

Krankenhaus Großhansdorf
Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie
Ehemaliger Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Helgo Magnussen

**Analyse des ausgeatmeten
Wasserstoffperoxides
während Chemotherapie bei Patienten mit
Bronchialkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von Juliane A. M. Crusius aus Jena

Hamburg 2012

Angenommen vom Fachbereich der Medizin
der Universität Hamburg am: 22.07.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Helgo Ma-
gnussen

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Frank Riedel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. med. Martin Busch

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Die Messung der Atemwegentzündung	2
1.2.1 Bronchoskopie	2
1.2.2 Sputumanalytik	2
1.2.3 FeNO-Messung	3
1.2.4 Messung der neutrophilen Atemwegsentzündung	4
1.3 Wasserstoffperoxid	4
1.3.1 Methodik der Kondensatsammlung	5
1.3.2 Herkunft des H ₂ O ₂	5
1.4 Bronchialkarzinom	6
1.4.1 Definition	6
1.4.2 Epidemiologie und Pathophysiologie	7
1.4.3 Hauptursachen	7
1.4.4 Symptomatik	8
1.4.5 Diagnostik	8
1.4.6 Therapie	9
1.5 Marker im Exhalat und deren Bedeutung	12
1.6 Art der Prüfung	14
1.7 Ziel der Arbeit	15
1.8 Hypothesen	15

2	Methodik	17
2.1	Studiendesign	17
2.1.1	Einschlusskriterien	18
2.1.2	Ausschlusskriterien	19
2.2	Durchführung	19
2.3	Messmethodik	20
2.3.1	Klinische Daten und Soziodemographie	20
2.3.2	Messung von FeNO	20
2.3.3	Sammeln von EBC zur Bestimmung des H ₂ O ₂	21
2.4	Statistische Auswertung	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Beschreibung der Stichprobe	25
3.1.1	Soziodemographische Merkmale	25
3.1.2	Krankheitsmerkmale	27
3.2	Ergebnisse zum ersten Messzeitpunkt	28
3.2.1	Klinischer Gesundheitszustand und Rauchverhalten	28
3.2.2	Laborchemische Ergebnisse für H ₂ O ₂ , FeNO, BB	29
3.3	Ergebnisse im Vergleich Tag 1, Tag 8 und Tage 21-29	29
3.3.1	Klinischer Gesundheitszustand und Rauchverhalten	29
3.3.2	Demographische Merkmale	30
3.3.3	Laborchemische Ergebnisse für H ₂ O ₂ , FeNO, BB	30
3.4	Ergebnisse im Vergleich Tag 1, Tag 15 und Tage 21-29	31
3.4.1	Klinischer Gesundheitszustand und Rauchverhalten	31
3.4.2	Demographische Merkmale	31
3.4.3	Laborchemische Ergebnisse für H ₂ O ₂ , FeNO, BB	32
3.5	Veränderung des klinischen Gesundheitszustandes über die Zeit	33
4	Diskussion	35
	Literatur	45

Anhang	53
A.1 Danksagung	53
A.2 Fragebogen	55
A.3 Erklärung	57

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
/µL	pro Mikroliter
Abb	Abbildung
ACO-Schema	Chemotherapeutika (Adriamycin plus Cyclophosphamid plus Vincristin)
ANOVA	Analysis of Variance
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATS	American Thoracic Society
AUC	Fläche unter der Kurve eines Graphen (engl. area under the curve)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Spülflüssigkeit
BB	Blutbild
BW	bronchiale Spülung
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CEV-Schema	Chemotherapeutika (Carboplatin plus Etoposid plus Vincristin)
cm H ₂ O	Wassersäule
CO	Kohlenstoffmonoxid
COHb	Carboxyhämoglobin
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
CYFRA 21-1	Cytokeratinfragment 21-1
EBC	Exhaliertes Ausatemkondensat

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FeNO	fractional exhaled nitric oxide
FEV ₁	forcierte Einsekundenkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
Gy	Bestrahlungseinheit nach Gray
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
IQR	Interquartilsbereich
mLs	Milliliter pro Sekunde
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NIOX	Gerät zur Messung von FeNO
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	neuronenspezifische Enolase
O ₂	molekularer Sauerstoff
p	statistische Signifikanz
PE-Schema	Chemotherapeutika (Cisplatin plus Etoposid)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RNS	reaktive Nitrogenspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SF-3000	gängige Methode zur Blutkörperchenzählung
SOD	Superoxiddismutase
TNM-Klassifikation	T=Größe des Tumors, N=Befall von Lymphknoten, M=Vorhandensein von Metastasen

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Entzündung spielt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von vielen Lungenerkrankungen [BARNES 2005]. Beim Asthma bronchiale und der COPD wird die Entzündung mit Steroiden behandelt, eine Messung der Entzündung findet jedoch in der Regel nicht statt. Derzeit lassen sich in der klinischen Praxis für das Therapiemanagement dieser Erkrankungen die Lungenfunktion messen und die Symptome erfassen. Beim Asthma sind typische Symptome Gie-men, Husten, Dyspnoe und thorakale Enge, bei der COPD sind die Leitsymptome Husten mit Auswurf und Belastungsdyspnoe. Zudem lässt sich beim Asthma die bronchiale Hyperreagibilität ermitteln. Die Befunde, die mit diesen Standardverfahren erhoben werden, lassen sich aber nur bedingt für das Therapie-Management nutzen. Bei Vorhandensein von Symptomen lässt sich die Erkrankung identifizieren und deren Verlauf erfassen. Es besteht aber die Schwierigkeit, dass Symptome von Patienten oft nicht objektivierbar geschildert werden. Die Lungenfunktionsmessung erbringt den Nachweis einer Obstruktion. Die Befunde der Lungenfunktion sind jedoch von der Kooperation des Patienten abhängig, und die kann bei manchen Patienten nicht ausreichend vorhanden sein. Zur definitiven Bestimmung der bronchialen Hyperreagibilität ist eine unspezifische Provokation mit z.B. Methacholin oder Histamin erforderlich. Die Hyperreagibilität der Atemwege wird zwar als klinisches Korrelat der bronchialen Inflammation gesehen, spiegelt jedoch nur zu einem Teil das Ausmaß der Atemwegsinflammation wieder [LEX 2007]. Insgesamt hängen aber die Lungenfunktion, die Symptome und die bronchiale Hyperreagibilität nur bedingt mit dem

Entzündungsgeschehen zusammen. Bei der Diagnostik und dem Management der Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale und der COPD können die Art und das Ausmaß der Atemwegsentzündung zum jetzigen Zeitpunkt also selten berücksichtigt werden. Diese können jedoch sinnvoll und hilfreich sein für die Diagnostik und die Therapie [HOLZ u. a. 2007; LEX 2007].

Es besteht daher ein Bedarf an Methoden zur Messung der entzündlichen Prozesse in der Praxis. Die in dieser Arbeit untersuchte Methode zur Messung der neutrophilen Atemwegsentzündung soll diese Lücke schließen und einen für die Diagnostik und die Therapie bedeutsamen Erkenntnisgewinn schaffen.

1.2 Die Messung der Atemwegentzündung

1.2.1 Bronchoskopie

Das Standardverfahren zur Messung der Entzündung in den Atemwegen ist die Bronchoskopie mit Installation von Spülflüssigkeit in ein ausgewähltes Segment der Lunge. Je nach Tiefe der Spülung spricht man von bronchialer Spülung (BW) bzw. von bronchoalveolärer Spülung oder Lavage (BAL). Die Spülflüssigkeit kann biochemisch analysiert werden. Außerdem kann eine Differenzierung der herausgespülten Zellen vorgenommen werden. Durch eine Biopsie der Bronchialwand lässt sich eine Aussage über die Entzündung im Bronchialgewebe treffen. Bronchoskopische Verfahren sind invasiv und zeitaufwendig, daher sind sie für wiederholte Untersuchungen ungeeignet und werden zur Messung einer Atemwegsentzündung nur sehr selten genutzt.

1.2.2 Sputumanalytik

Einige Patienten können Sputum spontan produzieren, andere sind auf die Inhalation vernebelter Kochsalzlösung zur Erleichterung der Sputumproduktion angewiesen (Sputuminduktion). Die Sputumanalytik stellt somit ein nichtinvasives Verfahren dar, das sich besser zur Messung der Atemwegsentzündung eignet. Wie auch bei der BAL ermöglicht die Sputumanalytik eine direkte Untersuchung

von Zellen und Mediatoren aus den Atemwegen, kann aber wiederholt durchgeführt werden. Eine Sputuminduktion wird durch die Inhalation von ultraschall vernebelter Kochsalzlösung durchgeführt, bei der bei Patienten mit Asthma oder COPD das Risiko einer Bronchokonstriktion besteht. Da eine Sputuminduktion und die anschließende Aufarbeitung des Sputums ebenfalls sehr zeit- und damit kostenintensiv sind, wird das Verfahren in der klinischen Praxis kaum eingesetzt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Diagnostik des Spontansputums zum Teil für die klinische Praxis hilfreich sein kann [HOLZ u. a. 2008].

1.2.3 FeNO-Messung

Die gasförmigen Bestandteile der Ausatemluft lassen sich messen. Dazu gehören NO, O₂, CO und leicht flüchtige organische Verbindungen. Der Anteil des Stickstoffmonoxids an der Ausatemluft wird als FeNO bezeichnet.

FeNO ist ein etablierter Marker für die eosinophile Atemwegsentzündung [BARNES und KHARITONOV 1996; SANDERS 1999; BERLYNE und BARNES 2000; KHARITONOV und BARNES 2001], denn seine Konzentration korreliert relativ gut mit der Zahl der Eosinophilen im Sputum [GROENKE u. a. 2002]. FeNO ist in der Regel bei allergischen Atemwegserkrankungen wie z.B. bei der Rhinitis oder dem Asthma bronchiale erhöht. FeNO entsteht in den Bronchien [SILKOFF u. a. 1997]. Es wird vermutet, dass die Epithelzellen der Atemwege Stickstoffmonoxid produzieren. Beziehungen zu anderen Zelltypen (z.B. Makrophagen/ Monozyten) sind wahrscheinlich. Das Verfahren der FeNO-Messung ist demnach geeignet, um eine eosinophile Atemwegentzündung und das Ansprechen auf eine Kortikosteroidbehandlung zu erfassen. Ein wesentlicher Vorteil dieser nichtinvasiven Messung der Atemwegsentzündung liegt in der schnellen und einfachen Durchführung [HOLZ u. a. 2007]. Das Messergebnis liegt unmittelbar vor. In der klinischen Praxis ist dieses Verfahren das einzig praktikable, das aktuell zur Messung der (eosinophilen) Atemwegsentzündung zur Verfügung steht. Portable NO Messgeräte finden sich mittlerweile in fast jeder pneumologischen Praxis in Deutschland. Ein Nachteil des Verfahrens ist, dass die Atemwegsentzündung nur indirekt gemessen wird, und die relativ hohen Anschaffungskosten der Ana-

lysatoren und die Kosten für das Verbrauchsmaterial.

1.2.4 Messung der neutrophilen Atemwegsentzündung

Um eine neutrophile Atemwegentzündung zu erfassen, gibt es momentan keine geeignete Methode. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Bestimmung von Wasserstoffperoxid in der Ausatemluft zur indirekten Messung der neutrophilen Atemwegsentzündung bei Atemwegserkrankungen als nicht invasives Verfahren geeignet ist und eine ähnliche Wertigkeit wie die Stickstoffmonoxidanalyse bei der Erfassung einer eosinophilen Atemwegsentzündung erlangen könnte.

1.3 Wasserstoffperoxid

H₂O₂ ist unter anderem in den vom Menschen ausgeatmeten Aerosolen und in der Gasphase enthalten und kann in der Ausatemluft nachgewiesen werden. Wasserstoffperoxid ist in reinem Zustand eine blassblaue, frei mit Wasser mischbare, in verdünnter Form farblose Flüssigverbindung aus Sauerstoff und Wasserstoff. Dieses aggressive Molekül reagiert mit organischen Verbindungen und dient als sehr starkes Oxidationsmittel [HALLIWELL und GUTTERIDGE 1999]. Als Hauptquelle des H₂O₂ werden die Leukozyten vermutet [LOEW 2008].

Wasserstoffperoxid wurde in den letzten 15 Jahren als Marker bei Atemwegsentzündungen verwendet [VAN BEURDEN und DEKHUIJZEN 2005]. Erhöhte Werte des Wasserstoffperoxids fand man bei COPD [DEKHUIJZEN u. a. 1996; NOWAK u. a. 1999; DE BENEDETTO u. a. 2000], Bronchiektasen [LOUKIDES u. a. 2002], Asthma bronchiale [ANTCZAK u. a. 1997; JOEBSIS u. a. 1997; HORVÁTH u. a. 1998; EMELYANOV u. a. 2001], Pneumonie [MAJEWSKA u. a. 2004] und cystischer Fibrose [JOEBSIS u. a. 2000].

Der Anteil an Wasserstoffperoxid in der Ausatemluft verringert sich unter der Durchführung von entzündungshemmenden Maßnahmen [ANTCZAK u. a. 2000; EMELYANOV u. a. 2002; VAN BEURDEN u. a. 2003] und der Verabreichung von Antibiotika [JOEBSIS u. a. 2000] und Antioxidantien [KASIELSKI und NOWAK 2001;

DE BENEDETTO u. a. 2005].

1.3.1 Methodik der Kondensatsammlung

Atemkondensat wird gewonnen, indem in Ruhe über einen Zeitraum von 10 Minuten durch einen Kühler ($< -10^{\circ}\text{C}$) ausgeatmet wird. Die Feuchte der Ausatemluft und Aerosole in der Ausatemluft kondensieren und werden in einem Sammelbehälter aufgefangen. Das Kondensat oder Exhalat wird in der Regel zunächst eingefroren und später analysiert. Die Konzentration der sich im Kondensat befindlichen Substanzen kann mit verschiedenen Methoden gemessen werden.

Das Exhalat enthält zu $>99\%$ Wasser, das bedeutet, dass die aus der Lunge abgeschiedenen Aerosole Substanzen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder andere chemische und biochemische Bestandteile in nur sehr niedriger Konzentration enthalten sind. Der Vorteil der Sammlung von Atemkondensat zur Bestimmung von diversen darin enthaltenen Mediatoren liegt in der einfachen, nichtinvasiven Methode der Probengewinnung [HORVÁTH u. a. 2005]. Das Verfahren kann zur Messung der Atemwegsentzündung bei Atemwegserkrankungen eingesetzt werden und ist zudem auch bei Kindern anwendbar. Die Kondensatsammlung kann in kurzen Intervallen wiederholt werden. Für den Patienten ist das Sammeln von Atemkondensat sicher und mit wenig Anstrengung verbunden. Diese Untersuchungsmethode wird daher auch von schwerer erkrankten Patienten ohne Risiko gut toleriert akzeptiert. Die dafür notwendige Technik ist kostengünstig.

