP in both trials, suggesting that inflammation was retracting from peripheral airways after inhalation of the peripherally deposited steroid. Although the effects did not reach statistical significance and measurements were prone to artifacts, the NO-step response remains a promising approach, as it is the only currently available method which offers the potential of measuring the site of airway inflammation noninvasively.

7 Literatur

Albina, J.E. (1995). On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J. Leukoc. Biol.* **58**, 643-649.

Almawi, W.Y., M.M. Abou Jaoude, X.C. Li (2002). Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects. *Hematol. Oncol.* **20**, 17-32.

Antczak, A., D. Nowak, B. Shariati, M. Krol, G. Piasecka, Z. Kurmanowska (1997). Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* **10**, 1235-1241.

Antczak, A., D. Nowak, P. Bialasiewicz, M. Kasielski (1999). Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **47**, 119-126.

ATS. American Thoracic Society (1987). Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 225-244.

ATS. American Thoracic Society (1999). Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 2104-2117.

Azuma, Y., M. Shinohara, P.L. Wang, A. Hidaka, K. Ohura (2001). Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF α and IL-12 by macrophages via H₂-receptors. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1867-1875.

Baldwin, S.R., R.H. Simon, C.M. Grum, L.H. Ketai, L.A. Boxer, L.J. Devall (1986). Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* **1(8471)**, 11-14.

Ball, B.A., L.J. Folinsbee, D.B. Peden, H.R. Kehrl (1996). Allergen bronchoprovocation of patients with mild allergic asthma after ozone exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* **98**, 563-572.

Barnes, P.J. (1997). Nuclear factor-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 867-870.

Barnes, P.J., S.A. Kharitonov (1996). Exhaled nitric oxide: a new lung function test. *Thorax* **51**, 233-237.

Barr, B.C., D.M. Hyde, C.G. Plopper, D.L. Dungworth (1988). Distal airway remodelling in rats chronically exposed to ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 924-938.

Bascom, R., P.A. Bromberg, D.L. Costa, R. Devlin, D.W. Dockery, M.W. Frampton, W. Lambert, J. Samet, F.E. Speizer, M.J. Utell (1996). State of the art: health effects of outdoor air pollution. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 3-50.

Berlyne, G., N.C. Barnes (2000). No role for NO in asthma? *Lancet* **355**, 1029-1030.

Bhalla, D.K. (1994). Alteration of ozone-induced airway permeability by oxygen metabolites and antioxidants. *Toxicol. Lett.* **73**, 91-101.

Bonnet, R., R. Jörres, U. Heitmann, H. Magnussen (1991). Circadian rhythm in airway responsiveness and airway tone in patients with mild asthma. *J. Appl. Physiol.* **71**, 1598-1605.

Borland, C.D.R., T.WE. Higenbottam (1989). A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbon monoxide. *Eur. Respir. J.* **2**, 56-63.

Brattsand, R., M. Linden (1996). Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10** (Suppl. 2), 81-90. Diskussion p. 91-92.

Brodie, A.E., D.J. Reed (1987). Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 120-125.

Burnett, R.T., J.R. Brook, W.T. Yung, R.E. Dales, D. Krewski (1997). Association between ozone and hospitalization for respiratory diseases in 16 Canadian cities. *Environ. Res.* **72**, 24-31.

Busse, W., B. Randlev, J. Sedgwick (1989). The effect of azelastine on neutrophil and eosinophil generation of superoxide. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 400-405.

Byrnes, C.A., S. Dinarevic, C. Busst, A. Bush, E.A. Shinebourne (1997). Is nitric oxide in exhaled air produced at airway or alveolar level? *Eur. Respir. J.* **10**, 1021-1025.

Carlsson, L.M., J. Jonsson, T. Edlund, S.L. Marklund (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6264-6268.

Chen, L.C., Q. Qu (1997). Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 96-101.

Christian, D.L., L.L. Chen, C.H. Scannell, R.E. Ferrando, B.S. Welch, J.R. Balmes (1998). Ozone-induced inflammation is attenuated with multiday exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 532-537.

Cornett, L.E., F.C. Hiller, S.E. Jacobi, W. Cao, D.W. McGraw (1998). Identification of a glucocorticoid response element in the rat beta2-adrenergic receptor gene. *Mol. Pharmacol.* **54**, 1016-1023.

De Benedetto, F., A. Aceto, B. Dragani, A. Spacone, S. Formisano, R. Cocco, C.M. Sanguinetti (2000). Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **55**, 185-188.

De Frutos, T., L. Sanchez de Miguel, J. Farre, J. Gomez, J. Romero, P. Marcos-Alberca, A. Nunez, L. Rico, A. Lopez-Farre (2001). Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor-alpha and during acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**, 800-807.

De Gouw, H.W.F.M., J. Hendriks, I.M. Twiss, P.J. Sterk (1997). Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after AMP- and histamine-induced bronchoconstriction. *Eur. Respir J.* **10** (Suppl. 25), 158s (Abstract).

De Gouw, H.W., K. Grünberg, R. Schot, A.C. Kroes, E.C. Dick, P.J. Sterk (1998a). Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur. Respir. J.* **11**, 126-132.

De Gouw, H.W., J. Hendriks, A.M. Woltman, I.M. Twiss, P.J. Sterk (1998b). Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after bronchoconstriction to direct and indirect stimuli in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 315-319.

Dekhuijzen, P.N., K.K. Aben, I. Dekker, L.P. Aarts, P.L. Wielders, C.L. van Herwaarden, A. Bast (1996). Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 813-816.

Del Pozo, V., E. de Arruda-Chaves, B. de Andres, B. Cardaba, A. Lopez-Farre, S. Gallardo, I. Cortegano, L. Vidarte, A. Jurado, J. Sastre, P. Palomino, C. Lahoz (1997). Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* **158**, 859-864.

Dohlman, A.W., H.R. Black, J.A. Royall (1993). Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 955-960.

Donnelly, L.E., P.J. Barnes (2002). Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 144-151.

Emelyanov, A., G. Fedoseev, A. Abulimity, K. Rudinski, A. Fedoulov, A. Karabanov, P.J. Barnes (2001). Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* **120**, 1136-1139.

Fakhrzadeh, L., J.D. Laskin, D.L. Laskin (2002). Deficiency in inducible nitric oxide synthase protects mice from ozone-induced lung inflammation and tissue injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 413-419.

Ferreira, I.M., M.S. Hazari, C. Gutierrez, N. Zamel, K.R. Chapman (2001). Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: effects of inhaled beclomethasone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1012-1015.

Folinsbee, L.J., D.H. Horstman, H.R. Kehrl, S. Harder, S. Abdul-Salaam, P.J. Ives (1994). Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**, 98-105.

Gabrielson, E.W., X.Y. Yu, E.W. Spannhake (1994). Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells. *Environ. Health Perspect.* **102**, 972-974.

Ganas, K., S. Loukides, G. Papatheodorou, P. Panagou, N. Kalogeropoulos (2001). Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir. Med.* **95**, 649-654.

Ganster, R.W., B.S. Taylor, L. Shao, D.A. Geller (2001). Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 8638-8643.

Gantt, K.R., T.L. Goldman, M.L. McCormick, M.A. Miller, S.M. Jeronimo, E.T. Nascimento, B.E. Britigan, M.E. Wilson (2001). Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* **167**, 893-901.

Gauvreau, G.M., J. Doctor, R.M. Watson, M. Jordana, P.M. O'Byrne (1996). Effects of inhaled budesonide on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1267-1271.

Georges, G., B.B. Bartelson, R.J. Martin, P.E. Silkoff (1999). Circadian variation in exhaled nitric oxide in nocturnal asthma. *J. Asthma* **36**, 467-473

Gerrity, T.R., R.A. Weaver, J. Berntsen, D.E. House, J.J. O'Neil (1988). Extrathoracic and intrathoracic removal of O₃ in tidal-breathing humans. *J. Appl. Physiol.* **65**, 393-400.

Gibson, P.G., R.L. Henry, P. Thomas (2000). Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur. Respir. J.* **16**, 1008-1015.

Goldstein, S., C. Michel, W. Bors, M. Saran, G. Czapski (1988). A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radic. Biol. Med.* **4**, 295-303.

Grönke, L., F. Kannies, O. Holz, R.A. Jörres, H. Magnussen (2002). The relationship between airway hyperresponsiveness, markers of inflammation and lung function depends on the duration of the asthmatic disease. *Clin. Exp. Allergy* **165**, 57-63.

