

Aus dem Krankenhaus Großhansdorf  
Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie  
Ärztlicher Direktor Professor Dr. med. H. Magnussen

**Wasserstoffperoxid im Exhalat als Entzündungsmarker  
bei Patienten mit Asthma bronchiale, COPD  
oder Bronchiektasen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Juliane Rudnik

aus Wetzlar

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich der Medizin  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

*Nicht Kunst und Wissenschaft allein,  
Geduld will bei dem Werke sein.*

*(Johann Wolfgang von Goethe)*

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_1$ -Antitrypsin	alpha-1-Antitrypsin
$\alpha$ -Amylase	alpha-Amylase
b.Bdf.	bei Bedarf
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
CV	Variationskoeffizient (Standardabweichung in Prozent des Mittelwertes)
DA	Dosieraerosol
DL <sub>CO</sub>	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (CO)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	eosinophilic cationic protein
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
FEV <sub>1</sub> Soll	Sollwert von FEV <sub>1</sub>
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenvolumen; Volumen, das innerhalb der ersten Sekunde in einer forcierten Expiration ausgeatmet wird.
FEV <sub>1</sub> %Soll	FEV <sub>1</sub> in Prozent vom Sollwert
FEV <sub>1</sub> %VC <sub>max</sub>	Volumen, das innerhalb der ersten Sekunde einer forcierten Expiration ausgeatmet wird, bezogen auf die inspiratorische Vitalkapazität
fMLP	N-formyl-Methionin-Leucyl-Phenylalanin
FRC	funktionelle Residualkapazität
g	Gramm
GAGPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOLD-Initiative	Global Initiative for Chronic Lung Disease
GPX	Glutathion-Peroxidase
Grad C.	Grad Celsius
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HOB <sub>r</sub>	hypobromige Säure
HOCl	hypochlorige Säure
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Kps.	Kapsel
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, bei der 50 % der Individuen bzw. Zellen sterben
m	männlich

M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MPO	Myeloperoxidase
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
$\text{NaN}_3$	Natriumacid
nM	Nanomol
nM	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
$\text{NO}_x$	Stickoxide
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff (Zustand $^1\Delta_g$ )
$\text{O}_2^-$	Superoxid-Anion
p.o.	per os
PMN	polymorphkernige Zellen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RV	Residualvolumen
SD	Standardabweichung
$\text{SO}_2$	Schwefeldioxid
SOD	Superoxiddismutase
tgl.	täglich
TLC	Totale Lungenkapazität
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
$\text{TNF-}\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U	Unit
u.a.	unter anderem
VC	Volumen zwischen maximaler Ausatmung und maximaler Einatmung
vs.	versus
w	weiblich
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	6
1.1.	Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) als Entzündungsmarker .....	6
1.1.1	Produktion und Abbauwege von Wasserstoffperoxid .....	6
1.1.2	Wasserstoffperoxid und DNA-Schäden.....	9
1.1.3	Wasserstoffperoxid und bakterielle Infekte.....	10
1.1.4	Wasserstoffperoxid und Gefäßsystem.....	10
1.1.5	Wasserstoffperoxid und Xanthin-/Xanthinoxidasesystem.....	11
1.1.6	Wasserstoffperoxid und Apoptose.....	12
1.1.7	Wasserstoffperoxid und Vitamin E .....	12
1.2	Chronisch-obstruktive Bronchitis und Lungenemphysem (COPD) .....	13
1.2.1.	Charakteristika.....	13
1.2.2	Pathomechanismen.....	15
1.2.3	Evidenz für eine mögliche Rolle von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	17
1.3	Asthma bronchiale .....	18
1.3.1	Charakteristika.....	18
1.3.2	Pathomechanismen.....	19
1.3.3	Evidenz für eine mögliche Rolle von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	20
1.4	Bronchiektasen .....	22
1.4.1	Charakteristika.....	22
1.4.2	Pathomechanismen.....	22
1.4.3	Evidenz für eine mögliche Rolle von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	23
1.5	Problemstellung.....	24
<b>2.</b>	<b>Material und Methode</b> .....	25
2.1	Gerätebeschreibung.....	25
2.2.	Exhalatgewinnung.....	25
2.3	Exhalatverarbeitung.....	25
2.3.1	Exhalataufbewahrung.....	25
2.3.2	Bestimmung der α-Amylase im Exhalat.....	26
2.4	Methode und Materialien der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bestimmung.....	26
2.4.1	Methode der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bestimmung.....	26
2.4.2	Materialien zur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bestimmung.....	28