1.3.2 Herkunft des H_2O_2

Die Abhängigkeit des Anteils an Wasserstoffperoxid von der Ausatemrate lässt annehmen, dass die Bronchien der Entstehungsort des ausgeatmeten Wasserstoffperoxids sind [SCHLEISS u. a. 2000]. Innerhalb der Bronchien kommen neutrophile Granulozyten und Makrophagen als Hauptproduzenten in Frage. Welcher der beiden Zelltypen die zentrale Rolle für die Produktion des H_2O_2 spielt,

ist ungeklärt. Es gibt Studien, die als mögliche wichtige zelluläre Entstehungsquelle für H_2O_2 die Neutrophilen annehmen, wie auch deren Korrelation mit dem Krankheitsgrad bei COPD [DEKHUIJZEN u. a. 1996] und Bronchiektasen [LOUKIDES u. a. 2002] vermuten lässt. Man weiss, dass bei der Atemwegsentzündung eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen wie z.B. die Makrophagen/ Monozyten aktiviert werden können.

Bezug nehmend auf die Korrelation des Ausgangswertes des Wasserstoffperoxids mit der Schwere der Erkrankung, gestaltet es sich als schwierig, das ausgeatmete Wasserstoffperoxid einem spezifischen Zelltyp zuzuordnen. Ähnlich üben wahrscheinlich Antioxidantien und entzündungshemmende Maßnahmen stärkere Effekte auf H_2O_2 aus.

1.4 Bronchialkarzinom

1.4.1 Definition

Bronchialkarzinome sind bösartige epitheliale Tumoren der Bronchien oder der Lunge [ARASTEH u. a. 2009]. Nach dem biologischen Verhalten und den Konsequenzen für Therapie und Prognose werden histologisch kleinzellige Lungenkarzinome (15 bis 20%) von nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen unterschieden [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009]. Kleinzellige Bronchialkarzinome werden mit SCLC (small cell lung cancer) und nichtkleinzellige Bronchialkarzinome mit NSCLC (non small cell lung cancer) abgekürzt. SCLC metastasieren sehr früh sowohl lymphogen als auch hämatogen [ARASTEH u. a. 2009]. Für das kleinzellige Bronchialkarzinom ist die Prognose ohne Therapie ungünstig. NSCLC wachsen meist lange lokal, bevor sie Fernmetastasen setzen [ARASTEH u. a. 2009]. Die Prognose ist vom klinischen Stadium abhängig. Für das 5-Jahresüberleben liegt sie zwischen 50% im Stadium Ia und 2% im Stadium IV [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009]. Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome kann man in drei histologische Typen unterteilen:

- Plattenepithelkarzinom¹ (30 bis 40%)

¹... entsteht aus einer Plattenepitheldysplasie nach chronischer Schleimhautreizung

- Adenokarzinom² (25 bis 30%); häufigste Lungenkrebsart bei Nichtrauchern
- Großzelliges Bronchialkarzinom³ (ca. 10%). [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009]

1.4.2 Epidemiologie und Pathophysiologie

Das Lungenkarzinom liegt in Deutschland in der Häufigkeit der Neuerkrankungen bei Männern und bei Frauen an dritter Stelle. Zwischen 75 und 80 Jahren ist die Anzahl der Neuerkrankungen am höchsten. Jährlich erkranken ca. 65 von 100 000 Männern und ca. 21 von 100 000 Frauen an Lungenkrebs. Der Lungenkrebs ist in Deutschland und weltweit bei Männern das Krebsleiden, welches am häufigsten zum Tode führt, bei Frauen steht es in Deutschland an dritter Stelle. Während bei den Männern die Zahlen konstant oder leicht rückläufig sind, ist bei den Frauen eine Zunahme zu konstatieren. Über Jahre bis Jahrzehnte erstreckt sich wahrscheinlich die Karzinogenese eines Lungenkarzinoms. Dabei kommt es zu Zellveränderungen auf molekularer Ebene, die zum invasiv wachsenden Lungenkarzinom führen [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009].

1.4.3 Hauptursachen

Auslöser der Lungenkrebsentstehung ist der Kontakt mit einer exogenen Noxe, insbesondere das inhalative Zigarettenrauchen. Bei 90 Prozent aller Lungenkarzinome ist das Tabakrauchen für die Tumorentstehung verantwortlich [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009]. Für männliche Raucher ist damit das Risiko, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln 22-mal und bei Frauen 12-mal höher als bei Nichtrauchern. Es besteht eine Korrelation zwischen der Zahl der gerauchten Zigaretten und dem Karzinomrisiko. Eine Verdopplung der so genannten „Pack years“⁴ führt zu einem Anstieg der Bronchialkarzinomsterblichkeit um das zwei

²... entsteht aus schleimproduzierenden Zellen und entwickelt sich bevorzugt im Narbengewebe

³... entsteht wahrscheinlich aus entdifferenzierten Adeno- oder Plattenepithelkarzinomen und ist eine Ausschlussdiagnose

⁴Pack years ist das Produkt aus der Zahl der täglich gerauchten Zigarettschachteln und der Raucherjahre.

bis vierfache. Beim Passivrauchen ist das Risiko Lungenkrebs zu entwickeln um das 1,5 fache erhöht [HÄUSSINGER und KOHLHÄUFT 2005]. Das Risiko am Lungenkarzinom zu erkranken reduziert sich nach dem Einstellen des Rauchens im Verlaufe der Zeit. Daneben kann eine berufliche Exposition gegenüber Asbest, Chromaten, Arsen, polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, Nickel, Radon sowie Uran zu 9 bis 15 Prozent als ursächlich für die Entstehung von Lungenkrebs angesehen werden [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009]. Zusätzlich spielt die genetische Disposition eine entscheidende Rolle, denn Angehörige von Patienten mit Lungenkarzinom weisen ein bis zu 2-3 fach erhöhtes Risiko zu erkranken auf [HEROLD 2010].

1.4.4 Symptomatik

Husten, Dyspnoe, Thoraxschmerz und Auswurf können Frühsymptome eines Lungenkrebses sein, und eine Vielzahl der Patienten weist Symptome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf. Typische Frühsymptome für die Erkrankung gibt es jedoch nicht. Die Symptomatik ist vom Wachstum, der Lokalisation sowie der Metastasierung des Tumors abhängig [HAMMERSCHMIDT und WIRTZ 2009]. Bei fortgeschrittener Erkrankung kann es zu den typischen Symptomen einer konsumierenden Erkrankung kommen (Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit). Schlussendlich führt die Noxe zum Symptom der Obstruktion. Daher haben viele Patienten, weil sie in der Regel Raucher waren, eine COPD.

1.4.5 Diagnostik

Zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms werden eine ausführliche Anamnese, eine klinische Untersuchung und eine Basis-Laboruntersuchung mit Blutbild, Leber- und Nierenwerten durchgeführt. Eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen, ein CT des Thorax sowie eine Bronchoskopie zur Histologiegewinnung sichern die Diagnose. Tumormarker im Serum wie CYFRA 21-1, CEA und NSE sind für die Primärdiagnose nicht sehr hilfreich und dienen der Verlaufskontrolle und zur Überprüfung der Therapiewirksamkeit. Für die Staginguntersuchungen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Hämatogene Fernmetastasen in

Gehirn, Leber, Nebenniere und Skelett werden durch cerebrale und abdominelle CT, Sonographie und Skelettszintigraphie untersucht. In Zweifelsfällen ist eine PET hilfreich [ARASTEH u. a. 2009].

Staging

Entscheidend für die Therapiestrategie ist die Tumorausdehnung. Das TNM-System definiert in Form einer kurzen Codierung den Zustand des Primärtumors (T1-4), der regionalen Lymphknoten (N1-3) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M0-1). Unterschieden werden präoperative (klinische, TNM) und postoperative (histopathologische, pTNM) Ausbreitung. Die Stadieneinteilung des SCLC orientiert sich an den Begriffen „limited disease“ (25-35%) und „extensive disease“ (60-70%). Beim NSCLC erfolgt zusätzlich zur TNM-Klassifikation und aus dieser abgeleitet die Einteilung in die Tumorstadien I-IV (TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des Bronchialkarzinoms; UICC, 1997, in: Mountain, 1997). Das Staging berücksichtigt die Histologie, den Grad der histopathologischen Differenzierung (Grading), das Tumorkrankheit-Aktivitätsindiz (z.B. Karnofsky-Index) und klinische Symptome (z.B. Gewichtsverlust in den Monaten vor Diagnosestellung) [CLASSEN u. a. 2009].

1.4.6 Therapie

Die Behandlung der kleinzelligen (SCLC) und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) ist wegen ihrer Tumorzellbiologie sehr unterschiedlich.

Therapie beim SCLC

SCLC metastasieren sehr früh lymphogen und hämatogen, sodass man auch in niedrigen Tumorstadien immer von Mikrometastasen ausgehen muss. Das Therapiekonzept sieht deshalb nur bei einem solitären Lungenrundherd (T1N0M0) die diagnostisch-kurative Operation vor. Falls sich ein SCLC herausstellt (very limited disease), folgt darauf eine adjuvante Chemotherapie (mit z.B. Cisplatin+Etoposid). Man erreicht so ein 5-Jahres-Überleben um 75%. Im Stadium limited Disease erfolgt eine simultane Radiochemotherapie mit anschließender kon-

solidierender Chemotherapie. Man kann nach Operation ein 2-Jahres-Überleben über 50%, nach Chemostrahlentherapie zwischen 25 und 50% erwarten. Patienten im Stadium extensive Disease ohne Fernmetastasen erhalten eine Induktionschemotherapie mit anschließender Strahlentherapie. Das 2-Jahre-Überleben liegt unter 20%. Im Stadium extensive Disease mit Fernmetastasen sind symptomorientierte palliative Maßnahmen, ggf. auch eine Chemotherapie angezeigt. Falls man durch die Behandlung eine komplette Remission erreichen konnte, schließt sich die prophylaktische Schädelbestrahlung an. So reduziert man die Häufigkeit der Hirnmetastasierung von etwa 47 auf 20% und die Überlebensrate steigt entsprechend.

Gängige Chemotherapien beim SCLC sind Cisplatin+Etoposid und Cisplatin+Topotecan [ARASTEH u. a. 2009; CLASSEN u. a. 2009].

Therapie beim NSCLC

NSCLC wachsen meist lange lokal, bevor sie Fernmetastasen setzen. Daher steht hier die operative Therapie im Vordergrund. Sie richtet sich nach dem jeweils vorliegenden Stadium:

- Stadium Ia-IIb: Segment- oder Lappenresektion mit systematischer mediastinaler Lymphadenektomie, adjuvante Chemotherapie in den Stadien IIa bis IIb. 5-JÜR zwischen 50 und 70%
- Stadium IIIa: Operation mit adjuvanter Chemotherapie- oder Strahlentherapie. 5-JÜR zwischen 30 und 40%
- Stadium IIIb (ohne maligne Ergüsse): simultane Radiochemotherapie. 3-JÜR zwischen 25 und 30%
- Stadium IV (und IIIb mit malignem Pleura- oder Perikarderguss): palliative Therapieformen. Mittlere Lebenserwartung ca. 10-12 Monate.

Zusätzlich werden molekular gezielte Therapien beim fortgeschrittenen NSCLC eingesetzt. Gängige Chemotherapien beim NSCLC sind Cisplatin+Etoposid und Cisplatin+Vinorelbin [ARASTEH u. a. 2009; CLASSEN u. a. 2009].

Chemotherapieablauf und Nebenwirkungen

Bei einer Chemotherapie werden den Patienten Medikamente verabreicht, die man Zytostatika nennt. Die Chemotherapie wird in der Regel intravenös verabreicht, je nach Zytostatikum als Infusion oder als Kurzinfusion und als Intervallbehandlung durchgeführt. Eine Therapiepause kann mehrere Tage oder Wochen andauern. In der Regel besteht eine Chemotherapie aus mehreren Zyklen (4-6). Verlaufskontrollen bezüglich der Verträglichkeit des Chemotherapeutikums sowie der Laborwerte sind während der Verabreichung der Zytostatika unerlässlich.

Die Nebenwirkungen einer Chemotherapie hängen von der Wahl der Dosis und der subjektiven Verträglichkeit der Chemotherapiesubstanz ab. Zytostatika stören die Zellteilung besonders teilungsaktiver Zellen. Dies sind zum einen Tumorzellen, die durch die Chemotherapie abgetötet werden und deren weiteres Wachstum durch die Chemotherapie gestoppt wird. Zum anderen sind es gesunde Zellen mit hoher Teilungsaktivität. Dies führt häufig zu Haarausfall, Diarrhoen, Übelkeit, Erbrechen und einer Stomatitis. Beim Mann können die Zytostatika zusätzlich eine vorübergehende oder irreversible Infertilität verursachen. Die verschiedenen Nebenwirkungen treten unabhängig voneinander auf. Entscheidend für diese Arbeit ist die Wirkung der Chemotherapie auf die Blutzellbildung verantwortlichen Zellen des Knochenmarks. Zu den teilungsaktiven gesunden Zellen gehören unter anderem die Thrombozyten und die Leukozyten, deren Anzahl sich während einer Chemotherapie verändert. Die verschiedenen Leukozytenarten sind dabei unterschiedlich stark von einer Chemotherapie betroffen. Besonders stark vermindert sich die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, sodass es zu einer Neutropenie kommen kann. Wie lange eine Neutropenie andauert und in welchem Schweregrad sie besteht ist entscheidend für das Risiko, ob eventuell lebensbedrohliche Infektionen auftreten. Es ist davon auszugehen, dass derartige Prozesse bei kurzlebigen Zellen, wie den neutrophilen Granulozyten alle Kompartimente des Körpers gleichermaßen betreffen. Daher ist eine analoge Reduzierung der neutrophilen Granulozyten durch Chemotherapie in den Atemwegen anzunehmen. Wenn neutrophile Granulozyten eine wesent-

liche Quelle für die Produktion von Wasserstoffperoxid sind, sollte es während der Chemotherapie auch zu einer Reduktion der Konzentration von H_2O_2 in der Ausatemluft kommen. Auf die Monozytenanzahl hat die Chemotherapie keinen Einfluss, damit sollte sich auch die Zahl der Makrophagen in der Lunge nicht verändern [Beinert, T. 2000: 64]. Hat die Chemotherapie keinen Einfluss auf die exhalierete H_2O_2 Konzentration, wäre dies eher ein Hinweis auf eine stabile Zellpopulation als Quelle für das H_2O_2 .