Grossi, L., P.C. Montecchi (2002). A kinetic study of S-nitrosothiol decomposition. *Chemistry* **8**, 380-387.

Guo, F.H., H.R. De Raeve, T.W. Rice, D.J. Stuehr, F.B. Thunnissen, S.C. Erzurum (1995). Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7809-7813.

Guo, F.H., S.A. Comhair, S. Zheng, R.A. Dweik, N.T. Eissa, M.J. Thomassen, W. Calhoun, S.C. Erzurum (2000). Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J. Immunol.* **164**, 5970-5980.

Hafezi-Moghadam, A., T. Simoncini, E. Yang, F.P. Limbourg, J.C. Plumier, M.C. Rebsamen, C.M. Hsieh, D.S. Chui, K.L. Thomas, A.J. Prorock, V.E. Laubach, M.A. Moskowitz, B.A. French, K. Ley, J.K. Liao (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* **8**, 473-479. Kommentar in: *Nat. Med.* **8**, 453-455.

Hakim, T.S., K. Sugimori, E.M. Camporesi, G. Anderson (1996). Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol. Meas.* **17**, 267-277.

Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press Inc., New York.

Hanania, N.A., S.M. Tarlo, F. Silverman, B. Urch, N. Senathirajah, N. Zamel, P. Corey (1998). Effect of exposure to low levels of ozone on the response to inhaled allergen in allergic asthmatic patients. *Chest* **114**, 752-756.

Hancox, R.J., D.A. Stevens, I.M. Adcock, P.J. Barnes, D.R. Taylor (1999). Effects of inhaled beta agonist and corticosteroid treatment on nuclear transcription factors in bronchial mucosa in asthma. *Thorax* **54**, 488-492.

Henderson, W.R., M. Kaliner (1978). Immunologic and nonimmunologic generation of superoxide from mast cells and basophils. *J. Clin. Invest.* **61**, 187-196.

Hillsley, M.V., J.M. Tarbell (2002). Oscillatory shear alters endothelial hydraulic conductivity and nitric oxide levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1466-1471.

Hiltermann, T.J., C.R. de Bruijne, J. Stolk, A.H. Zwinderman, F.T. Spijksma, W. Roemer, P.A. Steerenberg, P.H. Fischer, L. van Bree, P.S. Hiemstra (1997). Effects of photochemical air pollution and allergen exposure on upper respiratory tract inflammation in asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1765-1772.

Ho, L.P., J. Faccenda, J.A. Innes, A.P. Greening (1999). Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* **13**, 103-106.

Ho, C.F., C.H. Wang, C.Y. Liu, C.T. Yu, H.P. Kuo (1997). The effect of bronchodilators on exhaled nitric oxide (NO) in patients with bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* **10** (Suppl. 25), 102s (Abstract).

Hogg, N., B. Kalyanaraman (1999). Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 378-384.

Holz, O., K. Richter, R.A. Jörres, P. Speckin, M. Mücke, H. Magnussen (1998a). Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days. *Thorax* **53**, 83-86.

Holz, O., B. Weng, M. Mücke, D. Loppow, P. Speckin, K. Richter, R.A. Jörres, H. Magnussen (1998b). Detection of inducible NO-Synthase (iNOS) in sputum cells of healthy and asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, A612 (Abstract).

- Holz, O., R.A. Jörres, P. Timm, M. Mücke, K. Richter, S. Koschyk, H. Magnussen (1999). Ozone-induced airway inflammatory changes differ between subjects and are reproducible. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 776-784.
- Holz, O., M. Böttcher, P. Timm, S. Koschyk, G. Abel, G. Gercken, H. Magnussen, R.A. Jörres (2001). Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid after repeated ozone exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**, 242-248.
- Holz, O., M. Mücke, K. Paasch, S. Böhme, P. Timm, K. Richter, H. Magnussen, R.A. Jörres (2002). Repeated ozone exposures enhance bronchial allergen responses in subjects with rhinitis or asthma. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 681-689.
- Horvath, I., L.E. Donnelly, A. Kiss, S.A. Kharitonov, S. Lim, C.K. Fan, P.J. Barnes (1998). Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 1042-1046.
- Huang, Z., K.B. Ucer, T. Murphy, R.T. Williams, S.B. King, D.B. Kim-Shapiro (2002). Kinetics of nitric oxide binding to R-state hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 812-818.
- Hunt, J.F., K. Fang, R. Malik, A. Snyder, N. Malhotra, T.A. Platts-Mills, B. Gaston (2000). Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 694-699. Kommentare in: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, **161**, 685-687 sowie 2001, **163**, 293-294.
- Hyde, R.W., E.J. Geigel, A.J. Olszowka, J.A. Krasney, R.E. Forster II, M.J. Utell, M.W. Frampton (1997). Determination of production of nitric oxide by lower airways of humans - theory. *J. Appl. Physiol.* **82**, 1290-1296.
- Hyslop, P.A., L.A. Sklar (1984). A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal. Biochem.* **141**, 280-286.
- Ichinose, M., H. Sugiura, S. Yamagata, A. Koarai, K. Shirato (2000). Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 701-706.
- Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, G. Chaudhuri (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9265-9269.
- Jackson, R.M., L. Frank (1984). Ozone-induced tolerance to hyperoxia in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 425-429.
- Jaspers, I., E. Flescher, L.C. Chen (1997). Ozone-induced IL-8 expression and transcription factor binding in respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **272**, L504-L511.

Jenkins, H.S., J.L. Devalia, R.L. Mister, A.M. Bevan, C. Rusznak, R.J. Davies (1999). The effect of exposure to ozone and nitrogen dioxide on the airway response of atopic asthmatics to inhaled allergen: dose- and time-dependent effects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 33-39.

Jöbbsis, Q., H.C. Raatgeep, P.W. Hermans, J.C. de Jongste (1997). Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur. Respir. J.* **10**, 519-521.

Jöbbsis, Q., H.C. Raatgeep, S.L. Schellekens, W.C. Hop, P.W. Hermans, J.C. de Jongste (1998). Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur. Respir. J.* **12**, 483-485.

Jöbbsis, Q., H.C. Raatgeep, S.L. Schellekens, A. Kroesbergen, W.C. Hop, J.C. de Jongste (2000). Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Eur. Respir. J.* **16**, 95-100.

Jöbbsis, R.Q., S.L. Schellekens, A. Fakkkel-Kroesbergen, R.H. Raatgeep, J.C. de Jongste (2001). Hydrogen peroxide in breath condensate during a common cold. *Mediators Inflamm.* **10**, 351-354.

Jörres, R., D. Nowak, H. Magnussen (1996). The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 56-64.

Jörres, R.A., H. Magnussen (1997a). Oxidative stress in COPD. *Eur. Respir. Rev.* **43**, 131-135.

Jörres, R.A., D. Nowak, D. Kirsten, L. Grönke, H. Magnussen (1997b). A short protocol for methacholine provocation testing adapted to the Rosenthal-Chai dosimeter technique. *Chest* **111**, 866-869.

Jörres, R.A., H. Sonnemann, J. Lohmann, H. Magnussen (1998). Determination of bronchial production characteristics of exhaled nitric oxide (NO) in human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, A612 (abstract).

Jörres, R.A. (2000a). Modelling the production of nitric oxide within human airways. *Eur. Respir. J.* **16**, 555-560.

Jörres, R.A., O. Holz, W. Zachgo, P. Timm, S. Koschyk, B. Müller, F. Grimminger, W. Seeger, F.J. Kelly, C. Dunster, T. Frischer, G. Lubec, M. Waschewski, A. Niendorf, H. Magnussen (2000b). The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1855-1861.

Jonsson, L.M., T. Edlund, S.L. Marklund, T. Sandström (2002). Increased ozone-induced airway neutrophilic inflammation in extracellular-superoxide dismutase null mice. *Respir. Med.* **96**, 209-214.

Kanazawa, H., S. Shiraishi, K. Hirata, J. Yoshikawa (2002). Decreased peroxynitrite inhibitory activity in induced sputum in patients with bronchial asthma. *Thorax* **57**, 509-512.

Kanniess, F., R.A. Jörres, H. Magnussen (2001). Combined inhalation of nitric oxide and oxygen in patients with moderate to severe COPD: effect on blood gases. *Respir. Med.* **95**, 927-934.