2.4.3	Ablauf der Messung.....	29
2.4.4	Auswertung der Standards.....	29
2.4.5	Zugabe von Katalase zu den Standards.....	30
2.5	Statistische Auswertung.....	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
3.1	Standardkurve.....	32
3.2	Mit Katalase versetzte Standardproben.....	32
3.3	Blank-Werte.....	33
3.4	Kontrollstandards.....	36
3.5	Beziehung Absorption/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration in Patientenproben.....	36
3.6	Ergebnisse der Kontrollgruppe.....	37
3.6.1	Charakteristika.....	37
3.6.2	Messwerte.....	37
3.7	Ergebnisse der Patienten mit Asthma bronchiale.....	38
3.7.1	Charakteristika.....	38
3.7.2	Messwerte.....	39
3.7.3	Einzelverläufe.....	40
3.7.3.1	Einzelverlauf bei Patient Nr. 34.....	40
3.7.3.2	Einzelverlauf bei Patient Nr. 39.....	42
3.7.3.3	Einzelverlauf bei Patient Nr. 48.....	43
3.8	Ergebnisse der Patienten mit COPD .....	44
3.8.1	Charakteristika.....	44
3.8.2	Messwerte.....	46
3.8.3	Einzelverlauf bei Patient Nr. 26.....	47
3.9	Ergebnisse der Patienten mit Bronchiektasen.....	48
3.9.1	Charakteristika.....	48
3.9.2	Messwerte.....	49
3.9.3	Einzelverlauf bei Patient Nr. 47.....	50
3.10	Statistischer Vergleich zwischen den Gruppen.....	52

4.	<b>Diskussion</b> .....	54
5.	<b>Zusammenfassung</b> .....	61
6.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	63
7.	<b>Danksagung</b> .....	68
8.	<b>Lebenslauf</b> .....	69
9.	<b>Erklärung</b> .....	70



## 1 Einleitung

### 1.1 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) als Entzündungsmarker

#### 1.1.1 Produktion und Abbauewege von Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ist in reinem Zustand eine blassblaue, kovalente Flüssigkeit, frei mischbar mit Wasser und offensichtlich in der Lage, Zellmembranen leicht zu passieren und mit vielen organischen Verbindungen zu reagieren. Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen, die meist über 50 µM betragen müssen, als zytotoxisch für Tiere, Pflanzen und Bakterienkulturen. Die LD<sub>50</sub> und die Art des Zelltodes (Apoptose oder Nekrose) hängen ab vom Zelltyp, vom physiologischen Zustand der Zellen, von der Expositionsdauer, von der eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration und vom verwendeten Zellmedium.

Aus diesen Gründen muss H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im allgemeinen als ein *in vivo* äußerst zytotoxisches Agens gelten, dessen Konzentration durch die Aktivität von antioxidativ wirksamen Enzymen, wie Katalasen und Peroxidasen (besonders Glutathion-Peroxidase oder thioredoxin linked systems) minimiert wird [Halliwell & Gutteridge 1999].

In technischen Prozessen hingegen ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wenig reaktionsfreudig. Es kann als milder Oxidations- oder als milder Reduktionspartner dienen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert auch die meisten biologischen Moleküle wie Lipide, DNA und Proteine nicht leicht. Ausnahmen bilden Substanzen mit überreaktiven Thiolgruppen oder Methioninresten. Die größte Gefahr, die von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgeht, besteht in der leichten Umwandlung in das sehr reaktive Hydroxylradikal (OH<sup>·</sup>), entweder durch Einwirkung von ultraviolettem Licht oder durch Interaktion mit Übergangsmetallionen.