Die verschiedenen Nebenwirkungen treten unabhängig voneinander auf. Patienten, die mit Chemotherapie behandelt werden, können als Begleitmedikation nach Blutbildkontrolle bei Leukopenie im Nadir gegebenenfalls einen, die neutrophilen Granulozyten stimulierenden Wachstumsfaktor (Lenograstim) erhalten, um der Gefahr von schweren Infektionen vorzubeugen. Kortikoide (Dexamethason) werden bevorzugt als Begleitmedikation bei Hirnfiliae mit Ödemausbildung verabreicht sowie als Antiemetikum.

1.5 Marker im Exhalat und deren Bedeutung

Im Gegensatz zur Verwendung von H_2O_2 als Marker bei Atemwegsentzündungen wurde die Eignung von H_2O_2 als Marker zur Bestimmung einer neutrophilen Atemwegsentzündung bislang nicht ausreichend untersucht. Bei einer neutrophilen Entzündung werden von den neutrophilen Granulozyten eine Vielzahl von Molekülen ausgeschüttet, die im Wesentlichen der Bekämpfung von Pathogenen und damit der lokalen Eingrenzung einer Infektion dienen. Hierbei handelt es sich unter anderem um Proteasen, die auch zur lokalen Schädigung des Lungengewebes führen können. Bei chronischer neutrophiler Entzündung, wie sie durch das Rauchen verursacht wird, kann es daher langfristig zum Gewebeverlust und damit zur Emphysembildung bei der COPD kommen. Durch die Ausschüttung hochreaktiver Moleküle kommt es darüber hinaus bei einer neutrophilen Entzündung lokal zu erhöhtem oxidativen Stress. Dieser führt häufig dazu, dass Histondeacetylasen inhibiert werden [BERLYNE und BARNES 2000] und damit Steroide nicht mehr für eine Abregulation der Produktion von Ent-

zündungsmediatoren sorgen können. Diese Form der Steroidresistenz wird bei Rauchern und bei bestimmten Formen des Asthma bronchiale vermutet.

Würde eine Zunahme an H_2O_2 mit einer Neutrophilie einhergehen, wäre dieses Molekül als Marker wertvoll für die Erkennung einer durch neutrophile Granulozyten dominierten Atemwegsentzündung z.B. bei einer COPD oder bei einem Asthma und könnte so wichtige Hinweise auf die geeignete medikamentöse Behandlung liefern. Daher ist es das Ziel verschiedene Atemwegserkrankungen oder deren Ausprägung durch einfache Messmethoden in Zukunft auch für die klinische Praxis verfügbar zu machen. Diese Verfahren sollen sowohl bei der Diagnose, als auch für die Verlaufskontrollen bei den Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen eingesetzt werden können.

Außerdem könnte es mit der Entdeckung der verschiedenen Marker im Exhalat möglich werden, die optimale Therapie für den Patienten zu bestimmen, und die Antwort des Patienten auf diese Therapie bei verschiedenen Lungenerkrankungen zu überwachen. Es soll also die Frage geklärt werden, wie der Marker H_2O_2 mit einer neutrophilen Entzündung zusammen hängt und inwieweit das ausgeatmete Wasserstoffperoxid von den Neutrophilen in den Atemwegen erzeugt wird. Dies sollte durch die Beobachtung der Konzentrationsänderung des H_2O_2 bei Patienten während einer Chemotherapie untersucht werden, die zu unterschiedlichen Veränderungen bei den neutrophilen Granulozyten und den Makrophagen/Monozyten während der Behandlung führt.

Als zusätzlicher Indikator für die komplexen Vorgänge in der Lunge wurde bei den Patienten auch das exhalierte NO gemessen. Das Radikal NO kann in der Lunge mit anderen Radikalen⁵ reagieren, daher lässt eine Veränderung des Anteils an NO in der Ausatemluft das Vorhandensein von freien Radikalen (ROS) und oxidativen Substanzen vermuten. Wenn die Makrophagen Produzenten des H_2O_2 wären, was eine der Hypothesen ist, würde sich die Produktion von H_2O_2 über die Zeit nicht verändern, da eine Chemotherapie allein die Makrophagen nicht zerstört [BEINERT 2000]. Die von den neutrophilen Granulozyten ausge-

⁵In diesem Fall mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

hende Produktion von Radikalen (ROS), sollte sich verringern, da die Anzahl der Neutrophilen durch eine Chemotherapie beeinflusst wird. In der Folge wären nun weniger ROS vorhanden, um das FeNO abzufangen. Somit könnte die Konzentration des FeNO ebenfalls als Indikator dafür dienen, wie die Chemotherapie die Radikalbildung in der Lunge beeinflusst.

Um zu prüfen, welcher dieser beiden Zelltypen der Hauptproduzent des Wasserstoffperoxids in den Atemwegen ist, wurde der im Exhalat bestimmte Gehalt an H_2O_2 und die Konzentration von NO in der Ausatemluft in Beziehung zu den Blutbildern der Patienten während eines Chemotherapiezykluses gesetzt.

1.6 Art der Prüfung

Die Analyse des ausgeatmeten Wasserstoffperoxids und die Messungen des FeNO fanden zu drei bis vier verschiedenen Zeitpunkten während eines Chemotherapiezykluses⁶ statt. Um die Patientenwerte miteinander vergleichen zu können, waren diese Termine bei den jeweiligen Patienten einmal vor, mindestens einmal während und einmal nach dem einmonatigen Zyklus angesetzt. Im Rahmen dieser prospektiven Beobachtungsstudie konnte so die zusätzlich entstehende Belastung für die Patienten möglichst gering gehalten werden. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden im Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie im Zeitraum von September 2004 bis Februar 2005 auf Stationen mit onkologischem Schwerpunkt behandelt.

Es wurden ausschließlich Patienten mit nicht mehr als leicht- bis mäßiggradig entzündlichen Atemwegserkrankungen untersucht. Diese erhielten zum Zeitpunkt der Messungen eine Chemotherapie aufgrund von Lungenkrebs. Die zelluläre Aktivität dieser Patienten wird im Gegensatz zu Patienten mit der Komorbidität einer schweren entzündlichen Atemwegserkrankung als langfristig stabiler angesehen.

Aufgrund des gewählten Studiendesigns konnten Fehler bei der Bestimmung des Anteils an H_2O_2 und von FeNO weitestgehend ausgeschlossen werden, da

⁶Es wurden ausschließlich Patienten untersucht, die eine Chemotherapie auf Grund einer Lungenkrebskrankung erhielten.

durch die Messwiederholung die Messwerte der untersuchten Patienten als Kontrolle ihrer selbst dienen.

1.7 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit sucht einen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Neutrophilenzahlen im peripheren Blut und einer möglichen Änderung der Konzentration von H_2O_2 in der Ausatemluft. Für eine Reihe von Atemwegserkrankungen wie Asthma und chronisch-obstruktive Bronchitis ist diese Frage von großem Interesse, da bei diesen Erkrankungen Wasserstoffperoxid zur indirekten Messung der Atemwegsentszündung eingesetzt wird. Folglich wäre das Spektrum des Einsatzes der nichtinvasiven Entzündungsmessung in den Atemwegen erweitert, da eine Methode zur Messung einer neutrophilen Atemwegsentszündung gefunden wäre.

Die Konzentration von FeNO wurde bestimmt, um mit der Anwendung dieser indirekten Methode eine eventuell bestehende eosinophile Atemwegsentszündung bei den Patienten zu erfassen. Außerdem soll FeNO in dieser Arbeit in Hinblick auf seine Beziehung zu den Monozyten untersucht werden. In der Studie wurde zudem FeNO und der Anteil an H_2O_2 zum jeweiligen Zeitpunkt gegenübergestellt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Gehalts beider Marker in der Ausatemluft aufzuzeigen.

Den Hypothesen folgen die Ausarbeitung der Methodik sowie die statistische Auswertung der Messergebnisse nach Messzeitpunkten getrennt und im Zeitverlauf insgesamt. In einer abschließenden Diskussion wird die Bedeutung der Ergebnisse für die Früherkennung der verschiedenen Atemwegsentszündungen und deren Behandlungen erörtert.

1.8 Hypothesen

Die Hypothese ist, dass sich unter einer Chemotherapie die Konzentration von H_2O_2 in der Ausatemluft verringert, da sich die Zahl der neutrophilen Granu-

lozyten durch die Behandlung verringert. Bedingt durch den Zusammenhang von erhöhten H_2O_2 Werten bei Erkrankungen, die mit einer neutrophilen Entzündung einhergehen, wird bislang nur vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern gibt. Die Beobachtung des H_2O_2 Gehaltes der Ausatemluft in einer Längsschnittstudie bei der im Wesentlichen nur die neutrophilen Granulozyten im Blut gezielt „beeinflusst“ werden, bietet die Chance diesen Zusammenhang besser zu charakterisieren. Der Ansatz geht davon aus, dass es bei einer Neutropenie im Blut in der Lunge ebenfalls zu einer Verminderung der Zahl der neutrophilen Granulozyten kommt. Die Konzentration von NO in der Ausatemluft wird in dieser Studie ebenfalls gemessen. Da als Quelle die Epithelzellen der Lunge bekannt sind, wird keine Veränderung im Laufe der Chemotherapie erwartet. NO kann aber durch erhöhten oxidativen Stress bereits in der Lunge so umgewandelt werden, dass es durch die NO Analytoren nicht mehr nachweisbar ist. Daher könnte durch Veränderungen des H_2O_2 auch eine Veränderung des exhalierten NO hervorgerufen werden. Folgende Hypothesen gilt es zu prüfen:

1. Die Konzentration von H_2O_2 verändert sich im Verlauf einer Chemotherapie.
 2. Die Zahl und der Anteil der neutrophilen Granulozyten im Blut korrelieren mit der Konzentration von H_2O_2 in der Ausatemluft.
 3. Die Konzentration von NO in der Ausatemluft verändert sich nicht.
-

2 Methodik

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie ist eine prospektive, longitudinale klinische Beobachtungsstudie mit maximal vier Visiten (Abb. 2.1). Eingeschlossen wurden 39 Patienten, die sich aufgrund der Diagnose eines Bronchialkarzinoms einer Chemotherapie unterziehen mussten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Schleswig-Holstein genehmigt, und alle Patienten unterschrieben eine Einverständniserklärung.

Rekrutierung und Untersuchungsverlauf

Vor dem Beginn der Studie wurden die Ärzte aller behandelnden onkologischen Stationen ausführlich über das Studiendesign und die Einschlusskriterien informiert. Die Patienten wurden seitens der Stationsärzte für die Studie vorgeschlagen. Hierbei handelte es sich um Patienten, die entweder erstmalig eine Chemotherapie erhalten sollten oder sich bereits mehreren Chemotherapiezyklen unterziehen mussten, jetzt aber vor Beginn eines neuen Zyklus standen. Wurden alle Einschlusskriterien 2.1.1 erfüllt, erfolgte im persönlichen Gespräch die Studienaufklärung. Diese fand in der Regel am Nachmittag vor der am nächsten Morgen beginnenden Chemotherapie statt. Der Schweregrad der Bronchialkarzinomkrankung wurde mittels TNM-Klassifikation bestimmt (siehe 1.4.5).

Die für die Studie notwendigen Erstuntersuchungen fanden immer zwei Stunden vor Beginn eines Chemotherapiezykluses (Tag1) statt. Patienten mit Bronchialkarzinom erhalten in der Regel vor Therapiebeginn mit einem Chemotherapeutikum eine Lungenfunktionsprüfung. Um sicherzustellen, dass alle Patienten

das geforderte Einschlusskriterium eines FEV₁-Wertes von mindestens 70 Prozent vom Sollwert erfüllen, wurde im Einzelfall diese Lungenfunktionsprüfung einmalig an Tag 1 nachgeholt, um klinisch relevante Atemwegserkrankungen auszuschließen. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des COHb an Tag 1, um die Aussage über das Rauchverhalten des Patienten zu untermauern.

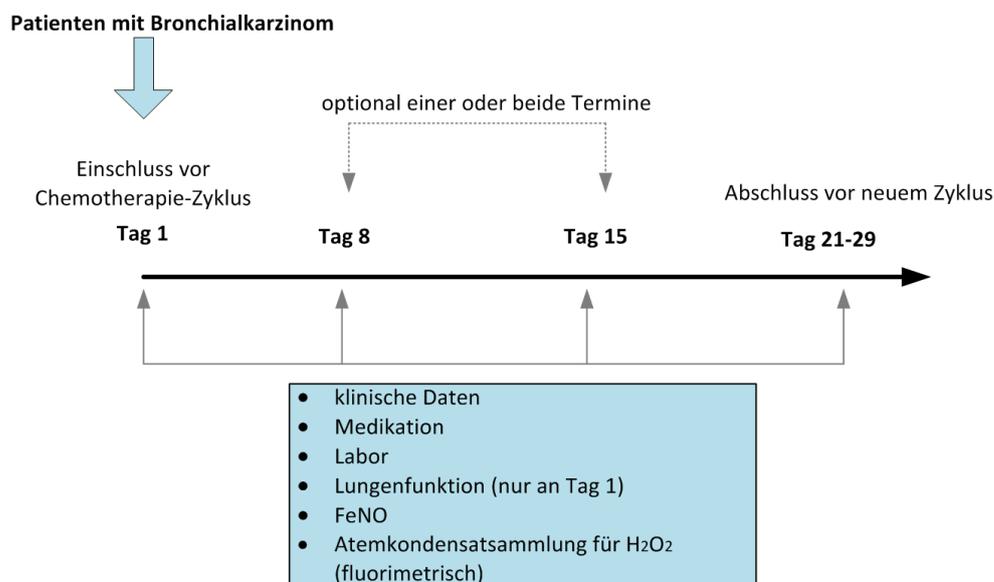


Abbildung 2.1: Studiendesign

Nach Gabe des Chemotherapeutikums sowie anschließender Kontrollphase verließen die Patienten das Krankenhaus. Abhängig vom jeweils individuellen Zeitplan und von der Zumutbarkeit, erschienen die Patienten erneut zu Messungen an Tag 8 und/oder Tag 15, wobei sich diese Termine meist gut mit den routinemäßigen Verlaufskontrollen in der onkologischen Ambulanz kombinieren ließen. Um zu kontrollieren, ob sich die Messwerte am Ende des Zyklus wieder den Ausgangswerten annähern, erfolgte auch eine Laboruntersuchung zwischen Tag 21 und Tag 29 (Mittelwert 25). Dieser Zeitpunkt entsprach dem Abschluss des jeweiligen Zyklus der Chemotherapie und lag zeitlich direkt vor einem eventuell nachfolgenden Zyklus.