Kasielski, M., D. Nowak (2001). Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* **95**, 448-456.

Kehrl, H.R., D.B. Peden, B. Ball, L.J. Folinsbee, D. Horstman (1999). Increased specific airway reactivity of persons with mild allergic asthma after 7.6 hours of exposure to 0.16 ppm ozone. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 1198-1204.

Kenyon, N.J., A. van der Vliet, B.C. Schock, T. Okamoto, G.M. McGrew, J.A. Last (2002). Susceptibility to ozone-induced acute lung injury in iNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **282**, L540-L545.

Kharitonov, S.A., B.J. O'Connor, D.J. Evans, P.J. Barnes (1995a). Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1894-1899.

Kharitonov, S.A., D. Yates, P.J. Barnes (1995b). Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur. Respir. J.* **8**, 295-297.

Kharitonov, S.A., K.F. Chung, D. Evans, B.J. O'Connor, P.J. Barnes (1996). Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the upper respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1773-1780.

Kharitonov, S., K. Alving, P.J. Barnes (1997). Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur. Respir. J.* **10**, 1683-1693.

Kharitonov, S., P.J. Barnes (2001). Exhaled markers of pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1693-1722.

Kharitonov, S.A., P.J. Barnes (2002). Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* **7**, 1-32.

Kirsten, A.M., R.A. Jörres, D. Kirsten, H. Magnussen (1997). Determination of bronchial nitric oxide (NO) concentrations in subjects with mild asthma and healthy subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, A825 (abstract).

Kirsten, A.M. (1998). Untersuchung zur Produktion von Stickstoffmonoxid in den menschlichen Atemwegen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin. Universität Hamburg.

Kraft, M., R.J. Martin, S. Wilson, R. Djukanovic, S.T. Holgate (1999). Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 228-234.

Kraft, M., J. Pak, R.J. Martin, D. Kaminsky, C.G. Irvin (2001). Distal lung dysfunction at night in nocturnal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1551-1556.

- Kumarathasan, P., R. Vincent, P. Goegan, M. Potvin, J. Guenette (2001). Hydroxyl radical adduct of 5-aminosalicylic acid: a potential marker of ozone-induced oxidative stress. *Biochem. Cell Biol.* **79**, 33-42.
- Kwon, S., R.L. Newcomb, S.C. George (2001). Mechanisms of synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* **5**, 534-546.
- Lacza, Z., M. Puskar, J.P. Figueroa, J. Zhang, N. Rajapakse, D.W. Busija (2001). Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1609-1615.
- Leach, C.L. (1998a). Improved delivery of inhaled steroids to the large and small airways. *Respir Med* **92** (Suppl. A), 3-8. Kommentar in: *Respir. Med.* 1999, **93**, 366-369.
- Leach, C.L., P.J. Davidson, R.J. Boudreau (1998b). Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *Eur. Respir. J.* **12**, 1346-1353.
- Lehtimäki, L., H. Kankaanranta, S. Saarelainen, H. Hahtola, R. Jarvenpää, T. Koivula, V. Turjanmaa, E. Moilanen (2001). Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1557-1561.
- Leikauf, G.D., Q. Zhao, S. Zhou, J. Santrock (1993). Ozonolysis products of membrane fatty acids activate eicosanoid metabolism in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**, 594-602.
- Leikauf, G.D., L.G. Simpson, J. Santrock, Q. Zhao, J. Abbinante-Nissen, S. Zhou, K.E. Driscoll (1995a). Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ. Health Perspect.* **103** (Suppl. 2), 91-95.
- Leikauf, G.D., Q. Zhao, S. Zhou, J. Santrock (1995b). Activation of eicosanoid metabolism in human airway epithelial cells by ozonolysis products of membrane fatty acids. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* **71**, 1-15. Diskussion p. 19-26.
- Liew, F.Y., X.Q. Wei, L. Proudfoot (1997). Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **352**, 1311-1315.
- Lohmann, J. (1998). Untersuchungen zur Parameterabschätzung und Verifizierung eines Modells der Stickstoffmonoxid-Produktion in der menschlichen Lunge. *Diplomarbeit*. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bio-Ingenieurwesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.
- Loppow, D., M.B. Schleiss, F. Kannies, C. Taube, R.A. Jörres, H. Magnussen (2001). In patients with chronic bronchitis a four week trial with inhaled steroids does not attenuate airway inflammation. *Respir. Med.* **95**, 115-121.
- Loppow, D., E. Huland, H. Heinzer, L. Grönke, R.A. Jörres, H. Magnussen (2002). Interleukin-2 Inhalation Therapy Temporarily Induces Asthma-like Functional Changes and Airway Inflammation. (*eingereicht zur Publikation*).

- Loukides, S., I. Horvath, T. Wodehouse, P.J. Cole, P.J. Barnes (1998). Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 991-994.
- Loukides, S., D. Bouros, G. Papatheodorou, P. Panagou, N.M. Siafakas (2002). The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest* **121**, 338-346.
- Madden, M.C., M. Friedman, N. Hanley, E. Siegler, J. Quay, S. Becker, R. Devlin, H.S. Koren (1993). Chemical nature and immunotoxicological properties of arachidonic acid degradation products formed by exposure to ozone. *Environ. Health Perspect.* **101**, 154-164.
- Magnussen, H., J. Krenko, U. Baltzer, R. Jörres (1985). Vergleich spirometrischer und ganzkörperplethysmographischer Größen bei der Beurteilung der inhalativen Histamin-Provokation. *Atemw.-Lungenkrkh.* **11**, 312-314.
- Marley, R., R.P. Patel, N. Orié, E. Ceaser, V. Darley-USmar, K. Moore (2001). Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 688-696.
- Massaro, A.F., B. Gaston, D. Kita, C. Fanta, J.S. Stamler, J.M. Drazen (1995). Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 800-803.
- Mattes, J., K.S. van's Gravesande, C. Moeller, M. Moseler, M. Brandis, J. Kuehr (2002). Circadian variation of exhaled nitric oxide and urinary eosinophil protein X in asthmatic and healthy children. *Pediatr. Res.* **51**, 190-194.
- McDonald, R.J., J. Usachenko (1999). Neutrophils injure bronchial epithelium after ozone exposure. *Inflammation* **23**, 63-73.
- Menzies-Gow, A., D.S. Robinson (2002). Eosinophils, eosinophilic cytokines (interleukin-5), and antieosinophilic therapy in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **8**, 33-38.
- Midani, A. (1998). Implementierung eines Programms zur Messung der Volumina menschlicher Atemwege anhand des ausgeatmeten Stickstoffmonoxids und Kohlendioxids. *Diplomarbeit*. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bio-Ingenieurwesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.
- Mori, M., T. Gotoh (2000). Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 715-719.
- Nagase, S., K. Takemura, A. Ueda, A. Hirayama, K. Aoyagi, M. Kondoh, A. Koyama (1997). A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 150-153.
- Nash, J.C., M. Walker-Smith (1987). Nonlinear parameter estimation. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Newton, R., L.A. Hart, D.A. Stevens, M. Bergmann, L.E. Donnelly, I.M. Adcock, P.J. Barnes (1998). Effect of dexamethasone on interleukin-1 β -induced nuclear factor-kappaB (NF- κ B) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* **254**, 81-89.
- Nohl, H., K. Staniek, B. Sobhian, S. Bahrami, H. Redl, A.V. Kozlov (2000). Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. *Acta Biochim. Pol.* **47**, 913-921.
- Nowak, D., A. Antczak, M. Krol, T. Pietras, B. Shariati, P. Bialasiewicz, K. Jeczowski, P. Kula (1996). Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur. Respir. J.* **9**, 652-657.
- Nowak, D., M. Kasielski, T. Pietras, P. Bialasiewicz, A. Antczak (1998). Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **53**, 268-273.
- Nowak, D., S. Kalucka, P. Bialasiewicz, M. Krol (2001). Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 178-186.
- Ogasawara, H., T. Fujitani, G. Drzewiecki, E. Middleton Jr. (1986). The role of hydrogen peroxide in basophil histamine release and the effect of selected flavonoids. *J. Allergy Clin. Immunol.* **78**, 321-328.
- Olin, A.C., N. Stenfors, K. Toren, A. Blomberg, R. Helleday, M.C. Ledin, G. Ljungkvist, A. Ekman, T. Sandström (2001). Nitric oxide (NO) in exhaled air after experimental ozone exposure in humans. *Respir. Med.* **95**, 491-495.
- Olin, A.C., G. Ljungkvist, B. Bake, S. Hagberg, L. Henriksson, K. Toren (1999). Exhaled nitric oxide among pulpmill workers reporting gassing incidents involving ozone and chlorine dioxide. *Eur. Respir. J.* **14**, 828-831.
- Palmer, R.M., A.G. Ferrige, S. Moncada (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
- Palmerini, C.A., C. Saccardi, A. Arienti, R. Palombari (2002). Formation of nitrosothiols from gaseous nitric oxide at pH 7.4. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **16**, 135-139.
- Parrelli, J.M., N. Meisler, K.R. Cutroneo (1998). Identification of a glucocorticoid response element in the human transforming growth factor beta 1 gene promoter. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 623-627.
- Peden, D.B., L. Dailey, W. DeGraff, J.B. Mitchell, J.G. Lee, M.A. Kaliner, R.J. Hohman (1994). Hydrogen peroxide effects on rat mast cell function. *Am. J. Physiol.* **267**, L85-93.
- Peden, D.B., R.W.J. Setzer, R.B. Devlin (1995). Ozone exposure has both a priming effect on allergen-induced responses and an intrinsic inflammatory action in the nasal airways of perennially allergic asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1336-1345.