Das wichtigste Metallion *in vivo* ist das Eisen. Lebende Organismen haben Mechanismen entwickelt, um Metallionen an Proteine zu binden, so dass sie nicht mehr in der Lage sind, Reaktionen mit OH<sup>·</sup> oder anderen freien Radikalen zu katalysieren. Diese Mechanismen sind besonders wichtig in extrazellulärer Flüssigkeit wie z.B. Blut. Wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Zellen in Zellkulturen zugefügt, kann dies dazu führen, dass Metallionen, abhängig von der OH<sup>·</sup>-Konzentration, DNA-Schäden verursachen. Allerdings werden diese Schäden in der Regel unverzüglich repariert. Die Reparaturmechanismen sichern das Überleben der Zellen im Falle eines Überschusses an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Konzentrationen zwischen 20-50 µM scheinen für viele Zelltypen nur eine

begrenzte Zytotoxizität zu haben. Hinzu kommt, dass im Rahmen von Entzündungsreaktionen  $\text{H}_2\text{O}_2$  von aktivierten Phagozyten gebildet wird. Es scheint den Entzündungsprozess zu beeinflussen, z.B. bei der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen, der Kontrolle der Zellproliferation oder der Apoptose und der Aggregation der Blutplättchen [Halliwell & Gutteridge 1999].

$\text{H}_2\text{O}_2$  kann auf mehreren Wegen unter Enzymkatalase erzeugt oder verbraucht werden. Zentraler Erzeugungsmechanismus ist die Dismutation des Superoxid-Anion-Radikals mittels Cu/Zn- oder Mn-abhängiger Superoxiddismutasen (SOD) ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ). CuZnSOD ist ubiquitär in eukaryotischen Zellen, hauptsächlich im Zytosol, lokalisiert und arbeitet im physiologischen Bereich nahezu unabhängig vom pH-Wert. Neben der zytosolischen CuZnSOD existiert eine extrazelluläre SOD (EC-SOD), die vermutlich an extrazelluläre Kohlenhydrate gebunden ist, insbesondere in der Lunge und in Blutgefäßen. Man nimmt an, dass ihre Funktion vor allem darin besteht,  $\text{O}_2^-$  zu eliminieren und so zu verhindern, dass mit  $\text{NO}^\cdot$  das aggressive Peroxynitrit gebildet wird. MnSOD zeigt eine ähnliche Umsatzrate wie CuZnSOD, ist jedoch weitgehend auf Mitochondrien beschränkt; ihr Anteil an der Gesamtaktivität der zellulären SOD liegt um 10 %. Neben der Erzeugung durch SOD kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch eine Vielzahl weiterer Enzyme freigesetzt werden, darunter die teilweise in Peroxisomen lokalisierten Flavoprotein-Dehydrogenasen und Glykolatoxidasen.

Der enzymatische Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgt entweder durch Disproportionierung über Katalase ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) oder mittels Peroxidasen. Katalase kommt in den meisten menschlichen Zellen vor, besonders in solchen, die hohen Sauerstoffpartialdrücken (Erythrozyten) oder katalytischer Aktivität (Leberzellen) ausgesetzt sind. Sie sind vorwiegend in den Peroxisomen, also denjenigen Organellen, in denen auch ein Großteil der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -erzeugenden Enzymaktivität zu finden ist. Verglichen mit der Katalase ist die Aktivität der überwiegend zytosolischen Glutathion-Peroxidase (GPX) meist geringer, auch wenn in einzelnen Geweben ihre Konzentration in den millimolaren Bereich gelangen kann. GPX arbeitet unter Verbrauch von reduziertem Glutathion ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ ) und erzeugt oxidiertes Glutathion, welches mittels Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH zu GSH rezykliert wird ( $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ ). Man nimmt an, dass die regional unterschiedliche Verteilung von Katalase und GPX im Verein mit der Versorgung mit GSH bzw. NADPH zu einer regional unterschiedlichen antioxidativen

Kapazität führt. Vermutlich beträgt in der Lunge die Kapazität von GPX,  $\text{H}_2\text{O}_2$  umzusetzen, nur etwa  $\frac{1}{4}$  derjenigen der Katalase.