2.1.1 Einschlusskriterien

Es wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, die folgende Bedingungen erfüllten:

1. Vorliegen einer Lungenkrebserkrankung (unabhängig von der Art des Tumors), die mit Chemotherapie behandelt werden sollte bzw. bereits behandelt wurde
2. Alter zwischen 18 und 75 Jahren
3. Ein FEV₁-Wert von mindestens 70 % vom Sollwert bei Einschluss
4. bekanntes und während der Studie unverändertes Rauchverhalten.

2.1.2 Ausschlusskriterien

Bei den Ausschlusskriterien war wichtig, dass die Patienten an keinen anderen Lungenerkrankungen litten, so durfte keine restriktive Lungenerkrankung vorliegen (z.B. Lungenfibrose) und keine entzündliche Erkrankung (z.B. Lungen-TBC, Hämoptysen etc.). Insbesondere durfte kein Asthma bronchiale vorliegen, auch keine schwergradige COPD (GOLD III oder GOLD IV), da diese Erkrankungen die Produktion von H₂O₂ möglicherweise beeinflussen könnten. Selbstverständlich war die Unfähigkeit eines Patienten, die Studienbedingungen zu verstehen bzw. die Einverständniserklärung zu unterzeichnen, ein Ausschlusskriterium.

2.2 Durchführung

Alle Messungen wurden jeweils morgens innerhalb einer Zeitspanne von zwei Stunden vorgenommen, um bekannte zirkadiane Schwankungen von im Exhalat zu vermeiden [NOWAK u. a. 2001]. Bei jeder Visite wurden zunächst folgende klinischen Daten erhoben und dokumentiert: respiratorischen Symptome (Husten, Auswurf und Dyspnoe), aktuelle Medikamenteneinnahme, aktuelles Rauchverhalten, und Blutbild (insbesondere die Anzahl der neutrophilen Granulozyten). Anschließend erfolgten die Messung von exhaliertem Stickstoffmonoxid (FeNO) und die Sammlung des Atemkondensates (EBC) zur Bestimmung des H₂O₂.

2.3 Messmethodik

2.3.1 Klinische Daten und Soziodemographie

Der standardisierte Fragebogen, der zur Erfassung der soziodemographischen Parameter wie Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht, sowie zur Dokumentation der akuten Symptome genutzt wurde, ist im Anhang A.2 dargestellt.

Blutentnahme und Blutbild

Vor jeder Messung wurde eine Blutentnahme zur Erfassung des großen Blutbildes mit Differenzialblutbild und der Entzündungsparameter durchgeführt. Die Stationsärzte der Onkologie entnahmen dazu 5 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen. Bei einem Bronchialkarzinom gehört diese Basis-Laboruntersuchung standardmäßig zur Diagnostik (siehe 1.4.5). Die Blutkörperchenzählung erfolgte im Labor mit einem Sysmex SF-3000, einem Hämatologieautomaten, der insbesondere pädiatrische und onkologische Aspekte berücksichtigt und zur Blutzellzählung ohne deren Verschleppung genutzt wird. Der Sysmex SF-3000 zeichnet sich durch eine sehr hohe Präzision und durch einen erweiterten Linearitätsbereich bei leukopenischen Proben aus.

Lungenfunktionsmessung

Die Lungenfunktion wurde mittels Spirometer ermittelt. Die Bestimmung der Einsekundenkapazität (FEV_1) und des Vitalvolumens erfolgte nach Standardmethode [QUANJER u. a. 1993] an Messtag 1.

2.3.2 Messung von FeNO

Die Messung von FeNO wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenzanalysators (NIOX, Aerocrine, Solna, Schweden) durchgeführt. Dazu wurde der Patient aufgefordert nach tiefer Einatmung zehn Sekunden langsam in das Messgerät auszuatmen. Dabei muss gleichmäßig mit einem Fluss von 50 ml/sec [ANTCZAK u. a. 1999] gegen einen ein Druck von 20 mbar geatmet werden, um das Velum

zu verschließen und somit eine Kontamination der Ausatemluft mit NO aus den Nasennebenhöhlen zu verhindern. Die Kontrolle des Ausatemflusses bzw. die Einhaltung des korrekten Druckes erfolgt visuell über ein Display am Analysator. Die Messung wurde zweimal wiederholt, der Mittelwert errechnet und für die weitere Analyse herangezogen.

2.3.3 Sammeln von EBC zur Bestimmung des H₂O₂

Die Quelle des H₂O₂ in der Ausatemluft sind die kleinen Atemwege [SCHLEISS u. a. 2000]. Ein Teil des H₂O₂ liegt in gelöster Form vor und wird in Form von Aerosolen, die sich in diesem Bereich der Lunge bilden, ausgeatmet. Die Aerosole oder exhalierten Partikel können im Atemkondensat nachgewiesen werden. Ein Anteil des H₂O₂ ist allerdings auch in der Gasphase der Ausatemluft enthalten, da H₂O₂ flüchtig ist [ANTCZAK u. a. 1997].

Sammlung der Proben

Zur Sammlung des Atemkondensats atmete der Patient für ca. zehn Minuten (Ruheatmung) in eine gekühlte Sammelapparatur (ECoScreen, Viasys, Höchberg, Germany), bis ein Gesamatemvolumen von 120 Litern erreicht war. Dabei saß der Patient frontal in entspannter Haltung vor dem Ecoscreen und trug eine Nasenklemme, um den nasalen Respirationsvorgang bei der Einatmung auszuschalten. Zum Schlucken oder Husten konnte die Sammlung jederzeit unterbrochen werden. Das Atemkondensat wurde in einem Polypropylenröhrchen gesammelt, das nach jeder Messung mit Bidest und Propanol gereinigt wurde. Das für die Kondensatsammlung eingesetzte Mundstück wurde für mindestens zwei Stunden mit Descogen desinfiziert, einem wenig aggressiven Desinfektionsmittel, das die Messung von H₂O₂ im Kondensat nicht beeinflusst.



Abbildung 2.2: ECoScreen by JAEGER

Verarbeitung und Messung

Die Analyse des EBC wurde nach der im Labor Grosshansdorf etablierten Methodik durchgeführt [JÖRRES 2002]¹. Bei diesem standardisierten Verfahren wird das H₂O₂ unmittelbar nach der Sammlung des Atemkondensats in ein stabiles Zwischenprodukt umgesetzt und erlaubt so eine zeitversetzte Analyse.

Unmittelbar nach dem Sammeln des EBC erfolgte das schnelle Auftauen des Kondensats. Es wurde dann ein Aliquot von 300 µL mit 0.3 µg Peroxidase (Roche, Mannheim, Germany) und 5 µL DL-p-Hydroxyphenylelessigsäure (Sigma, München, Germany) versetzt [PANUS u. a. 1993]. Dazu wurden speziell vorgespülte Pipettenspitzen eingesetzt. Auf diese Weise wurde das H₂O₂ in der Probe in ein stabiles fluoreszierendes Endprodukt umgesetzt, das auch über mehrere Wochen stabil gelagert werden konnte. Es erfolgte die sofortige Lagerung der Probe bei -20°C, um das Exhalat bis zur Fluoreszenzmessung [SCHLEISS u. a. 2000] zu konservieren.

Die Reagenzien Peroxidase und DL-p-Hydroxyphenylelessigsäure wurden vor der Studie aus jeweils einer Charge angesetzt, und entsprechend aliquotiert gelagert (Peroxidase: 3 µL Stamm plus 600 µL HBSS Puffer, Lagerung 4°C; DL-p-Hydroxyphenylelessigsäure: 25 µL Stammlösung 2,25 mM, Lagerung -80°C, nach

¹Dieses Verfahren wurde basierend auf der Arbeit von Hyslop und Sklar im Forschungslabor Grosshansdorf etabliert [HYSLOP und SKLAR 1984].

Auftauen mit jeweils 1 mL HBBS verdünnt).

Zur Erfassung einer möglichen Kontamination des Exhalats mit Speichel wurde die α -Amylase in 100-200 μ L des verbliebenen Exhalats bestimmt. Ein erhöhter Wert dieses Enzyms führte zum Ausschluss der Probe.

Das stabile Endprodukt des H_2O_2 wurde in regelmäßigen Abständen mittels Fluorometer analysiert (LS 50, Perkin-Elmer, Norwalk, USA). Dazu wurden die Proben vollständig aufgetaut und mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm vermessen. Um die Konzentration des H_2O_2 im Exhalat zu bestimmen, wurden Standard H_2O_2 Proben hergestellt (Konzentrationsbereich 4 mM - 0.015 mM). Das H_2O_2 wurde wie oben beschrieben in das stabile Endprodukt umgesetzt und zusammen mit den unbekanntem Proben vermessen. Zur Umrechnung der Fluoreszenzwerte in Konzentrationen wurde die Software BIOLINX[®] eingesetzt.

2.4 Statistische Auswertung

Alle gesammelten Patienten-bezogenen Daten wurden anonymisiert ausgewertet. Dargestellt sind Mediane und die jeweiligen Interquartilbereiche. Für die Vergleiche zwischen den Visiten wurden die Friedman ANOVA (ein nichtparametrischer Test) herangezogen. Für paarweise statistische Vergleiche wurde der Wilcoxon - Rangdifferenztest² verwendet, die Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test³. Für alle Patienten (n=39) liegen für die Messung vor dem Beginn der Chemotherapie (Tag 1) und für die Messung nach Beendigung des jeweiligen Zyklus der Chemotherapie (Tag 21-29) Daten vor. Da nur 14 Patienten die Möglichkeit hatten, beide Visiten an Tag 8 sowie an Tag 15 zu besuchen, wurden zwei verschiedene Analyseverfahren durchgeführt, welche entweder Tag 8 mit Tag 1 und Tag 21-29 (n=34) verglichen, oder Tag 15 mit Tag 1 und Tag 21-29 (n=19). Das Verwenden der zwei Analyseverfahren sollte einem Verlust der statistischen Aussagekraft vorbeugen. Dabei wurde

²nichtparametrischer statistischer Test für die Häufigkeitsverteilung gepaarter Stichproben

³parameterfreier statistischer Test zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen.

das Patientenkollektiv, welches sich an Tag 8 einer zusätzlichen Messung unterzog mit dem Patientenkollektiv, das sich an Tag 15 einer zusätzlichen Messung unterzog, verglichen (vgl. Kapitel 3.3.2 und 3.4.2). Aufgrund ähnlicher Veränderungen der Messparameter bei Patienten mit Teilnahme an allen vier Visiten wurde es als gerechtfertigt betrachtet, alle Patientendaten zum Zweck der Illustration zusammenzufassen (Abbildung 3.2). Die Variabilität wurde mittels des Intraklassen-Korrelationskoeffizienten über ANOVA quantifiziert. Um einen Vergleich mit den therapieinduzierten Veränderungen zu erleichtern, wurde zusätzlich die absolute Differenz zwischen den beobachteten Werten an Tag 1 und an Tag 21-29 bezogen auf das arithmetische Mittel dieser Werte bestimmt. Die Korrelationsanalyse wurde mit der Rangkorrelation nach Spearman ausgeführt. Statistische Signifikanzen wurden immer dann angenommen, wenn $p < 0.05$ war.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden 2006 im European Respiratory Journal zur Veröffentlichung angenommen [WEWEL u. a. 2006] und sind nachfolgend detailliert dargestellt.

3.1 Beschreibung der Stichprobe

3.1.1 Soziodemographische Merkmale

Es wurden 39 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen (Tabelle 3.1). Dabei war die Anzahl der männlichen Teilnehmer mehr als doppelt so hoch wie die der weiblichen Patienten. Das Alter lag wie bei Tumorpatienten üblich > 60 Jahre, und alle Patienten hatten einen normalen BMI. Von den 39 Patienten nahmen 14 Patienten an allen vier Untersuchungsterminen teil. Alle weiteren Patienten konnten zu drei Untersuchungsterminen anwesend sein (Abbildung 3.1).

Tabelle 3.1: Soziodemographische Charakteristika der Patienten
Angegeben sind der Median (Interquartilbereich).

Anzahl n	Geschlecht m/w	Alter Jahre	Größe cm	BMI kg/m ²
39	12 / 27	64 (12)	173 (9)	26,0 (8,4)

Ausschlaggebend waren schließlich diejenigen zwei Grundgesamtheiten, die jeweils drei Vergleichstermine zuließen. Alle in die Studie aufgenommenen Patienten waren Raucher und fünf von ihnen rauchten noch während der Studie.

Bei den klinischen Ausgangsparametern lag der durchschnittliche FEV₁-Wert mit 78,3 Prozent im Normbereich, eine COPD bestand bis maximal GOLD Grad 2.

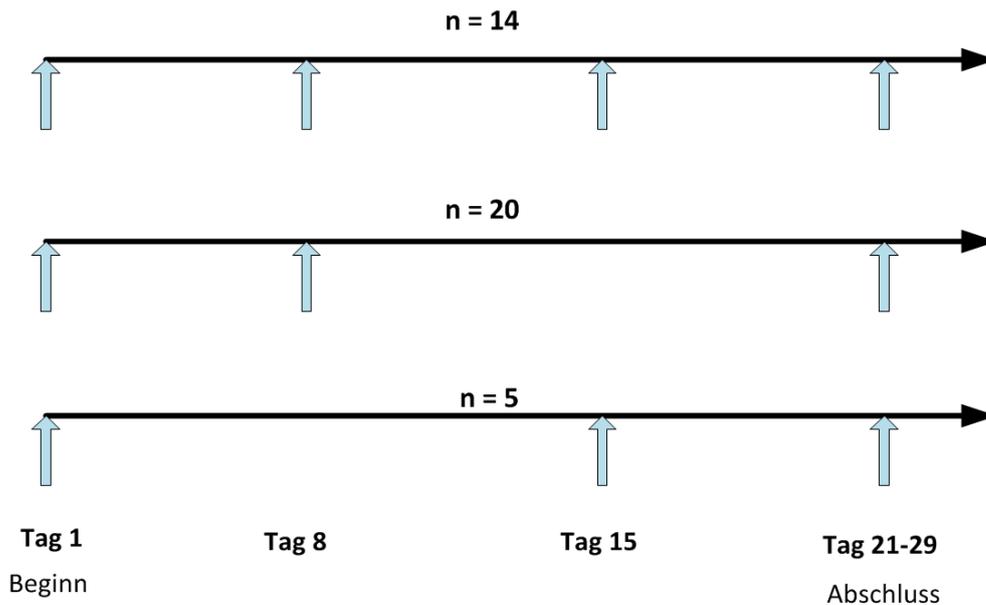


Abbildung 3.1: Zahl der Untersuchungen

Da nur eine kleine Anzahl an Patienten-14 insgesamt-alle 4 Visiten (Tag 1, 8, 15 und 21-29) absolvieren konnten, wurden bei der Auswertung zwei Analysegruppen gebildet, um die statistische Power zu erhalten. Ein Bias fand durch diese Unterteilung nicht statt. 20 Patienten absolvierten die Visite am Tag 1, 8 und 21-29, 5 Patienten absolvierten die Visite am Tag 1, 15 und 21-29.