Persson, M.G., S.G. Friberg, L.E. Gustafsson, P. Hedqvist (1995). The promotion of patent airways and inhibition of antigen-induced bronchial obstruction by endogenous nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 2957-2962.

Pietropaoli, A.P., I.B. Perillo, A. Torres, P.T. Perkins, L.M. Frasier, M.J. Utell, M.W. Frampton, R.W. Hyde (1999). Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *J. Appl. Physiol.* **87**, 1532-1542.

Piiper, J., P. Dejours, P. Haab, H. Rahn (1971). Concepts and basic quantities in gas exchange physiology. *Respir. Physiol.* **13**, 292-304.

Pincus, S.H., A.M. DiNapoli, W.R. Schooley (1982). Superoxide production by eosinophils: activation by histamine. *J. Invest. Dermatol.* **79**, 53-57.

Pryor, W.A., B. Das, D.F. Church (1991a). The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 341-348.

Pryor, W.A., M. Miki, B. Das, D.F. Church (1991b). The mixture of aldehydes and hydrogen peroxide produced in the ozonation of dioleoyl phosphatidylcholine causes hemolysis of human red blood cells. *Chem. Biol. Interact.* **79**, 41-52.

Pryor, W.A. (1992). How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts? *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 83-88.

Quanjer, P.H., G.J. Tammeling, J.E. Cotes, O.F. Pedersen, R. Peslin, J.C. Yernault (1993). Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur. Respir. J.* **16** (Suppl.), 5-40.

Radi, R., A. Cassina, R. Hodara (2002). Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* **383**, 401-409.

Redington, A.E., Q.H. Meng, D.R. Springall, T.J. Evans, C. Creminon, J. Maclouf, S.T. Holgate, P.H. Howarth, J.M. Polak (2001). Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* **56**, 351-357. Kommentar in: *Thorax* 2001, **56**, 335-336.

Reimer, U. (1997). Nachweis der mRNA der induzierbaren NO-Synthase im induzierten Sputum. *Diplomarbeit*. Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Ricciardolo, F.L., P. Geppetti, A. Mistretta, J.A. Nadel, M.A. Sapienza, S. Bellofiore, Di G.U. Maria (1996). Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in bradykinin-induced asthma. *Lancet* **348**, 374-377.

Ricciardolo, F.L., M.C. Timmers, P. Geppetti, A. van Schadewijk, J.J. Brahim, J.K. Sont, H.W. de Gouw, P.S. Hiemstra, J.H. van Krieken, P.J. Sterk (2001). Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 198-204.

Robbins, R.A., A.A. Floreani, S.G. von Essen, J.H. Sisson, G.E. Hill, I. Rubinstein, R.G. Townley (1996). Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1631-1635.

Rubbo, H., R. Radi, D. Anselmi, M. Kirk, S. Barnes, J. Butler, J.P. Eiserich, B.A. Freeman (2000). Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J. Biol. Chem.* **275**, 10812-10818.

Sadeghi-Hashjin, G., G. Folkerts, P.A. Henricks, R.B. Muijsers, F.P. Nijkamp (1998). Peroxynitrite in airway diseases. *Clin. Exp. Allergy* **28**, 1464-1473.

Saleh, D., P. Ernst, S. Lim, P.J. Barnes, A. Giaid (1998). Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J.* **12**, 929-937.

Samet, J.M., G.E. Hatch, D. Horstman, S. Steck-Scott, L. Arab, P.A. Bromberg, M. Levine, W.F. McDonnell, R.B. Devlin (2001). Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 819-825.

Sanchez de Miguel, L., M.M. Arriero, J. Farre, P. Jimenez, A. Garcia-Mendez, T. de Frutos, A. Jimenez, R. Garcia, F. Cabestrero, J. Gomez, R. de Andres, M. Monton, E. Martin, L.M. de la Calle-Lombana, L. Rico, J. Romero, A. Lopez-Farre (2002). Nitric oxide production by neutrophils obtained from patients during acute coronary syndromes: expression of the nitric oxide synthase isoforms. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 818-825.

Sanders, S.P. (1999). Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **21**, 147-149.

Santrock, J., R.A. Gorski, J.F. O'Gara (1992). Products and mechanism of the reaction of ozone with phospholipids in unilamellar phospholipid vesicles. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 134-141.

Sato, K., T. Sakamaki, H. Sumino, H. Sakamoto, J. Hoshino, H. Masuda, Y. Sawada, M. Mochida, Y. Ohyama, T. Kurashina, T. Nakamura, Z. Ono (1996). Rate of nitric oxide release in the lung and factors influencing the concentration of exhaled nitric oxide. *J. Appl. Physiol.* **270**, L914-L920.

Saura, M., C. Zaragoza, A. McMillan, R.A. Quick, C. Hohenadl, J.M. Lowenstein, C.J. Lowenstein (1999). An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* **10**, 21-28.

Schleiss, M.B., O. Holz, M. Behnke, K. Richter, H. Magnussen, R.A. Jörres (2000). The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur. Respir. J.* **16**, 1115-1118.

Schmidt, K., W. Desch, P. Klatt, W.R. Kukovetz, B. Mayer (1997). Release of nitric oxide from donors with known half-life: a mathematical model for calculating nitric oxide concentrations in aerobic solutions. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **355**, 457-462.

Sheel, A.W., J. Road, D.C. McKenzie (1999). Exhaled nitric oxide during exercise. *Sports Med.* **28**, 83-90.

Sheu, F.S., W. Zhu, P.C. Fung (2000). Direct observation of trapping and release of nitric oxide by glutathione and cysteine with electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* **78**, 1216-1226.

Silkoff, P.E., P.A. McClean, A.S. Slutsky, H.G. Furlott, E. Hoffstein, S. Wakita, K.R. Chapman, J.P. Szalai, N. Zamel (1997). Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 260-267.

Silkoff, P.E., P.A. McClean, M. Caramori, A.S. Slutsky, N. Zamel (1998). A significant proportion of exhaled nitric oxide arises in the large airways in normal subjects. *Respir. Physiol.* **113**, 33-38.

Silkoff, P.E., S. Wakita, J. Chatkin, K. Ansarin, C. Gutierrez, M. Caramori, P. McClean, A.S. Slutsky, N. Zamel, K.R. Chapman (1999). Exhaled nitric oxide after beta2-agonist inhalation and spirometry in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 940-944.

Silkoff, P.E., J.T. Sylvester, N. Zamel, S. Permutt (2000). Airway nitric oxide diffusion in asthma. Role of pulmonary function and bronchial responsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1218-1228.

Snell, J.C., O. Chernyshev, D.L. Gilbert, C.A. Colton (1997). Polyribonucleotides induce nitric oxide production by human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 369-373.

Sonnemann, H. (1997). Untersuchung zur atmungsbedingten Stickstoffmonoxidproduktion bei Gesunden und Patienten mit Atemwegserkrankungen. *Diplomarbeit*. Fachhochschule Hamburg, Fachbereich Bio-Ingenieurswesen, Produktionstechnik und Verfahrenstechnik.