Ein wichtiger nichtenzymatischer Abbauweg des  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Anwesenheit von zweiwertigem Fe ist die Haber-Weiss-Reaktion ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}(\text{Chelat})^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot + \text{Fe}(\text{Chelat})^{3+}$ ). Die schädigenden Wirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die DNA sowie die Oxidation von Proteinen und Fettsäuren werden vermutlich in den meisten Fällen über  $\text{OH}^\cdot$  vermittelt, und die Oxidation essentieller SH-Gruppen am aktiven Zentrum von Enzymen spielt vermutlich eine entscheidende Rolle, wie es für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase nachgewiesen wurde [Halliwell & Gutteridge 1999].

Ein Großteil des mittels SOD erzeugten  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird von aktivierten Neutrophilen verwandt, um über Myeloperoxidase (MPO) hypochlorige Säure zu produzieren ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{HOCl} + \text{OH}^-$ ). HOCl besitzt ein starkes Oxidationsvermögen und wird zumindest teilweise für die zytotoxischen und bakteriziden Fähigkeiten der Neutrophilen verantwortlich gemacht. Es kann mit  $\text{O}_2^{\cdot-}$  zur Produktion des hochreaktiven Hydroxyl-Radikals führen ( $\text{HOCl} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\cdot + \text{Cl}^-$ ). Auf diese Weise ist eine Ankopplung an den respiratory burst gegeben, d.h. die kurzfristige gesteigerte Erzeugung von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durch eine membranständige NADPH-Oxidase unter vermehrter  $\text{O}_2$ -Aufnahme. HOCl kann mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  Singulett- $\text{O}_2$  erzeugen, das mit Nichtradikalen leicht reagiert, da die entsprechende Spin-Restriktion aufgehoben ist ( $\text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ ).

Prinzipiell gilt heute die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch stimulierte Phagozyten als gesichert. Neben Neutrophilen sind dies vor allem Makrophagen und Eosinophile [Busse W 1989]. Elektronenmikroskopisch wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf der Oberfläche der PMN-Plasmamembran (polymorphkernige Zellen) und der luminalen Seite der kleinen intrazytoplasmatischen Vakuolen sowie in der Kontaktzone zwischen PMN und Endothelzellen, aber nicht in den Endothelzellen nachgewiesen. Die Interaktion zwischen stimulierten PMN und Endothelzellen führt zu einer Zerstörung der monomolekularen Schicht (monolayer) und einer insgesamt veränderten Gestalt der Endothelzellen. Da dieser Prozess durch einen Myeloperoxidase-Inhibitor (0,1 mM  $\text{NaN}_3$ ) gestoppt werden konnte, ist zu folgern, dass stimulierte PMN Endothelzellen über einen Myeloperoxidase-vermittelten Adhärenz-Mechanismus schädigen können [Zeck-Kapp et al. 1990]. Dieser Mechanismus dürfte eine wichtige Rolle in der Patho-

genese entzündlicher Gefäßerkrankungen, vielleicht auch entzündlicher Lungen-erkrankungen spielen.