Tabelle 3.2: Klinische Parameter (Ausgangswerte)

Angegeben sind der Median (Interquartilbereich)

FEV₁ % Soll	COPD GOLD Stadi- um 0/I/II	Raucher Ex/aktiv	Pack Years py	COHb Ex/aktiv in %
78,3 (15,5)	5/8/21	34 / 5	40 (29)	1,0 (0,7) / 5,0 (2,6)

Fünf Patienten zeigten normale FEV₁ Werte und keine respiratorischen Symptome, fünf Patienten normale FEV₁ Werte und Symptome wie chronischen Husten und Sputumproduktion (GOLD Stadium 0), und acht Patienten eine COPD im Stadium I.

21 Patienten hatten eine COPD im Stadium II. Der Mittelwert (IQR) des FEV₁ dieser Gruppe betrug 72,3 (5,3) Prozent vom Soll, dabei lag der niedrigste Wert bei 59 % vom Soll. Der COHb-Status wurde einmalig ermittelt, so dass die Überprüfung der Angabe zum Rauchverhalten gewährleistet war.

Drei Patienten wiesen ein Atopiesyndrom auf. Während der Zeit der Mes-

sungen bestand keine relevante Allergenexposition, d.h. sie litten zum Messzeitpunkt weder an saisonaler allergischer Rhinitis noch an einem atopischem Ekzem oder asthmatischen Beschwerden.

3.1.2 Krankheitsmerkmale

Tumorstadien

Tabelle 3.3: Tumormerkmale

Die Tabelle zeigt die Tumorspezifizierung. Überwiegend litten die Patienten an einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Bei den Tumorstadien handelte es sich in der Mehrheit um das fortgeschrittene Stadium IV.

Art des Tumors	NSCLC	33
	SCLC	5
	Pleuramesotheliom	1
Tumorstadium	I a / I b	2 / 1
	II a / II b	0 / 0
	III a / III b	2 / 11
	IV / andere	21 / 2

Eine Stadieneinteilung für den an einem Pleuramesotheliom erkrankten Patienten existiert nicht. Bei zwei Patienten unterblieben wegen ihres fortgeschrittenen Bronchialkarzinoms und/oder ihres schlechten Allgemeinzustandes die Staginguntersuchungen wegen fehlender Konsequenzen und lediglich supportiver Behandlung.

Tabelle 3.4: Tumormerkmale

Die Chemotherapie basierte hauptsächlich auf Carboplatin und Cisplatin. Dexamethason wurde als Antiemetikum gegeben, Lenograstim zur Stimulierung der Bildung und Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten.

Chemotherapie	Carboplatin/Cisplatin/andere	24 / 12 / 3
	Dexamethason 1/3/5 Tage	1 / 2 / 12
	Lenograstim nach Tag 15	6

Je nach Vorliegen der Tumorerkrankung wurden unterschiedliche Chemotherapieregime für die Patienten durchgeführt. Die angewandten Chemotherapeuti-

ka Carboplatin/Cisplatin/andere Medikamente verteilten sich wie in Tabelle 3.4 ersichtlich, und wurden unabhängig von dieser Studie ausgewählt. Dabei wurde bei 16 Patienten der erste Zyklus, bei sechs Patienten der zweite Zyklus und bei 17 Patienten ein späterer Zyklus des Chemotherapeutikums verabreicht.

Je nach Krankheitsbild und Schweregrad war auch eine zusätzliche Medikation erforderlich. So erhielten die Patienten Dexamethason mit 12 mg/Tag für 1, 3 oder 5 Tage bei Vorhandensein von Metastasen, z.B. Hirnfiliae, um einem Ödem entgegenzuwirken oder als Antiemetikum.

Lenograstim (ein glykosyliertes Granulopoietin, Granocyte[®], Chugai Pharma; Dosis 33.6 I.E.) wurde bei 6 Patienten aufgrund einer schweren Neutropenie nach 15 Tagen verabreicht, um dem Abfall der Leukozytenanzahl entgegenzuwirken.

Aufgrund des Vorhandenseins einer COPD nahmen einige der untersuchten Patienten die leitliniengerechte¹ COPD - Medikation (Bronchodilatoren und Kortikoide - teilweise als Dosieraerosol) ein.

3.2 Ergebnisse zum ersten Messzeitpunkt

3.2.1 Klinischer Gesundheitszustand und Rauchverhalten

Zu allen Messzeitpunkten wurden die Symptome Husten, Auswurf und Dyspnoe abgefragt. Bei der ersten Messung gaben 23 Patienten Husten an, 17 Auswurf und 21 Dyspnoe. Unter den Patienten befanden sich zu diesem Zeitpunkt fünf Raucher. Der ursprüngliche Prüfplan sah vor, dass mindestens drei Stunden vor der Messung nicht mehr geraucht werden sollte, um die Untersuchungsergebnisse nicht zu verfälschen. Bei dieser Vorgabe wurde auf Grund des rigiden Rauchverhaltens einiger Patienten dazu übergegangen, alle Raucher dazu anzuhalten, ihre jeweils letzte Zigarette vor der Messung immer zum gleichen Zeitpunkt zu rauchen. Als wichtiger wurde hier schließlich die sorgfältige Dokumentation dieser Zeitpunkte erachtet.

¹Stufenschema der Deutschen Atemwegliga der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (vgl. Leitlinien AWMF, COPD)

3.2.2 Laborchemische Ergebnisse für H₂O₂, FeNO, BB

Tabelle 3.5: Ausatemluft/EBC (Ausgangswerte)

Angegeben sind der Median (Interquartilbereich)

FeNO	ppb	22,0 (14,1)
H ₂ O ₂ in EBC	μM	0,49 (0,37)

Um Verlaufsbeobachtungen über die verschiedenen Visiten durchführen zu können, wurden die Ausgangswerte für FeNO und H₂O₂ bei den Patienten bestimmt.

Tabelle 3.6: Labor (Ausgangswerte)

Angegeben sind der Median (Interquartilbereich)

Leukozyten	/μL	7,14 (3,45)
Neutrophile	%	65 (15)
Lymphozyten	%	23 (12)
Monozyten	%	9 (4)
Eosinophile	%	2 (3)

Bei den Blutwerten und im Exhalat der Ausatemluft sind die Ausgangswerte der Patienten dargestellt.

3.3 Ergebnisse im Vergleich Tag 1, Tag 8 und Tage 21-29

3.3.1 Klinischer Gesundheitszustand und Rauchverhalten

Zum zweiten Untersuchungstermin erschienen 34 Patienten, wovon zu diesem Zeitpunkt sechzehn unter Husten, neun unter Auswurf und zwanzig unter Dyspnoe litten. Bezogen auf die Symptome Husten und Auswurf verbesserte sich also die Symptomatik bei den Patienten nach der Chemotherapie, zumindest für diejenigen die auch an Tag 8 zu den Messungen erschienen. Hingegen ging es den Patienten, die auch an Tag 8 untersucht wurden im Hinblick auf das Symptom Dyspnoe etwas schlechter. Trotz vorheriger Absprache wurde die Stetigkeit des

Rauchverhaltens von zwei Patienten nicht eingehalten, da sie nur zum zweiten Messzeitpunkt geraucht hatten.

3.3.2 Demographische Merkmale

Die durchschnittliche Größe der zu diesen Zeitpunkten untersuchten Patienten lag bei 171 cm und das durchschnittliche Gewicht betrug 76,5 kg. Der Mittelwert des Alters lag bei 62 Jahren.

3.3.3 Laborchemische Ergebnisse für H₂O₂, FeNO, BB

Tabelle 3.7: Ergebnisse - Zellen im peripheren Blut, Ergebnisse für H₂O₂ und FeNO

Median (Interquartilbereich), * entspricht p < 0.05, ** entspricht p < 0.005; Unterschiede zw. Visiten, Friedman ANOVA

Parameter	Einheit	p	Tag 1	Tag 8	Tag 21-29
Leukozyten	×1000/μL		7.08 (3.74)	5.91 (4.36)	5.94 (3.30)
Neutrophile	×1000/μL		4.47 (3.32)	4.10 (2.98)	3.71 (2.70)
	%	**	65 (15)	72 (19)	62 (15)
Lymphozyten	×1000/μL	**	1.51 (0.92)	1.38 (0.97)	1.67 (0.65)
	%		23 (14)	22 (19)	26 (13)
Monozyten	×1000/μL	**	0.60 (0.29)	0.15 (0.25)	0.63 (0.39)
	%	**	10 (3)	3 (2)	12 (6)
Eosinophile	×1000/μL	**	0.13 (0.19)	0.07 (0.08)	0.06 (0.07)
	%	*	2 (3)	1 (3)	1 (2)
FeNO	ppb	**	22.1 (13.7)	15.3 (10.0)	24.5 (14.6)
H ₂ O ₂	μM		0.48 (0.52)	0.52 (0.47)	0.51 (0.35)

Tabelle Nr. 3.7 zeigt die Ergebnisse der 34 Patienten, die am Tag 1, 8 und 21-29 untersucht wurden. Die Veränderung der Leukozytenzahl im Zeitverlauf weist keine Signifikanz auf. Die absolute Anzahl an Neutrophilen wies keinen signifikanten Verlaufsunterschied auf, wogegen der Anstieg des prozentualen Anteils an Neutrophilen an Tag 8 klare Signifikanz aufweist. Die totale Lymphozytenanzahl fiel zu Tag 8 und stieg zu Tag 21-29 wieder an. Der prozentuale Anteil dagegen stieg gegen Ende an. Die eosinophilen Granulozyten fielen sowohl total als auch prozentual.

Die Monozyten fielen bis Tag 8 signifikant (ANOVA, $p < 0.0001$) ab, d.h. um $0.42 (0.31) \times 1000/\mu\text{L}$ (um 78 % im Vgl. zu Tag 1). Vergleicht man den FeNO-Wert von Tag 1 und Tag 8, lässt sich ebenfalls eine Reduktion feststellen. Hier verringerte sich der Wert um 3,8 ppb (um 22 % im Vgl. zu Tag 1).

Dieser Abfall wurde auch bei den beiden Subgruppen beobachtet, nämlich der, die Dexamethason erhielt ($n = 20$, $p = 0.015$) oder der, die kein Dexamthason erhielt ($n = 14$, $p = 0.037$) ebenso wie in der Subgruppe COPD GOLD Grad II ($n = 17$, $p = 0.0014$) aber nicht bei den Patienten ohne COPD. Der prozentuale Anteil an Neutrophilen hingegen stieg signifikant ($p < 0.001$ jeweils).

Beim Vergleich der Tage 1, 8 und 21-29 ergab sich kein signifikanter Unterschied des Wasserstoffperoxidgehalts in der Ausatemluft. Die Änderung des Rauchverhaltens führte bei den betroffenen beiden Patienten zu keiner signifikanten Abweichung bezüglich der tendenziellen Entwicklung des FeNO gegenüber der restlichen Versuchsgruppe.

3.4 Ergebnisse im Vergleich Tag 1, Tag 15 und Tage 21-29

3.4.1 Klinischer Gesundheitszustand und Rauchverhalten

An Tag 15 wurden 19 Patienten untersucht. Zehn Patienten klagten über Husten, sieben über Auswurf und elf über Dyspnoe. Im Rauchverhalten gab es im Vergleich zu Tag 1 keine Veränderung.

3.4.2 Demographische Merkmale

Die durchschnittliche Größe der zu diesen Zeitpunkten untersuchten Patienten lag bei 172 cm und das durchschnittliche Gewicht betrug 79,8 kg. Der Mittelwert des Alters lag bei 63 Jahren.

Tabelle 3.8: Ergebnisse - Zellen im peripheren Blut, Ergebnisse für H₂O₂ und FeNO

Median (Interquartilbereich), * entspricht $p < 0.05$, ** entspricht $p < 0.005$; Unterschiede zw. Visiten, Friedman ANOVA

Parameter	Einheit	p	Tag 1	Tag 15	Tag 21-29
Leukozyten	×1000/μL	**	7.11 (3.86)	3.80 (2.44)	5.84 (4.13)
Neutrophile	×1000/μL	**	4.84 (3.26)	1.70 (3.17)	3.71 (3.62)
	%		65 (12)	45 (35)	60 (15)
Lymphozyten	×1000/μL	*	1.51 (0.87)	1.33 (0.72)	1.71 (0.65)
	%	*	23 (10)	42 (28)	26 (11)
Monozyten	×1000/μL	**	0.55 (0.30)	0.39 (0.28)	0.60 (0.47)
	%		8 (5)	9 (5)	10 (7)
Eosinophile	×1000/μL	**	0.18 (0.22)	0.07 (0.15)	0.06 (0.06)
	%	*	3 (2)	2 (4)	1 (1)
FeNO	ppb		23.8 (20.5)	27.5 (23.5)	26.3 (10.3)
H ₂ O ₂	μM	*	0.58 (0.37)	0.33 (0.26)	0.51 (0.65)

3.4.3 Laborchemische Ergebnisse für H₂O₂, FeNO, BB

Es zeigt sich in Tabelle 3.8 die zu erwartende Leukopenie an Tag 15, welche in der Vergleichsgruppe an Tag 8 nicht beobachtbar ist. Der Abfall machte im Median 41 Prozent aus.

Ein Vergleich der Tage 1, 15 und 21-29 (19 Patienten) zeigte bei den Leukozyten, Neutrophilen und Monozyten einen signifikanten Abfall (ANOVA, $p < 0.05$ jeweils) in der absoluten Zahl. Es zeigt sich also die zu erwartende Neutropenie an Tag 15. Die prozentuale Anzahl der Monozyten und Neutrophilen unterschied sich zu den drei Visiten nicht signifikant.

Die Lymphozyten und Eosinophilen zeigten ebenfalls einen Abfall sowohl an Tag 8 als auch an Tag 15 (ANOVA, $p < 0.05$ jeweils), dies schlägt sich auch in der prozentualen Angabe der Eosinophilen nieder, die geringer ausfiel. Im Gegensatz zu Tag 8 zeigt sich an Tag 15 ein signifikanter Abfall in der Konzentration von H₂O₂ ($p = 0.040$; ANOVA). Ein Unterschied im exhalieren NO konnte nicht gezeigt werden.

Beim H₂O₂ zeigte sich im Median ein Abfall von 0.18 (0.39) μM oder entsprechend 31.0 (56.9) Prozent am Tag 15.