Steinberg, J.J., J.L. Gleeson, D. Gil (1990). The pathobiology of ozone-induced damage. *Arch. Environ. Health* **45**, 80-87.

Ten Hacken, N.H., D.S. Postma, G. Drok, M. Smith, J. Kraan, W. Timens (2000). Increased vascular expression of iNOS at day but not at night in asthmatic subjects with increased nocturnal airway obstruction. *Eur. Respir. J.* **16**, 445-451.

Thomassen, M.J., M.S. Kavuru (2001). Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1479-1490.

Toga, H., T. Tobe, Y. Ueda, G.H. Yang, K. Osanai, M. Ishigaki, H. Okazaki, S. Katsuda, K. Takahashi, N. Ohya (2001). Inducible nitric oxide synthase expression and nuclear factor-kappaB activation in alveolar type II cells in lung injury. *Exp. Lung Res.* **27**, 485-504.

Totapally, B.R., A. Raszynski, J. Sussman, K. Hultquist, J. Hernandez, N. Andreoulakis, J. Wolfsdorf (1999). Nitric oxide and nitrogen dioxide concentrations during in vitro high-frequency oscillatory ventilation. *J. Crit. Care* **14**, 141-149.

Tsai, W.C., R.M. Strieter, D.A. Zisman, J.M. Wilkowski, K.A. Bucknell, G.H. Chen, T.J. Standiford (1997). Nitric oxide is required for effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **65**, 1870-1875.

Tsoukias, N.M., S.C. George (1998a). A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J. Appl. Physiol.* **85**, 653-666.

Tsoukias, N.M., Z. Tannous, A.F. Wilson, S.C. George (1998b). Single-exhalation profiles of NO and CO₂ in humans: effect of dynamically changing flow rate. *J. Appl. Physiol.* **85**, 642-652.

Tsujino, I., K. Miyamoto, M. Nishimura, H. Shinano, H. Makita, S. Saito, T. Nakano, Y. Kawakami (1996). Production of nitric oxide (NO) in intrathoracic airways of normal humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1370-1374.

Yates, D.H., S.A. Kharitonov, P.J. Barnes (1997). Effect of short- and long-acting inhaled β_2 -agonists on exhaled nitric oxide in asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* **10**, 1483-1488.

Van Beurden, W.J., P.N. Dekhuijzen, G.A. Harff, F.W. Smeenk (2002a). Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. *Respiration* **69**, 211-216.

Van Beurden, W.J., G.A. Harff, P.N. Dekhuijzen, M.J. van den Bosch, J.P. Creemers, F.W. Smeenk (2002b). An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir. Med.* **96**, 197-203.

Van den Toorn, L.M., S.E. Overbeek, J.C. de Jongste, K. Leman, H.C. Hoogsteden, J.B. Prins (2001). Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 2107-2113.

Van der Veen, R.C., L.J. Roberts (1999). Contrasting roles for nitric oxide and peroxynitrite in the peroxidation of myelin lipids. *J. Neuroimmunol.* **95**, 1-7.

Voter, K.Z., J.C. Whitin, A. Torres, P.E. Morrow, C. Cox, Y. Tsai, M.J. Utell, M.W. Frampton (2001). Ozone exposure and the production of reactive oxygen species by bronchoalveolar cells in humans. *Inhal. Toxicol.* **13**, 465-483.

Wang, C.H., C.Y. Liu, H.C. Lin, C.T. Yu, K.F. Chung, H.P. Kuo (1998). Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* **11**, 809-815.

Ward, J.K., P.J. Barnes, D.R. Springall, L. Abelli, S. Tadjkarimi, M.H. Yacoub, J.M. Polak, M.G. Belvisi (1995). Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 175-184.

Worlitzsch, D., G. Herberth, M. Ulrich, G. Döring (1998). Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **11**, 377-383.

Xie, L., Y. Hattori, N. Tume, S.S. Gross (2000). The preferred source of arginine for high-output nitric oxide synthesis in blood vessels. *Semin. Perinatol.* **24**, 42-45.

Xu, J., X. Xu, W. Verstraete (2001). The bactericidal effect and chemical reactions of acidified nitrite under conditions simulating the stomach. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 523-529.

Yoshimaru, T., Y. Suzuki, T. Matsui, K. Yamashita, T. Ochiai, M. Yamaki, K. Shimizu (2002). Blockade of superoxide generation prevents high-affinity immunoglobulin E receptor-mediated release of allergic mediators by rat mast cell line and human basophils. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 612-618.

Yudt, M.R., J.A. Cidlowski (2001). Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**, 1093-1103.

Zappacosta, B., S. Persichilli, F. Mormile, A. Minucci, A. Russo, B. Giardina, P. De Sole (2001). A fast chemiluminescent method for H₂O₂ measurement in exhaled breath condensate. *Clin. Chim. Acta* **310**, 187-191.

Zetterquist, W., C. Pedroletti, J.O. Lundberg, K. Alving (1999). Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur. Respir. J.* **13**, 327-333.

8 Anhang

8.1 Detaillierte Herleitung des NO-Transportmodells

Um die Schreibweise einfach zu halten und die Voraussagen des Modells direkt zu den normalerweise in ppb angegebenen Messwerten in Beziehung setzen zu können, bedient sich die nachstehende Analyse der fraktionellen Konzentration von NO anstelle des Partialdruckes oder der molaren Konzentration [PIIPER 1971]. Diese Vorgehensweise erscheint gerechtfertigt, da der Wasserdampfdruck innerhalb der Atemwege als konstant angesehen werden darf und die relativen Änderungen des barometrischen Druckes während der langsamen Atemmanöver vernachlässigbar sind.

8.1.1 Alveoläres Kompartiment

Das alveoläre Kompartiment dient als Reservoir für die Luft, welche bei der Ausatmung in die Atemwege eintritt und diese durchströmt (Abb. 4.1). Es kann im Rahmen der gegenwärtigen Analyse als homogener, gut gemischter Luftraum beschrieben werden. Die Konzentration von NO zur Zeit t sei mit $F_{ap}(t)$ abgekürzt, und die initiale Konzentration, d.h. diejenige zum Zeitpunkt $t = 0$, sei F_{ap0} .

Die Wandung des alveolären Kompartimentes wird als eine Quelle oder Senke unendlicher Kapazität für NO angenommen (analog isothermen Randbedingungen), und die Wandkonzentration bzw. ihr Äquivalent innerhalb des Luftraums im Gleichgewicht sei $F_{wp}(t)$. Die pro Zeiteinheit zwischen Wandung und Luftraum ausgetauschte Menge von NO (Transportrate, flux) ist proportional der Differenz der Konzentrationen zwischen Wandung und Luftraum sowie der zur Verfügung stehenden Oberfläche. Der Proportionalitätskoeffizient pro Einheit der Konzentrationsdifferenz, Oberfläche und Zeit sei „alveolärer lokaler Transferfaktor“ genannt und mit $\alpha_{awp}(t)$ bezeichnet. Während der Expiration verläßt NO-haltige Luft das alveoläre Kompartiment mit der Volumenflussrate $\dot{V}_{ex}(t)$. Diese ist direkt als Ausatemrate am Mund messbar, sofern sich das Volumen der Atemwege nicht merklich ändert. Die mit den hier formulierten Annahmen verbundenen Einschränkungen werden in Paragraph 8.2.5 diskutiert.

