

## 6 Zusammenfassung

---

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des ausgeatmeten NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu verstehen. In den beiden ersten Untersuchungen wurde mittels strikt nicht invasiver Messungen geklärt, in welchem Bereich der Lunge NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messung als Marker der entzündlichen Aktivität auf kurzzeitige Vergleiche einschränkt.

Die dritte Untersuchung ermittelte die Konzentrationen des ausgeatmeten NO und  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu eruieren ist. Vermutlich hat dies seinen Grund im Falle des  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> originates. Breath condensate was obtained at three different flow rates in 15 subjects to determine whether the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depends on flow rate. Additionally, measurements were repeated 2-5 times to assess reproducibility. In all subjects the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a marker of airway inflammation to short-term comparisons.

In the third study NO and  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Presumably the difficulties are related to the chemical reactivity of  $\text{H}_2\text{O}_2$  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.