In einer Subgruppenanalyse bei Patienten mit COPD GOLD Grad II (n = 9)

zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied der H_2O_2 -Werte von Tag1, 15 und 21-29, genauso wie bei den anderen Patienten ($p = 0.05$)². An Tag 1 lagen die H_2O_2 - Werte bei COPD Erkrankten im Stadium II bei 0.46 (0.24) μM gegenüber 0.70 (0.59) μM bei den übrigen Patienten. H_2O_2 verringert sich also während der Behandlung mit Chemotherapie bei Patienten mit und ohne COPD.

Die Patienten, die zusätzlich an Messtag 8 untersucht wurden unterschieden sich demographisch nicht von denjenigen, die zusätzlich an Messtag 15 untersucht wurden (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.4.2).

3.5 Veränderung des klinischen Gesundheitszustandes über die Zeit

Tabelle 3.9: Veränderung des klinischen Gesundheitszustandes

	Husten	Auswurf	Dyspnoe
Visite 1 (n = 39)	23 (59 %)	17 (44 %)	21 (54 %)
Visite 2 (n = 34) ³	16 (47 %)	9 (26 %)	20 (59 %)
Visite 3 (n = 19)	10 (53 %)	7 (37 %)	11 (58 %)
Visite 4 (n = 39)	28 (72 %)	17 (44 %)	24 (62 %)

Tendenziell ist bei dem Symptom Husten ein Anstieg zur letzten Visite gegenüber den vorangegangenen Visiten feststellbar. Der Anteil der Patienten mit Auswurf fällt lediglich zum zweiten Termin merkbar ab (vgl. Tabelle 3.9). Aufgrund der fehlenden Repräsentativität der Versuchsgruppe und der mangelnden Kontrollmöglichkeiten für äußere Einflussfaktoren, können diese Trends jedoch keine Aussagekraft beanspruchen, sondern lediglich Hinweise für weitere Forschungsarbeiten auf diesem Sektor bieten. Hingegen lässt sich keine Aussage zu Veränderungen der FEV_1 -Werte aus den Lungenfunktionsprüfungen im Verlauf machen. (vgl. Kapitel 3.1.1)

²Siehe Kapitel 3.1

³Zu diesem Zeitpunkt gab es zwei Probanden, die zwischenzeitlich angefangen hatten zu rauchen (vgl. auch Kapitel 3.3.1), wovon einer unter Husten, beide unter Auswurf und einer unter Dyspnoe litt, zu späteren Meßzeitpunkten rauchten diese zwei Probanden nicht mehr

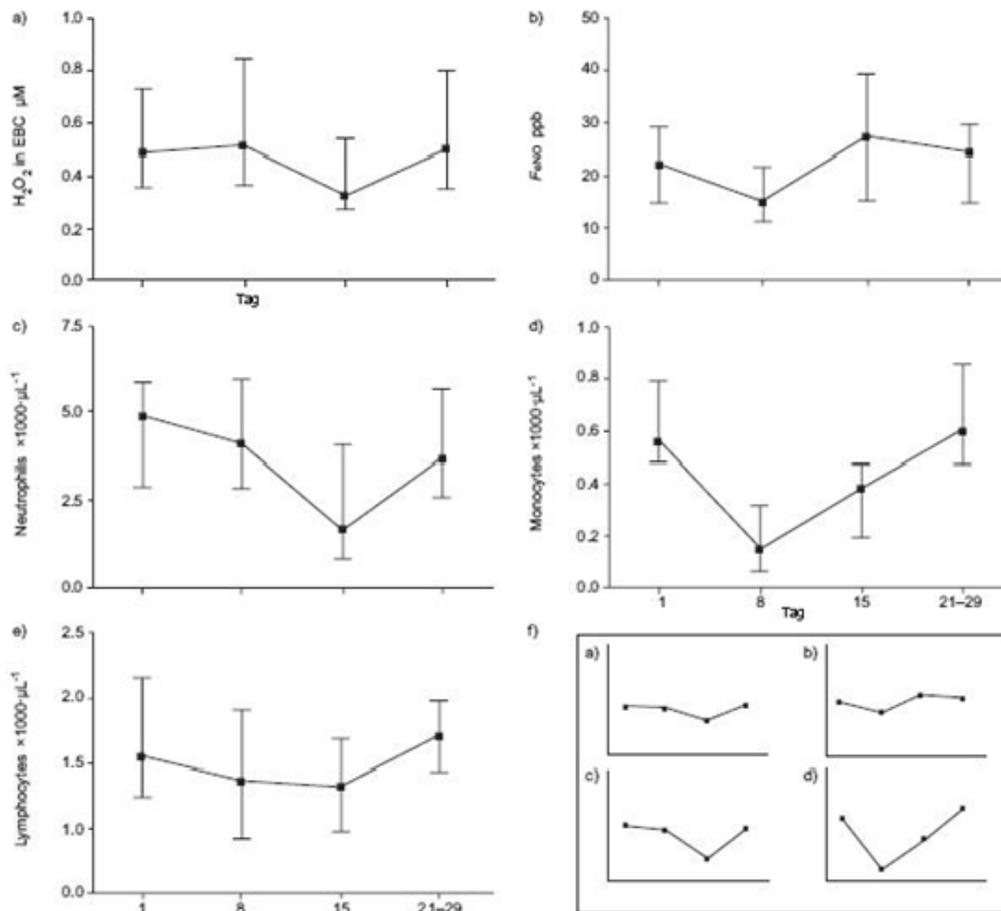


Abbildung 3.2: Zahl der Untersuchungen

Der Verlauf der Konzentration von a) H_2O_2 im exhaliierten Atemkondensat (EBC) und b) des exhaliierten NO und von c) der Anzahl der Neutrophilen d) Monozyten und e) Lymphozyten im peripheren Blut. Die horizontale Achse repräsentiert die vier aufeinanderfolgenden Visiten. Median Werte und Interquartilbereich sind zu sehen. Die Eosinophilen sind in Kapitel 3 dargestellt. Um die Reliabilität der statistischen Parameter zu erhöhen, beinhalten die Graphen alle verfügbaren Daten und repräsentieren damit verschiedene Patientengruppen an Tag 1 und Tag 21-29 ($n=39$) gegenüber Tag 8 ($n=34$) sowie Tag 15 ($n=19$). Die Werte in diesen Gruppen waren sehr ähnlich (vgl. Kapitel 3), deshalb wurden die Daten hier zur besseren Visualisierung derartig zusammengefasst f) illustriert die Daten (Mediane) der 14 Patienten, die an allen vier Visiten teilnahmen (H_2O_2 (a), FeNO (b), der neutrophilen Granulozyten (c) und der Monozyten (d); die Skalen sind analog wie in a-e).

Entnommen aus [WEWEL u. a. 2006].

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Klärung der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen einer Reduktion der Neutrophilenzahlen im peripheren Blut und einer Abnahme der Konzentration von H_2O_2 in der Ausatemluft gibt.

Parameter unter Chemotherapie

Die Daten zeigen, dass sich während einer Chemotherapie auf Grund von Lungenkrebs sowohl die Konzentration von Wasserstoffperoxid im Exhalat als auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut verringern. Auch die Konzentration von NO in der Ausatemluft verringerte sich während der Chemotherapie, allerdings zeitlich vor dem Abfall der neutrophilen Granulozyten und des H_2O_2 und begleitet von einer signifikanten Verminderung der Monozytenzahl im Blut.

Hinweise auf den Ursprung von H_2O_2 und FeNO

Der parallele Verlauf der Neutrophilenzahl mit der H_2O_2 Konzentration und der entgegengesetzte Verlauf der Monozyten-, Eosinophilen- und Lymphozytenzahl mit der H_2O_2 Konzentration (Abbildung 3.2) sind Hinweise dafür, dass neutrophile Granulozyten die Hauptquelle des ausgeatmeten Wasserstoffperoxids darstellen bzw. mit dessen Produktion in Verbindung gebracht werden können.

Der simultane Abfall des FeNO und der Monozytenzahl lässt vermuten, dass die Monozyten (oder die Makrophagen) an der Produktion des FeNO beteiligt sind. Der Anstieg der FeNO-Werte an Tag 15, zu einem Zeitpunkt an dem die Monozytenzahlen noch vermindert waren könnte für eine Interaktion beider Marker, FeNO und H_2O_2 im Bronchialsystem sprechen.

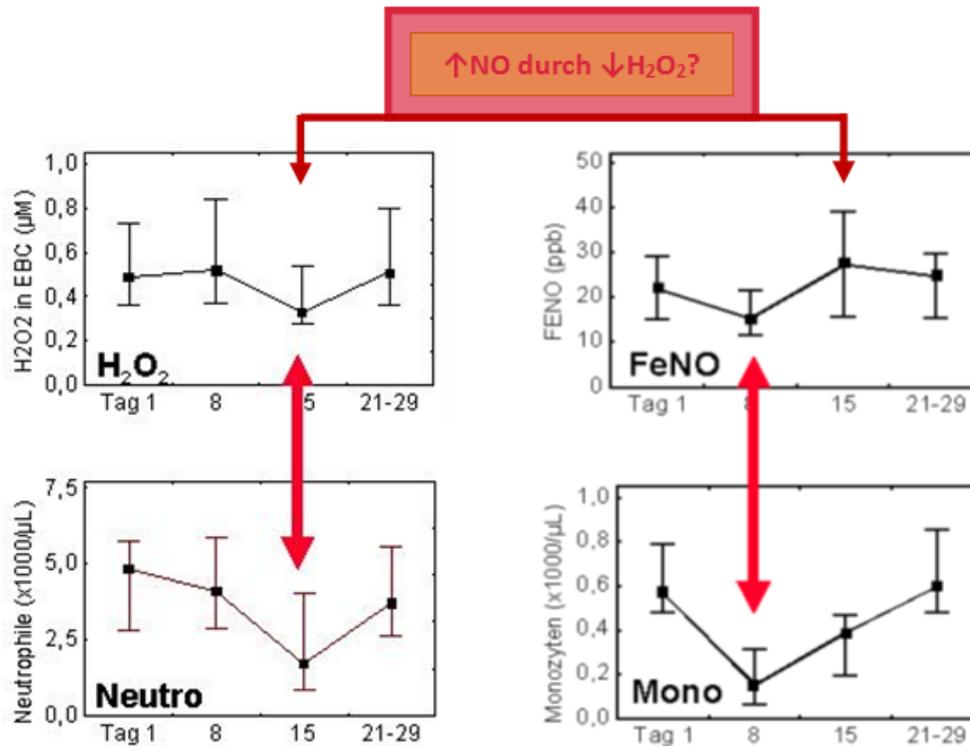


Abbildung 4.1: Gegenüberstellung der Daten

Eine Gegenüberstellung der Daten für die Entwicklung des H₂O₂-Gehaltes und der Werte der neutrophilen Granulozyten zeigt, dass während der Chemotherapie für Lungenkrebs ein paralleler Verlauf zwischen diesen beiden Markern besteht. Bei beiden ist an Tag 15 eine signifikante Reduktion zu beobachten, die auf einen Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und H₂O₂ hinweisen könnte. Der Anstieg der FeNO Konzentration zum Zeitpunkt der deutlichsten Verminderung von H₂O₂ wäre durch die Interaktion zwischen H₂O₂ und FeNO erklärbar.

Hinweise auf eine Interaktion zwischen FeNO und H₂O₂

Daten aus 2003 zeigen, dass sich bei einer Verminderung der Radikalproduktion in der Lunge, die Konzentration von FENO in der Ausatemluft erhöht. Ichinose und Kollegen hemmten bei diesen Versuchen die Xantin Oxidase, um eine Verminderung der Superoxid Produktion zu erreichen (vgl. [ICHINOSE u. a. 2003]).

Eine Interaktion zwischen den Radikalen und dem NO in den Atemwegen lässt sich auch durch das entgegengesetzte Verhältnis zwischen dem ausgeatmeten H₂O₂ und dem atmosphärisch eingeatmeten NO vermuten [LATZIN und GRIESE 2002]. Latzin und Griese untersuchten H₂O₂ im Atemkondensat und die Rolle des atmosphärisch eingeatmeten NO bei 102 gesunden Kindern. Sie konnten eine

Abnahme von H_2O_2 durch atmosphärisch eingeatmetes NO feststellen, da eine signifikante negative Korrelation zwischen H_2O_2 und dem atmosphärisch eingeatmeten NO beobachtet wurde.

Demnach wäre in dieser Arbeit zu erwarten gewesen, dass sowohl an Tag 8 als auch an Tag 15 die NO Produktion verringert gewesen wäre, doch die gleichzeitig verringerte Produktion von Radikalen an Tag 15 ermöglichte, dass mehr NO in das Atemwegslumen ausweichen konnte. Für diese Erklärung spricht auch, dass die FeNO Werte an Tag 15 anstiegen, da Radikale NO abfangen. Diese Schwankungen der Messwerte waren nur vorübergehend, da sich sowohl die FeNO Werte als auch die H_2O_2 Werte an Messtag 21-29 wieder den Ausgangswerten annäherten.

Bei der Erklärung der FeNO Werte muss auch berücksichtigt werden, dass FeNO nach Steroidgabe regredient ist [BARBEN und FREY 2008] und einige Patienten Dexamethason als Antiemetikum und zum Entgegenwirken von Ödemen während der Chemotherapie verabreicht bekommen haben. Ein Abfall des FeNO wurde jedoch bei Patienten mit und ohne Dexamethasongabe beobachtet, so dass ein Einfluss dieser Behandlung auf die beobachteten FeNO Werte als unwahrscheinlich anzusehen ist.

Effekte auf FeNO

In dieser Studie wurde FeNO aus 2 Gründen gemessen. Erstens als ein Indikator für das Vorhandensein von Radikalen und zweitens sollten Veränderungen des FeNO-Werts auf potentielle Änderungen im Transfer von Gasen aus der Mucosa in das Atemwegslumen hinweisen.

Befindet sich beispielsweise mehr Schleim in der Lunge könnte weniger FeNO von der Atemwegswand in das Atemwegslumen gelangen. Dieser Prozess hätte zur Folge, dass sich die Werte für FeNO und auch für H_2O_2 aufgrund einer Behinderung des Transfers verringern. An Tag 15 war ein verminderter H_2O_2 Wert zu beobachten, aber ohne dass zeitgleich auch die FeNO Konzentration niedriger war. Letzteres spricht gegen diese Erklärung. Somit bleibt die verminderte Produktion von Radikalen eine plausible Erklärung für den beobachteten Effekt.

Diese Erklärung ist auch kompatibel mit früheren Daten, die zeigen, dass die Produktion von H_2O_2 ähnlich wie die des NO im Wesentlichen in den großen Atemwegen stattfindet [SCHLEISS u. a. 2000].