Auf der Grundlage dieser Definitionen kann eine Massenbilanzgleichung abgeleitet werden, die den zeitlichen Verlauf der alveolären NO-Konzentration während expiratorischer Manöver oder eines Atemanhaltens beschreibt. Sofern $F_{wp}(t)$ als konstant angenommen werden darf und Änderungen im Verhältnis von Volumen zu Oberfläche bzw. in $\alpha_{awp}(t)$ vernachlässigbar sind, ergibt sich als Lösung eine einfache Exponentialfunktion mit der Zeitkonstanten τ_p . Die Beziehung zwischen dem Parameter τ_p , dem alveolären lokalen Transferfaktor α_{awp} , dem alveolären Volumen V_p und der alveolären Oberfläche S_p ist phänomenologisch durch die Gleichungen

$$(A1.1) \quad \tau_p = \frac{V_p}{\alpha_{awp} \cdot S_p},$$

$$(A1.2) \quad F_{ap}(t) = F_{wp} - (F_{wp} - F_{ap0}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_p}\right)$$

gegeben. Diese Ableitung befindet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HYDE et al. [1997], in denen die Flussabhängigkeit des exhaliierten NO - auf ganz anderer Basis - als differentielle alveoläre Resorption beschrieben ist. Die alveoläre Zeitkonstante, τ_p , steht zu der konventionell aufgefaßten alveolären Diffusionskapazität für NO, D_{NO} , in der Beziehung

$$(A1.3) \quad \tau_p = \frac{V_L}{D_{NO} \cdot (P_B - 47)},$$

wobei $P_B - 47$ den barometrischen Druck abzüglich des Wasserdampfdruckes und V_L das Volumen des alveolären Kompartimentes bezeichne. Das Symbol D_{NO} ist an dieser Stelle analog zu HYDE et al. [1997] gewählt, siehe dort Gleichung (10). Da, zumindest im Falle des Asthma bronchiale, der Beitrag der Atemwege zum ausgeatmeten NO denjenigen der Alveolen bei weitem übersteigt, wurde in den numerischen Analysen der vorliegenden Untersuchung F_{ap} als konstant angenommen. Die theoretische Beschreibung umfaßt jedoch ebenfalls den allgemeinen Fall zeitabhängiger alveolärer NO-Konzentrationen.

8.1.2 Atemwegskompartiment

Das Atemwegskompartiment (zentrales Kompartiment) wird durch eine einzelne Röhre der Länge L , des Durchmessers $D(x,t)$ und des Volumen $V_c(t)$ modelliert, wobei x die Längenkoordinate entlang der Röhre und t die Zeit symbolisiert (Abb. 4.1). Zur Vereinfachung sei angenommen, dass zwar longitudinale, nicht jedoch radiale Gradienten der NO-Konzentration $F_{ac}(x,t)$ im Luftraum auftreten.

Darüber hinaus sei die NO-Konzentration in der Atemwegswandung (Mukosa, Schleimhaut) bzw. ihr Luftraumäquivalent, $F_{wc}(x,t)$, als konstant entlang des Umfangs der Röhre (bei gegebenem x) angenommen. Im Ergebnis bedeutet dies, dass die longitudinale Koordinate x als ausreichend für die Beschreibung im Raum angenommen sei. Ferner sei angenommen, dass $F_{wc}(x,t)$ nicht durch Verlust- oder Akkumulationsprozesse von NO innerhalb der Wandung beeinflusst werde. Diese Forderung läßt sich ohne wesentliche Änderung des Hauptergebnisses der gegenwärtigen Analyse abschwächen, so dass sie keine wesentliche Einschränkung der phänomenologischen Beschreibung darstellt. Die Rate des Transports von NO zwischen Atemwegswandung und -lumen ist proportional zur lokalen Konzentrationsdifferenz, Oberfläche und Zeit, und dieser Faktor ist durch den lokalen Transferfaktor, $\alpha_{awc}(x,t)$, gegeben.

Man nehme im folgenden an, dass die Atemwegsröhre bei $x = 0$ mit dem alveolären Kompartiment verbunden ist und dass während der Ausatmung Luft aus dem alveolären Kompartiment, mit der NO-Konzentration $F_{ap}(t)$, mit der Volumenflussrate $\dot{V}_{ex}(t)$ in die Röhre eintritt. Die Luft verläßt die Röhre bei $x = L$, und die Konzentration des ausgeatmeten NO beträgt $F_{ex}(t)$ (Abb. 4.1).

Zwecks mathematischer Analyse sei die Atemwegsröhre in eine Vielzahl aufeinanderfolgender Elemente zerlegt, deren jedes das Volumen $\pi \cdot D(x,t)^2 \cdot \Delta x / 4$ aufweist; die Zeit werde ebenfalls in diskrete Intervalle der Länge Δt zerlegt. Innerhalb des Zeitintervalls Δt finden zwei Prozesse statt. Zum einen erhält jedes Volumenelement der Länge Δx einen bestimmten Betrag von NO aus der Atemwegswandung, und dieser kann aufgrund obiger Überlegungen geschrieben werden als:

$$(A2.1) \quad \alpha_{awc}(x, t) \cdot (F_{wc}(x, t) - F_{ac}(x, t)) \cdot \pi \cdot D(x, t) \cdot \Delta x \cdot \Delta t.$$

Zum anderen wird das Volumenelement aufgrund der Atmung um den Betrag $v(x, t) \cdot \Delta t$ entlang der Röhre verschoben, gemäß der lokalen Strömungsgeschwindigkeit $v(x, t)$, die zur Volumenflussrate $\dot{V}_{ex}(t)$ in der Beziehung

$$(A2.2) \quad v(x, t) = \dot{V}_{ex}(t) \cdot \frac{4}{\pi \cdot D(x, t)^2}$$

steht. Die Kombination dieser beiden Effekte führt zu einer diskreten Massenbilanzgleichung, die nach dem Grenzübergang $\Delta x \rightarrow 0$ und $\Delta t \rightarrow 0$ die Form einer inhomogenen, linearen, partiellen Differentialgleichung annimmt. Sie beschreibt die NO-Konzentration innerhalb der Atemwegsröhre, $F_{ac}(x, t)$, als Funktion der Zeit t und der longitudinalen Koordinate x :

$$(A2.3) \quad \frac{\partial F_{ac}(x, t)}{\partial t} + \frac{4 \cdot \dot{V}_{ex}(t)}{\pi \cdot D(x, t)^2} \cdot \frac{\partial F_{ac}(x, t)}{\partial x} = \frac{4 \cdot \alpha_{awc}(x, t)}{D(x, t)} \cdot (F_{wc}(x, t) - F_{ac}(x, t)).$$

In dieser Gleichung stellt der erste Term der linken Seite die lokale Änderung der NO-Konzentration mit der Zeit dar, der zweite Term die Änderung, welche aus dem konvektiven Transport resultiert, und der Term auf der rechten Seite die Änderung, die sich aus dem Austausch mit der Wandung ergibt. Wertet man die Lösungen dieser Gleichung bei $x = L$ aus, so erhält man die Konzentration des ausgeatmeten NO, $F_{ex}(t)$. Um die Diskussion der qualitativen und quantitativen Charakteristika der Lösungen zu erleichtern, seien diese im folgenden für zwei analytisch lösbare Spezialfälle angegeben: 1.) konstante Flussrate und Eigenschaften der Atemwege, 2.) zeitabhängige Flussrate und Eigenschaften der Atemwege. Hierbei sind die rein mathematisch-technischen Details der Übersichtlichkeit halber fortgelassen.

8.2 Formale Lösungen des Modells

8.2.1 Konstante Flussrate und konstante Eigenschaften der Atemwege

Unter diesen Bedingungen sind lokaler Durchmesser, Transferfaktor und Wandkonzentration von NO Funktionen allein der longitudinalen Koordinate x . Anhand der lokalen Strömungsgeschwindigkeit und des Volumens der Röhre läßt sich eine Transitzeit, T , definieren, welche die Zeit angibt, die ein Volumenelement zum Transport durch die gesamte Atemwegröhre benötigt:

$$(A2.4) \quad T := \int_0^L \frac{1}{v(u)} \cdot du = \frac{V_c}{\dot{V}_{ex}}.$$

Ferner läßt sich durch Integration des lokalen Transferfaktors über die gesamte Oberfläche der Röhre ein totaler, effektiver Transferfaktor für NO, K_{awc} , definieren:

$$(A2.5) \quad K_{awc} := \int_0^L \alpha_{awc}(u) \cdot \pi \cdot D(u) \cdot du.$$

Unter Verwendung dieser Definitionen erhält man für die Konzentration des ausgeatmeten NO zu Zeitpunkten $t \geq T$ folgende Lösung:

$$(A2.6) \quad F_{ex}(t) = F_{wc}(L) - (F_{wc}(0) - F_{ap}(t-T)) \cdot e^{-\frac{K_{awc}}{\dot{V}_{ex}}} - \int_0^L \frac{dF_{wc}(u)}{du} \cdot e^{-\int_u^L \frac{\alpha_{awc}(r) \cdot D(r) \cdot \pi}{\dot{V}_{ex}} dr} \cdot du.$$

Diese Gleichung beschreibt auf experimentell überprüfbare Weise, wie die Konzentration des ausgeatmeten NO vom flussabhängigen Transport von NO zwischen Wandung und Lumen abhängt. Die initiale Konzentration, welche der in die Röhre eingespeisten Luft zukommt, entspricht hierbei der in geeigneter Weise zeitverschobenen peripheren, alveolären NO-Konzentration. Wenn die mukosale NO-Konzentration, F_{wc} , entlang der Röhre konstant ist, entfällt der dritte Term auf der rechten Seite und die Gleichung vereinfacht sich zu:

$$(A2.7) \quad F_{ex}(t) = F_{wc} - (F_{wc} - F_{ap}(t-T)) \cdot \exp\left(-\frac{K_{awc}}{V_{ex}}\right), \quad t \geq T.$$

Die vorstehende Analyse zeigt, dass bei Abwesenheit räumlicher (longitudinaler) Inhomogenitäten der Wandkonzentration von NO, F_{wc} , alle Inhomogenitäten sowohl des lokalen Transferfaktors, $\alpha_{awc}(x)$, als auch des lokalen Durchmessers, $D(x)$, in den totalen, effektiven Transferfaktor, K_{awc} , zusammengezogen werden (Glg. A2.5). Numerische Abschätzungen legen nahe, dass der Korrekturterm für Inhomogenitäten der NO-Wandkonzentration, d.h. der dritte Term in Glg. (A2.6), gegenüber den anderen Termen klein ist und nur unter günstigen Bedingungen anhand von Messdaten zu identifizieren sein dürfte.

Darüber hinaus belegt Glg. (A2.7), dass die Konzentration des ausgeatmeten NO zerlegt werden kann in einen ausschließlich flussabhängigen Part, welcher die NO-Erzeugung innerhalb der Atemwege beschreibt, und einen ausschließlich zeitabhängigen Part, welcher den Zeitverlauf der alveolären NO-Konzentration in zeitlich verschobener Weise widerspiegelt. Hierbei hängt die Zeitverschiebung von der Ausatemrate ab. Die obige Analyse führt zu der zentralen Erkenntnis, dass bei konstanter Ausatemrate die Flussabhängigkeit von NO auf einen Ursprung innerhalb der Atemwege verweist, die Zeitabhängigkeit hingegen auf einen Ursprung innerhalb der Alveolen. Wenn die periphere, alveoläre NO-Konzentration über die Zeit konstant ist, verschwindet die Zeitabhängigkeit in Glg. (A2.7), welche sich in diesem Fall auf Glg. (1) reduziert.

8.2.2 Zeitabhängige Flussrate und Eigenschaften der Atemwege

Zum Zwecke der Vereinfachung sei angenommen, dass die Eigenschaften der Atemwegsröhre nicht von der longitudinalen Koordinate x , sondern nur von der Zeit t abhängen. Das Volumen, $V_c(t)$, der Röhre zum Zeitpunkt t beträgt

$$(A2.8) \quad V_c(t) := \frac{\pi \cdot D(t)^2}{4} \cdot L,$$

und der totale effektive Transferfaktor, $K_{awc}(t)$, zur Zeit t ist:

$$(A2.9) \quad K_{awc}(t) := \alpha_{awc}(t) \cdot \pi \cdot D(t) \cdot L.$$

Verwendet man die Beziehung zwischen Volumenflussrate und Strömungsgeschwindigkeit, $v(t)$ (Glg. A2.2), so kann die Strecke $Y(t)$ berechnet werden, die ein Volumenelement innerhalb der Röhre von Zeit 0 bis Zeit t zurücklegt. Für positive Flussraten, d.h. wenn sich die Strömung nicht umkehrt, ist die Umkehrfunktion Y^{-1} definiert, welche entsprechend die Zeit angibt, bei der eine bestimmte vorgegebene Strecke durchquert ist. Diese Funktionen erlauben es formal, die Transitzeit, $T(t)$, jedes Volumenelementes zu berechnen, das zur Zeit t die Atemwegsröhre verläßt, d.h. ausgeatmet wird. Dies ist gerade diejenige Zeit, die benötigt wird, die gesamte Röhre der Länge L zu durchqueren:

$$(A2.10) \quad T(t) := t - Y^{-1}(Y(t) - L), \quad \text{wobei} \quad Y(t) := \int_0^t v(u) \cdot du.$$

Die Transitzeit bestimmt (unter der Bedingung der Homogenität) die Konzentration des ausgeatmeten NO vermittelt:

$$(A2.11) \quad F_{ex}(t) = F_{wc} - (F_{wc} - F_{ap}(t - T(t))) \cdot \exp\left(- \int_{t-T(t)}^t \frac{K_{awc}(u)}{V_c(u)} \cdot du\right).$$

Diese Gleichung zeigt in klarer Weise, dass sich die Konzentration des ausgeatmeten NO zum Zeitpunkt t auch vom peripheren, alveolären NO herleitet unter Berücksichtigung der zeitlichen Verzögerung $T(t)$ und der Beiträge der Atemwegswandung, die sich aus einer Integration über die Eigenschaften der Atemwege und die Flussrate über das Zeitintervall $T(t)$ ergeben (vgl. Glgn. A2.5 und A2.7).

8.2.3 Zeitabhängige Flussrate und zeitunabhängige Parameter

Bei zeitabhängiger Flussrate, jedoch zeitunabhängigen Charakteristika der Atemwegsröhre, sind K_{awc} und V_c konstant. Setzt man eine konstante alveoläre NO-Konzentration, F_{ap} , ein, so ergibt sich aus Glg. (A2.11) die Ausatemkonzentration zu:

$$(A2.12) \quad F_{ex}(t) = F_{wc} - (F_{wc} - F_{ap}) \cdot \exp\left(-\frac{K_{awc}}{V_c} \cdot T(t)\right).$$

Es sei angemerkt, dass aufgrund der Beziehung $V_c = \dot{V}_{ex}(t) \cdot T$ (vgl. Glg. A2.4) für eine konstante Transitzeit, T , Glg. (A2.12) äquivalent zu Glg. (1) ist. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass - zumindest unter geeigneten vereinfachenden Annahmen - die Transitzeit die primäre Größe darstellt, welche die Ausatemkonzentration von NO bestimmt. Eine zeitabhängige Transitzeit korrespondiert einer äquivalenten mittleren Flussrate für jedes Volumen, das die Atemwegsröhre zum Zeitpunkt t verläßt. Die Definition der Transitzeit, $T(t)$, (Glg. A2.10) kann somit in stärker intuitiver Form gefaßt werden als diejenige Zeit, die notwendig ist, um das gesamte Volumen der Atemwegsröhre, V_c , mittels der zeitabhängigen Flussrate $\dot{V}_{ex}(t)$ zu füllen:

$$(A2.13) \quad V_c = \int_{t-T(t)}^t \dot{V}_{ex}(u) \cdot du.$$

Diese Umformungen sind die Voraussetzung, um im folgenden das Konzept der Stufenantwort in mathematisch valider Weise zu formulieren.

8.2.4 Die Stufenantwort als Anwendung des Konzeptes zeitabhängiger Flussraten

Die Auswertung einer Stufenantwort umfaßt definitionsgemäß die Analyse des Ausgangssignals eines Systems nach einer plötzlichen (stufenförmigen) Änderung des Eingangssignals. Ausgangssignal ist im vorliegenden Falle die Konzentration des ausgeatmeten NO, Eingangssignal die Atemflussrate als einzige nicht invasive Kontrolloption im betrachteten respiratorischen System.

Die plötzliche Änderung der Volumenflussrate vom Wert $\dot{V}_{ex,1}$ zum Wert $\dot{V}_{ex,2}$ erfolge zur Zeit t_s . Diese Intervention impliziert zunächst eine Stufenantwort der Transitzeit, $T(t)$, (Glg. A2.13) und in der Folge der Konzentration des ausgeatmeten NO, $F_{ex}(t)$; um letzteres zu erkennen, setze man den Ausdruck für $T(t)$ in Glg. (A2.12) ein. Als Ergebnis für $T(t)$ erhält man:

$$(A2.14) \quad T(t) = \left\{ \begin{array}{ll} T_1, & t \leq t_s \\ T_1 - (t - t_s) \cdot (T_1/T_2 - 1), & t_s \leq t \leq t_s + T_2 \\ T_2, & t_s + T_2 \leq t \end{array} \right\}, \quad \text{mit} \quad T_1 = \frac{V_c}{\dot{V}_{ex,1}}, \quad T_2 = \frac{V_c}{\dot{V}_{ex,2}}.$$

Fügt man zur Vervollständigung einen mundwärts gelegenen Totraum ein, in dem NO weder produziert noch absorbiert wird, so resultiert eine zusätzliche Totzeit T_{delay} , die vom Sprung der Flussrate bis zur ersten detektierbaren Änderung der NO-Konzentration verstreicht und der zur Durchquerung des Totraumes V_d benötigten Zeit entspricht.