Chemotherapie als Intervention

Die Chemotherapie wurde aufgrund ihrer verschiedenen Effekte auf die unterschiedlichen Zelltypen als Intervention verwendet, um das ausgeatmete H_2O_2 einem spezifischen Zelltyp zuordnen zu können. Schwieriger wäre diese Zuordnung bei Patienten mit schweren Atemwegserkrankungen gefallen. Die Effekte auf die blutbildenden Zellen im Knochenmark durch die Zytostatika waren allerdings bei sechs Patienten so massiv, dass zur Vorbeugung von Infektionen zu einer Zeit, wo das Immunsystem bereits durch die Chemotherapie geschwächt ist, nach Tag 15 nach den Messungen die Gabe von Lenograstim erfolgen musste. Lenograstim wirkt der Depletion der Leukozyten entgegen. Lenograstim gehört zur Gruppe Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren und fördert die Immunreaktion. Dieses Glycoprotein stimuliert im Knochenmark spezifisch die Bildung und Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten und fördert somit die Fähigkeit des Organismus zur unspezifischen Immunantwort [LUELLMANN und MOHR 1999]. Da Lenograstim aber frühestens nach Tag 15 verabreicht wurde, konnte es keine Auswirkung auf die an Tag 8 und an Tag 15 beobachteten Effekte haben und damit die Ergebnisse und den Verlauf bis dahin nicht beeinflusst haben.

Die Analyse der unterschiedlichen Blutzellen im zeitlichen Verlauf zeigt, dass die neutrophilen Granulozyten am stärksten von der Chemotherapie betroffen waren. Diese Tatsache ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die neutrophilen Granulozyten zu den kurzlebigen Zellen mit hoher Teilungsaktivität gehören.

Normwertig waren die Ausgangswerte für die Leukozyten mit 7000, im Differentialblutbild fanden sich bei den Ausgangswerten ein etwas vermehrter Anteil an neutrophilen Granulozyten sowie ein etwas erniedrigter Anteil an Lymphozyten.

Monozyten, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten zeigten an Tag 8 und

an Tag 15 eine Verringerung gegenüber dem Ausgangswert und darüber hinaus blieben die eosinophilen Granulozyten noch bis zum Tag 21-29 niedrig. Diese Muster waren nicht mit dem Verlauf des H_2O_2 übereinstimmend (Abbildung 3.2).

Einfluss des Tumors auf H_2O_2

Es ist bereits bekannt, dass die BAL Flüssigkeit, die aus der Tumorregion entnommen wurde, erhöhte Werte an neutrophilen Granulozyten enthält [DOMAGALA-KULAWIK u. a. 2003], und dass das Vorhandensein des Tumors einen Einfluss auf die H_2O_2 -Werte haben könnte. Nichts desto trotz unterschieden sich die Basalwerte des H_2O_2 der Patienten (Tabelle 5) nicht signifikant von denen der gesunden Kontrollgruppe (Median (Interquartilbereich) 0.33 (0.52) μM ; n=18); diese Tatsache könnte sich dadurch erklären, dass weder die Patienten neben ihrer Lungenerkrankung noch die Kontrollgruppe an schwergradigen Atemwegserkrankungen litten oder zum Untersuchungszeitpunkt Raucher waren; die leichte Erhöhung der Werte bei den Patienten könnte wahrscheinlich auf das Bestehen einer Bronchitis zurückzuführen sein. Es zeigte sich auch keine Korrelation zwischen dem Tumorstadium oder dem Tumortyp und den H_2O_2 Werten im Verlauf. Es erscheint unwahrscheinlich, dass lokale Effekte die Resultate beeinflusst haben.

Spezifizierung der H_2O_2 produzierenden Zellen

Die bisher gewonnenen Daten bei gesunden Probanden zeigten, dass die H_2O_2 Werte und die Aktivierung der Phagozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut [ANTCZAK u. a. 1999; SZKUDLAREK u. a. 2003] miteinander korrelieren, demnach ist der Beweis einer Verbindung zwischen dem ausgeatmeten H_2O_2 und den Blutzellen erbracht, und die Erhebung der Blutparameter erscheint somit als geeignet.

In diesen Studien fanden jedoch keine Messungen des FeNO unter Chemotherapie statt oder kamen Interventionen zur Anwendung, um Veränderungen in den Zellzahlen im Verlauf herauszufinden. Neutrophile Granulozyten sind bekannt dafür, im Überfluss in den Atemwegen vorhanden zu sein und betrachtet

man ihre kurze Lebensdauer, könnte man ähnliche Veränderungen im peripheren Blut und den Atemwegen erwarten.

In einer vorangegangenen Studie bei Patienten mit NSCLC und COPD fand sich jedoch kein signifikanter Abfall der Neutrophilenanzahl im Sputum 21 Tage nach Gabe eines Chemotherapeutikums, trotz eines Abfalls der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut [BEEH u. a. 2003].

In dieser Studie wurde ebenfalls versucht Proben des induzierten Sputums zu gewinnen, um die mögliche Verarmung an Neutrophilen parallel an Proben des Bronchialsystems zu überprüfen. Infolge der Einschränkungen die durch den Therapieplan der Patienten bedingt waren, ließ sich bei der Mehrheit der Patienten nur spontanes Sputum gewinnen. Die daraus hergestellten Präparate waren nicht verwertbar. Der Unterschied könnte sich sowohl durch die Variabilität der Anzahl der Sputumzellen erklären, als auch durch die Schwierigkeit Rückschlüsse auf die Atemwegszellzahlen aus der Dichte der Sputumzellen zu ziehen. Auch die Zeitpunkte der Messungen könnten eine Rolle spielen. In dieser Studie wurden die Messungen früher, nahe dem zu erwartenden Minimum der Anzahl der Zellen durchgeführt und die Patienten wiesen weniger schwere Atemwegserkrankungen auf, so dass die Wahrscheinlichkeit einer dauerhaften, krankheitsbezogenen Atemwegsneutrophilie reduziert war.

Zusätzlich hat die Chemotherapie wahrscheinlich beides, nämlich die Zellzahl und die Aktivierung beeinflusst. Die Daten bezüglich der Phagozyten im Blut [ANTCZAK u. a. 1999; SZKUDLAREK u. a. 2003] deuten darauf hin, dass deren Aktivierung eine Rolle beim ausgeatmeten H_2O_2 spielen kann.

Chemotherapie als mögliche Einflussgröße auf H_2O_2

Anhand eines breiten Spektrums verschiedener Chemotherapeutika wurde demonstriert, dass die Verwendung der Superoxidproduktion als Indikator für die Reduktion der Radikalproduktion durch die neutrophilen Granulozyten herangezogen werden kann [HARA u. a. 1990]. Zusätzlich könnten Platingemische, die in Chemotherapien verwendet werden, die SOD Aktivität verringert haben, wie es bereits in cochleären oder renalen Zellen [SOMANI u. a. 2000] anhand der redu-

zierten H_2O_2 Produktion gezeigt werden konnte. Umgekehrt würde die gleichzeitige Reduktion der Katalaseaktivität die H_2O_2 Abnahme senken.

Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten kann die ROS Freigabe durch die Makrophagen durch Platingemische gesteigert werden [PALMA und AGGARWAL 1994]. Die Chemotherapie könnte den Gehalt des ausgeatmeten Wasserstoffperoxids sowohl durch die ROS-Produktion der Phagozyten als auch durch antioxidative Enzymaktivität beeinflusst haben. Der gesamte Einfluss dieser Faktoren auf den H_2O_2 Gehalt lässt sich in dieser Studie nur schwer einschätzen. Vor allem setzen diese Effekte sehr schnell ein, dies steht im Gegensatz zu der in dieser Studie gemachten Beobachtung, bei der eine Veränderung des H_2O_2 Gehalts erst um Tage verzögert festgestellt wurde.

Chemotherapie als Einflussgröße auf FeNO

FeNO scheint durch die Interaktion zwischen der Reaktiven-Nitrogen-Spezies (RNS) und dem ROS-System eine Rolle in der Karzinogenese und beim Tumorstromwachstum zu spielen, wobei die Chemotherapeutika verschiedenste Effekte auslösen wie einen Anstieg der induzierbaren NO Produktion [SON und KIM 1995] gegenüber einer NO vermittelten Apoptose [RANJAN u. a. 1998] in den Makrophagen.

Verglichen mit dem Schwellenwert von 20 (35) ppb, zeigten 24 (7) der 39 Patienten einen erhöhten Wert für das FeNO. Dabei wurden Patienten mit Asthma bronchiale aus dieser Studie ausgeschlossen. Es bestand keine Beziehung zwischen den FeNO-Werten und Infektionen, die bei 6 Patienten aufgetreten sind, obwohl der höchste FeNO-Wert bei einem Patienten mit einer Infektion gefunden wurde.

Einfluss des Rauchens auf die Messparameter

Die meisten Patienten waren zum Zeitpunkt der Messungen ehemalige Raucher, die das Rauchen einige Wochen vor dem Therapiebeginn aufgegeben hatten. Es ist bekannt, dass das Rauchen zu einer Abnahme der FeNO-Werte führt. Wahrscheinlich fangen Radikale das FeNO ab. Nach Beendigung des Rauchens steigen

die FeNO-Werte binnen ein bis vier Wochen an [HÖGMAN u. a. 2002].

Zu Beginn der Studie sowie auch zum Zeitpunkt des Abfalls der FeNO-Werte an Tag 8 wurden die Messergebnisse für das FeNO höchstwahrscheinlich nicht durch die Aufgabe des Rauchens verfälscht. Eine ähnliche Argumentation gilt für das H₂O₂. Raucher ohne schwergradige Atemwegserkrankung zeigen erhöhte Werte von Antioxidantien und antioxidativer Enzymaktivität in der BAL-Flüssigkeit [HILBERT und MOHSENIN 1996].

Es gibt aber bislang keine Daten über mögliche Veränderungen nach Beendigung des Rauchens. Theoretisch hätte ein Abfall der Antioxidantien zu einem Anstieg der H₂O₂-Werte führen müssen und nicht zu einem Abfall, wie beobachtet. Direkte Messungen des ausgeatmeten H₂O₂ konnten auch keine Wirkung des Rauchens auf H₂O₂ bei milder COPD nachweisen [NOWAK u. a. 1999]. Abschließend lässt sich festhalten, dass die Beendigung des Rauchens wahrscheinlich keine Auswirkung auf die Messergebnisse hatte.

Variabilität der H₂O₂ Messungen

Der Grund dafür, dass es keine Korrelation zwischen den individuellen Veränderungen in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten und den H₂O₂ Werten gab, ist wahrscheinlich auf die große Variabilität der H₂O₂ Messungen zurückzuführen. Diese ist bereits aus vorangegangenen Studien bekannt [SCHLEISS u. a. 2000; VAN BEURDEN u. a. 2002; VAN HOYDONCK u. a. 2004].

Daher wurde ein Teil der verbliebenen Menge an Kondensat direkt, mittels eines Biosensors, auf den Gehalt an H₂O₂ untersucht. Jedoch erwies sich diese Technik als nicht ausgereift, da fortwährend Messfehler und Hintergrundrauschen auftraten. Somit wurde die Doppelbestimmung des H₂O₂ zum wechselseitigen Überprüfen beider Messverfahren und der Erhöhung der Messgenauigkeit noch während der Studie eingestellt. Die Bestimmung von H₂O₂, die methodologisch heikel ist [SCHLEISS u. a. 2000], erfolgte nur noch mit Hilfe der Fluoreszenzmessung.

Grenzen der Exhalatmessung

Die Exhalatmessung hat bislang nicht den Weg in die klinische Praxis geschafft. Dies könnte an der zu verbessernden Reproduzierbarkeit der Messergebnisse für die meisten Marker im Exhalat liegen [BATES und SILKOFF 2005].

Bislang fehlen überzeugende Langzeit oder longitudinale Studien und die klinische Wertigkeit ist für keinen EBC Parameter klar. Am ehesten ist die klinische Wertigkeit für die pH Messung des EBC klar. Bei den meisten Exhalatmessungen erhält man die Messwerte für die einzelnen Mediatoren erst zeitverzögert. Zwar ist die Sammlung des EBC einfach, aber die Messung aufwendig und teuer. Auch fehlt eine Methode, um die Verdünnung der Atemwegsflüssigkeit zu berechnen [HORVÁTH u. a. 2005].

Außerdem lässt die unzureichende Standardisierung der Sammel- und Analysebedingungen aktuell einen breiten klinischen Einsatz der Exhalatmessung nicht zu [MONTUSCHI 2005]. Im Gegensatz zur Sputuminduktion oder der BAL ist eine Analyse der Entzündungszellen der Lunge aus dem Exhalat nicht möglich. Zudem wird der definitive Beweis gefordert, dass die Exhalatanalyse den Entzündungsprozess in der Lunge und nicht einen systemischen Entzündungsprozess widerspiegelt [MONTUSCHI 2005].

Seit einiger Zeit wird versucht, mittels Biosensoren - bestehend aus einer Elektrode und „Meerrettich Peroxidase“ (horseradish peroxidase, HRP), den sogenannten HRP-Elektroden - H_2O_2 zu bestimmen [LOEW 2008].

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigte sich bei den vorliegenden Ergebnissen während einer Chemotherapie ein paralleler Verlauf zwischen den Werten des ausgeatmeten H_2O_2 und der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut. Der Verlauf der FeNO Werte war ein anderer und ähnelte meist dem der Monozyten. Laut den vorangegangenen Untersuchungen entspringt das ausgeatmete H_2O_2 hauptsächlich den Bronchien. Die gegenwärtigen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass das ausgeatmete H_2O_2 im Atemkondensat primär ein Marker der Neutrophilen-

zahl und/oder des Aktivierungsgrades der neutrophilen Granulozyten ist. H_2O_2 ist über die neutrophilen Granulozyten nachweisbar und wahrscheinlich in den oberen Atemwegen lokalisiert.