Als Ergebnis dieser Überlegungen und als Voraussage des NO-Transportmodelles erhält man die Kurven von Abb. 4.4. In einem phänomenologischen Modell, welches einer black-box-Analyse entspricht, muss das Volumen der Atemwegsröhre mit dem zentralen Produktionsvolumen für NO, V_c , identifiziert werden, da letzteres nur anhand der Röhrencharakteristika, d.h. der Flussabhängigkeit, identifiziert werden kann. Daher ist die empirische Übergangszeit, $T_{transit}$, bis zur Erreichung des neuen steady-state-Wertes der NO-Konzentration mit der Transitzeit T_2 identisch, die erfordert wird, das Volumen der Atemwegsröhre einmal neu zu füllen.

8.2.5 Verfeinerung des Modells durch Einbeziehung der mukosalen Flüssigkeitsschicht

Der lokale Transferfaktor für NO, α_{awc} , kann zu physikalischen und physikochemischen Charakteristika des Systems in Beziehung gesetzt werden, wenn angenommen wird, dass die innere Oberfläche der Atemwegsröhre von einem Flüssigkeitsfilm der Dicke h ausgekleidet wird und der NO-Konzentrationsgradient innerhalb dieser Schicht die Rate des Transports (flux) von NO in das Lumen vermittelt des Diffusionskoeffizienten γ_L innerhalb dieser Schicht bestimmt.

Ein derartiger Flüssigkeitsfilm ist für die Atemwegs unter dem Namen „epithelial lining fluid (ELF)“ wohlbekannt. Nimmt man ein lokales Gleichgewicht zwischen der Oberfläche des Flüssigkeitsfilmes und dem Luftraum an, kann die korrespondierende Massenbilanzgleichung für NO analytisch gelöst werden. Bei zeitlich konstantem peripherem, alveolärem

NO und konstanten Charakteristika der Atemwegsröhre ergibt sich im Prinzip die gleiche Lösung wie Glg. (1). Jedoch kann der lokale Transferfaktor, α_{awc} , jetzt explizit als Funktion des Diffusionskoeffizienten, γ_L , und der Flüssigkeitdicke, h , geschrieben werden:

$$(A2.15) \quad \alpha_{awc} = \frac{\gamma_L}{h}.$$

Diese Gleichung veranschaulicht die intuitiv einleuchtende Tatsache, dass der lokale Transferfaktor von NO umgekehrt proportional zur Dicke des zu durchquerenden Flüssigkeitsfilmes ist.

Zusätzlich ist es möglich, einen Verlustterm mit entsprechendem Koeffizienten einzuführen, der beispielweise die Umsetzung eines Teiles des erzeugten NO durch konzentrationsproportionale chemische Reaktionen beschreibt; dieser Teil steht dann nicht mehr für einen Transport ins Atemwegslumen zur Verfügung. Analog läßt sich ein Produktionsterm einführen, welcher zusätzliche Quellen von NO innerhalb der Flüssigkeitsschicht beschreibt. Die mathematische Analyse dieser Verfeinerungen ist elementar, jedoch umfänglich, und sei an dieser Stelle ausgelassen. In jedem Falle zeigt sie, dass die fundamentale Glg. (1) gültig bleibt. Allerdings schreiben sich nun F_{wc} und K_{awc} als Funktionen der verschiedenen Koeffizienten, die Verlust, Produktion und Diffusion innerhalb des Flüssigkeitsfilms charakterisieren.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Einführung detaillierter physikalischer und chemischer Prozesse in das Modell sowie seine Verfeinerung durch Zulassen von Inhomogenitäten nicht zu grundsätzlichen Änderungen an Glg. (1) führen. Durch rein phänomenologische, nicht invasive Analysen lassen sich die meisten der einzelnen unterliegenden Prozesse im Rahmen der Messgenauigkeit nicht trennen oder auflösen, zumal sie sich wechselseitig (partiell) kompensieren können. Jedoch erscheint die Einsicht als wertvolles Ergebnis, dass die Form von Glg. (1) mathematisch gesehen robust ist und die realen Verhältnisse mit guter Genauigkeit summarisch beschreiben kann, obgleich daran viele Faktoren und Kompartimente beteiligt sind.

Danksagung

Herrn Professor Dr. G. Gercken danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die stete Unterstützung und Ermutigung, die sorgfältige und kritische Durchsicht der Arbeit und nicht zuletzt für seine Geduld.

Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Dr. H. Magnussen für die Möglichkeit, die Messungen durchführen zu können, die Bereitstellung der erforderlichen Mittel und Geräte, sowie für ausgiebige Diskussionen und dauerhafte Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors des Krankenhauses Großhansdorf Silke Koschyk, Petra Timm, Kerstin Templin, Kirsten Paasch, Stefanie Böhme, Stanislaw Janicki, Miguel Schleiss und Inga Robinson sei herzlicher Dank gesagt für die gute Zusammenarbeit.

Ungezählte anregende Gespräche, viel Rückhalt und nachhaltige Unterstützung verdanke ich Herrn Dr. Detlef Loppow, Dr. Lars Grönke, Dr. Christian Taube, Dr. Lutz Welker, Prof. Dr. D. Kirsten und Frau Dr. Michaela Behnke. Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dipl.-Ing. Olaf Holz für seinen unermüdlichen Einsatz, die Findigkeit im Lösen vertrackter Probleme und die vielen förderlichen Diskussionen.

Die Anwendung des NO-Modells schien im ersten Augenblick einfach, stellte sich jedoch als langwieriger Weg mit unzähligen technischen Klippen heraus. Danken möchte ich den Herren Dipl.-Ing. Henrik Sonnemann, Jörg Lohmann, André Midani sowie Dr. Anne-Marie Kirsten, Michael Zander und Jan Hansen, die in verschiedenen Phasen der Entwicklung die Mühsal zeitraubender - und auch frustrierender - Messungen auf sich nahmen und es immer wieder aufs Neue unternahmen, technische Lösungen aufzubauen. Ohne ihre Mithilfe hätten die Daten dieser Arbeit nicht erhoben werden können.

Allen Mitarbeitern und Kollegen im Forschungslabor des Krankenhauses Großhansdorf danke ich für die anregende und freundliche Arbeitsatmosphäre, welche die Voraussetzung der ausgedehnten Untersuchungen dieser Arbeit war. Verpflichtet fühle ich mich auch der LVA - Freie und Hansestadt Hamburg und dem Projekt PUG des Landes Baden-Württemberg, die durch großzügige Bereitstellung von Fördermitteln die Untersuchungen ermöglicht haben.

Und nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mir die Freiheit gelassen haben, meinen Weg zu beschreiten.

Lebenslauf

- 03.03.1953 geboren in Düren/Rheinland
- 1959 Hauptschule in Vossenack/Hürtgenwald
- 1963 Stiftisches Gymnasium in Düren, altsprachlicher Zweig
- 1971 Abitur, Studium der Forstwissenschaft an der Georg-August-Universität Göttingen
- 1972-1976 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Spezialisierung auf Mathematische Biologie
- 1977-1980 Tätigkeit im Naturschutz
- 1981-1982 Zivildienst in der Pneumologischen Abteilung der Poliklinik der Universität Bonn
- 1984 Diplom in der mathematischen Arbeitsgruppe der Abteilung für Experimentelle Ökologie, Botanisches Institut der Universität Bonn (Prof. Dr. K. Brinkmann, PD Dr. W. Martin)
- 1984 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Pneumologischen Abteilung der Universitäts-Poliklinik Bonn (Prof. Dr. H. Magnussen)
- 1985 Wechsel an das Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie, Aufbau einer wissenschaftlichen Arbeitsgruppe

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Mitteln
verfertigt zu haben.

Datum der letzten mündlichen Prüfung: 11. März 2003.