Literatur

- ANTCZAK, A., D. NOWAK, B. SHARIATI, M. KRÓL, G. PIASECKA und Z. KURMANOWSKA (1997). Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. eng. In: *European Respiratory Journal* 10.6, S. 1235–1241.
- ANTCZAK, A., D. NOWAK, P. BIALASIEWICZ und M. KASIELSKI (1999). Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. eng. In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)* 47.2, S. 119–126.
- ANTCZAK, A., Z. KURMANOWSKA, M. KASIELSKI und D. NOWAK (2000). Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. eng. In: *Respiratory Medicine* 94.5, S. 416–421.
- ARASTEH, K., HW. BAENKLER und C. BIEBER (2009). Innere Medizin. Hrsg. von Duale REIHE. Thieme Verlag.
- BARBEN, J. und U. FREY (2008). Obstruktive Atemwegserkrankungen im Kindesalter. In: *Schweizerisches Medizin-Forum* 8(25), S. 466–470.
- BARNES, PJ. (2005). Exhaled breath condensate: A new approach to monitoring lung inflammation. In: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation: Analysis of Exhaled Breath Condensate*. Hrsg. von Montuschi P. CRC Press LLC.
- BARNES, PJ. und SA. KHARITONOV (1996). Exhaled nitric oxide: a new lung function test. In: *Thorax* 51, S. 233–237.
- BATES, CA. und PE. SILKOFF (2005). Exhaled Breath Condensate: Comparisons with Other Methods for Assessing. In: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation: Analysis of Exhaled Breath Condensate*. CRC Press LLC.
-

- BEEH, KM., J. BEIER, M. ERNST, O. KORNMANN und R. BUHL (2003). Platinum-based, leukocyte-depleting chemotherapy does not alter induced sputum markers of neutrophilic inflammation in COPD patients with unresectable non-small cell lung cancer. In: *Respiration* 70, S. 166–171.
- BEINERT, T. (2000). Untersuchungen zur oxidativen Lungenbelastung unter Radio-Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom. Diss. Humboldt-Universität zu Berlin.
- BERLYNE, G. und NC. BARNES (2000). No role for NO in asthma? In: *Lancet* 355, S. 1029–1030.
- CLASSEN, M., V. DIEHL und K. KOCHSIEK (2009). Innere Medizin. 6. Aufl. Urban&Fischer Verlag, S. 356–358.
- DE BENEDETTO, F., A. ACETO, B. DRAGANI, A. SPACONE, S. FORMISANO, R. COCCO und CM. SANGUINETTI (2000). Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. In: *Monaldi Archives for Chest Disease* 55, S. 185–188.
- DE BENEDETTO, F., A. ACETO, B. DRAGANI, A. SPACONE, S. FORMISANO, R. PELLA, CF. DONNER und CM. SANGUINETTI (2005). Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD. eng. In: *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 18.1, S. 41–47.
- DEKHUIJZEN, P. N., K. K. ABEN, I. DEKKER, L. P. AARTS, P. L. WIELDERS, C. L. VAN HERWAARDEN und A. BAST (1996). Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. eng. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154.3 Pt 1, S. 813–816.
- DOMAGALA-KULAWIK, J., J. GUZMAN und U. COSTABEL (2003). Immune cells in bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer -analysis of 140 cases. In: *Respiration* 70, S. 43–48.
- EMELYANOV, A., G. FEDOSEEV, A. ABULIMITY, K. RUDINSKI, A. FEDOULOV, A. KARABANOV und PJ. BARNES (2001). Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. In: *Chest* 120, S. 1136–1139.
-

-
- EMELYANOV, A., G. FEDOSEEV, O. KRASNOSCHEKOVA, A. ABULIMITY, T. TRENDELEVA und PJ. BARNES (2002). Treatment of asthma with lipid extract of New Zealand green-lipped mussel: a randomised clinical trial. In: *European Respiratory Journal* 20, S. 596–600.
- GROENKE, L., F. KANNIESS, O. HOLZ, RA. JÖRRES und H. MAGNUSSEN (2002). The relationship between airway hyper-responsiveness, markers of inflammation and lung function depends on the duration of the asthmatic disease. In: *Clinical & Experimental Allergy* 32, S. 57–63.
- HALLIWELL, B. und JMC. GUTTERIDGE (1999). Free radicals in biology and medicine. 3. Aufl. New York: Oxford University Press Inc.
- HAMMERSCHMIDT, S. und H. WIRTZ (2009). Lungenkarzinom - aktuelle Diagnostik und Therapie. In: *Deutsches Ärzteblatt international* 106, S. 809–20.
- HARA, N., Y. ICHINOSE, A. MOTOHIRO, T. KUDA, H. ASO und M. OHTA (1990). Influence of chemotherapeutic agents on superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes. In: *Cancer* 66, S. 684–688.
- HÄUSSINGER, KE. und M. KOHLHÄUFT (2005). Tumore der Lunge und des Mediastinums. In: München: Zuckschwerdt Verlag. Kap. Ätiologie und Epidemiologie des Bronchialkarzinoms.
- HEROLD, G., Hrsg. (2010). Innere Medizin. Gerd Herold.
- HILBERT, J. und V. MOHSENIN (1996). Adaptation of lung antioxidants to cigarette smoking in humans. In: *Chest* 110, S. 916–20.
- HÖGMAN, M., T. HOLMKVIST, R. WÅLINDER, P. MERILÄINEN, D. LÚDVÍKSDÓTTIR, L. HÅKANSSON und H. HEDENSTRÖM (2002). Increased nitric oxide elimination from the airways after smoking cessation. In: *Clinical Science (London)* 103, S. 15–19.
- HOLZ, O., R. BUHL, T. HAUSEN, A. VON BERG, M. WEBER, H. WORTH und H. MAGNUSSEN (2007). Messung der Atemwegsentzündung in der pneumologischen Praxis - Anwendung und Interpretation. In: *Pneumologie* 61, S. 194–201.
- HOLZ, O., T. SEILER, A. KARMEIER, J. FRAEDRICH, H. LEINER, RA. MAGNUSSEN H. and Jörres und L. WELKER (2008). Assessing airway inflammation in clinical
-

- practice - experience with spontaneous sputum analysis. In: *BMC Pulmonary Medicine* 8, S. 5.
- HORVÁTH, I., LE. DONNELLY, A. KISS, SA. KHARITONOV, S. LIM und PJ. CHUNG KF. BARNES (1998). Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158, S. 1042–1046.
- HORVÁTH, I., J. HUNT und PJ. BARNES (2005). Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. In: *European Respiratory Journal* 26, S. 523–548.
- HYSLOP, PA. und LA. 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. In: *Analytical Biochemistry* 141, S. 280–6.
- ICHINOSE, M., H. SUGIURA, S. YAMAGATA, A. KOARAI, M. TOMAKI, H. OGAWA, Y. KOMAKI, PJ. BARNES, K. SHIRATO und T. HATTORI (2003). Xanthine oxidase inhibition reduces reactive nitrogen species production in COPD airways. In: *European Respiratory Journal* 22, S. 457–461.
- JOEBSIS, Q., HC. RAATGEEP, PW. HERMANS und JC. DE JONGSTE (1997). Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. In: *European Respiratory Journal* 10, S. 519–521.
- JOEBSIS, Q., HC. RAATGEEP, SL. SCHELLEKENS, A. KROESBERGEN, WC. HOP und JC. DEJONGSTE (2000). Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. In: *European Respiratory Journal* 16, S. 95–100.
- JÖRRES, RA. (2002). Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid in der Ausatemluft als Marker entzündlicher Aktivität. Diss. Universität Hamburg.
- KASIELSKI, M. und D. NOWAK (2001). Long-term administration of Nacetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Respiratory Medicine* 95, S. 448–456.
- KHARITONOV, S. und PJ. BARNES (2001). Exhaled markers of pulmonary disease. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163, S. 1693–1722.
-

-
- LATZIN, P. und M. GRIESE (2002). Exhaled hydrogen peroxide, nitrite and nitric oxide in healthy children: decrease of hydrogen peroxide by atmospheric nitric oxide. In: *European Journal of Medical Research* 7, S. 353–358.
- LEX, C. (2007). Atemwegsinflammation und -remodeling bei Kindern mit Asthma bronchiale: Methodik und Wertigkeit noninvasiver Messverfahren. Diss. Universität Düsseldorf.
- LOEW, N. (2008). Meerrettich Peroxidase: Modifikationen und Anwendungen in Biosensoren. Diss. Universität Potsdam.
- LOUKIDES, S., D. BOUROS, G. PAPTAEODOROU, S. LACHANIS, P. PANAGOU und NM. SIAFAKAS (2002). Exhaled H₂O₂ in steady-state bronchiectasis: relationship with cellular composition in induced sputum, spirometry, and extent and severity of disease. In: *Chest* 121, S. 81–87.
- LUELLMANN, H. und K. MOHR (1999). Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag.
- MAJEWSKA, E., M. KASIELSKI, R. LUCZYNSKI, G. BARTOSZ, P. BIALASIEWICZ und D. NOWAK (2004). Elevated exhalation of hydrogen peroxide and thiobarbituric acid reactive substances in patients with community acquired pneumonia. In: *Respiratory Medicine* 98, S. 669–676.
- MONTUSCHI, P. (2005). Analysis of Exhaled Breath Condensate: Methodological Issues. In: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation: Analysis of Exhaled Breath Condensate*. CRC Press LLC, S. 26.
- NOWAK, D., M. KASIELSKI, A. ANTCZAK, T. PIETRAS und P. BIALASIEWICZ (1999). Increased content of thiobarbituric acid reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. In: *Respiratory Medicine* 93, S. 389–396.
- NOWAK, D., S. KALUCKA, P. BIALASIEWICZ und M. KROL (2001). Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. In: *Free Radical Biology & Medicine* 30, S. 178–186.
-

- PALMA, JP. und SK. AGGARWAL (1994). Cisplatin and carboplatin mediated release of cytolytic factors in murine peritoneal macrophages in vitro. In: *Anticancer Drugs* 5, S. 615–622.
- PANUS, PC., R. RADI, PH. CHUMLEY, RH. LILLARD und BA. FREEMAN (1993). Detection of H₂O₂ re-lease from vascular endothelial cells. In: *Free Radical Biology & Medicine* 14, S. 217–223.
- QUANJER, PH., GJ. TAMMELING, JE. COTES, OF. PEDERSEN, R. PESLIN und JC. 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. In: *European Respiratory Journal* 6, S. 5–40.
- RANJAN, P., A. SODHI und SM. SINGH (1998). Murine peritoneal macrophages treated with cisplatin and interferon-gamma undergo NO-mediated apoptosis via activation of an endonuclease. In: *Anticancer Drugs* 9, S. 333–341.
- SANDERS, SP. (1999). Nitric oxide in asthma. Pathogenic, therapeutic, or diagnostic? In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 21, S. 147–149.
- SCHLEISS, MB., O. HOLZ, M. BEHNKE, K. RICHTER, H. MAGNUSSEN und RA. JÖRRES (2000). The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. In: *European Respiratory Journal* 16, S. 1115–1118.
- SILKOFF, PE., PA. MCCLEAN, AS. SLUTSKY, HG. FURLOTT, E. HOFFSTEIN, S. WAKITA, KR. CHAPMAN, JP. SZALAI und N. ZAMEL (1997). Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasale nitric oxide. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155, S. 260–267.
- SOMANI, S., K. HUSAIN, C. WHITWORTH, G. TRAMMELL, M. MALAFA und L. RYBAK (2000). Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. In: *Pharmacol Toxicol* 86, S. 234–241.
- SON, K. und YM. KIM (1995). In vivo cisplatin-exposed macrophages increase immunostimulant-induced nitric oxide synthesis for tumor cell killing. In: *Cancer Research* 55, S. 5524–5527.
-

-
- SZKUDLAREK, U., L. MARIA, M. KASIELSKI, S. KAUCKA und D. NOWAK (2003). Exhaled hydrogen peroxide correlates with the release of reactive oxygen species by blood phagocytes in healthy subjects. In: *Respiratory Medicine* 97, S. 718–725.
- VAN BEURDEN, WJ. und PN. DEKHUIJZEN (2005). New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate. In: Hrsg. von Paolo MONTUSCI. CRC Press. Kap. Hydrogen peroxide in exhaled breath condensate, S. 67–72.
- VAN BEURDEN, WJ., PN. DEKHUIJZEN, GA. HARFF und FW. SMEENK (2002). Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. In: *Respiration* 69, S. 211–216.
- VAN BEURDEN, WJ., GA. HARFF, PN. DEKHUIJZEN, SM. VAN DER POEL-SMET und FW. SMEENK (2003). Effects of inhaled corticosteroids with different lung deposition on exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients. In: *Respiration* 70, S. 242–248.
- VAN HOYDONCK, PG., WA. WUYTS, BM. VANAUDENAERDE, LJ. SCHOUTEN EG. Dupont und EH. TEMME (2004). Quantitative analysis of 8-isoprostane and hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. In: *European Respiratory Journal* 23, S. 189–192.
- WEWEL, AR., JAM. CRUSIUS, U. GATZEMEIER, M. HECKMAYR, G. BECHER, H. MAGNUSSEN, RA. JÖRRES und O. HOLZ (2006). Time course of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide during chemotherapy. In: *European Respiratory Journal* 27. Freier Zugang zur Publikation unter <http://erj.ersjournals.com/content/27/5/1033.long>, S. 1033–1039.
-

Anhang

A.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2004 bis Mai 2012 angefertigt unter der Leitung von Professor Dr. med. H. Magnussen, Universität Lübeck, Fachbereich Medizin, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie (ehemals Ärztlicher Direktor und Medizinischer Geschäftsführer: Prof. Dr. med. H. Magnussen) im Verein zur Förderung der Pneumologie am Krankenhaus Großhansdorf e.V. mit thoraxchirurgischem, onkologischem und zellbiologischem Schwerpunkt in Zusammenarbeit mit dem Pneumologischen Forschungsinstitut (PRI).

Ich danke Herrn Professor Magnussen für die Überlassung des Themas. Den Mitarbeitern des Forschungslabors danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung, insbesondere Herrn Dr. Olaf Holz, für die Hilfe bei der Etablierung der Methode, der Suche nach Fehlerquellen und der Durchführung der Messungen, sowie Herrn Dr. Rudolf A. Jörres für die Beratung bei der Erstellung der Arbeit. Herzlich danke ich Frau Dr. med. Alexandra Wewel für ihre ausdauernde Betreuung meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt den 39 Patienten, die ich untersuchen durfte in einer Phase ihres Lebens, in der vermutlich die Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen nicht vordergründig war. Ich danke Timo, meiner Familie, meinen Freunden und Christoph Schlingensief.

A.2 Fragebogen

H2O2 STUDIE

V1 V2 V3 V4

Patienten Information:

Patienten Nr.: ___ ___

Datum: ___ / ___ / 200 ___

Name, Vorname: _____

Geschlecht: m / w

Blutbild: ja nein

Medikation: _____

Anamnese:Husten: ja nein

Wann zuletzt: ___ __, ___ h

py: _____

Auswurf: ja nein

Menge: ___ __

___ __ Zig./d

Dyspnoe: ja nein

über: ___ Jahre

Raucher: ja nein

CoHb: ___ __

seit: _____

NO-Untersuchung:

1. _____, _____

2. _____, _____

3. _____, _____

Mittelwert: _____, _____ ppb

Spirometrie:ja nein

max. FEV1 in %: _____, ___

in l.: _____, _____

H2O2 Testgerät:

Uhrzeit: ___ : ___ : ___ Uhr

Dauer: ___ : ___

Vol: ___ ___ ; ___ ___

1. Spectrometer: _____, ___

2. Eco: _____, ___

Sputum:V1/V4 _____, _____V2/V3 _____, _____

A.3 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