In der Tat zeigten PMN, die aus dem Blut von Patienten mit COPD gewonnen wurden, eine verstärkte Chemotaxis sowie proteolytische und Myeloperoxidase-Aktivität. Ähnlich zeigte sich bei Passivrauchern mit erhöhten Leukozytenzahlen eine vermehrte Freisetzung von Oxidanzien. Zusätzlich war die  $O_2^-$ -Freisetzung von PMN während akuter infektiöser Exazerbationen erhöht. Eine erhöhte Anzahl von PMN schien einen erhöhten Oxidanzien Spiegel in der Lunge von Patienten mit COPD zu verursachen [Halliwell & Gutteridge 1999]. Diese Daten werden gestützt durch eine Arbeit, die zeigte, dass nach Stimulation von Blutphagozyten mit N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin das exhalierete  $H_2O_2$  von gesunden Nichtrauchern von der Fähigkeit der Blutphagozyten, ROS zu bilden, abhing [Szkudlarek et al. 2003].

### 1.1.2 Wasserstoffperoxid und DNA-Schäden

Zwischen Monozyten und Lymphozyten bestehen bezüglich der Ausprägung von DNA-Schäden nach  $H_2O_2$ -Exposition (10  $\mu M$ ) Unterschiede, insofern als bei Lymphozyten der Schaden im Vergleich zu Monozyten 11,3-fach größer war [Holz O 1995]. Wenn Epithelzellen des menschlichen Respirationstraktes  $H_2O_2$  in einer Konzentration von 100  $\mu M$  ausgesetzt werden, verursachen Hydroxyl-Radikale schnell DNA-Strangbrüche und chemische Modifikationen aller 4 DNA-Basen. Die Hauptprodukte sind FAPy-Adenin, FAPy-Guanin und 8-OH-Guanin. Einige der veränderten Basen werden sehr schnell aus der DNA beseitigt (z.B. 8-OH-Guanin), andere bleiben lange bestehen (z.B. Thyminglycol). Dies ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Aktivität der Reparaturenzyme zurückzuführen. Es gibt Daten derart, dass die Zahl der DNA-Strangbrüche nach Ablauf der  $H_2O_2$ -Exposition weiter zunimmt, vielleicht weil auch bei den Reparaturenzymen DNA-Strangbrüche induziert wurden [Spencer et al. 1996].

Insgesamt gesehen ist die Zelle darauf angelegt, die Schäden durch  $H_2O_2$  und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gering zu halten. Hydroxyl-Radikale können u.a. durch die katalytische Aktivität von Cu(II)-Komplexen aus  $H_2O_2$  gebildet werden. Der Einsatz von Catecholaminderivaten verminderte die Zahl der durch  $H_2O_2$  verursachten DNA-Strangbrüche, indem diese mit Cu(II) Komplexe bildeten, die nicht mehr in der Lage waren, mit  $H_2O_2$  zu reagieren. Umgekehrt erhöhten

Acetylcystein und Ascorbinsäure die Zahl der DNA-Strangbrüche durch eine vermehrte Überführung von Cu(II) zu Cu(I) [Ueda et al. 1996], indem Acetylcystein und Ascorbinsäure den Elektronentransfer von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Cu(II) katalysierten und dadurch die Bildung von OH<sup>•</sup> beschleunigten, was mit einer erhöhten Reduktionsrate von Cu(II) zu Cu(I) einherging.

### 1.1.3 Wasserstoffperoxid und bakterielle Infekte

Im Respirationstrakt spielen bakterielle Infekte eine wesentliche Rolle, indem sie die Rekrutierung und Aktivierung von Phagozyten in die Lunge verursachen [Repine et al. 1997]. Sie komplizieren und unterhalten die Pathomechanismen verschiedener Erkrankungen wie der COPD, des Asthma bronchiale und der Bronchiektasenkrankheit. *Pseudomonas aeruginosa* stellt besonders für Patienten mit Bronchiektasen einen Problemkeim dar. Das von *Pseudomonas aeruginosa* produzierte Pyocyanin hat viele schädliche Effekte auf menschliche Zellen, die sich auf die Fähigkeit beziehen, ROS zu bilden, wie Superoxid und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es wurde gezeigt, dass Pyocyanin in der Lage ist, die intrazelluläre Katalase der Zelllinie A549 und von normalen humanen Bronchialepithelien durch Eingriff in die Transkription sowie durch direkte Enzym-Inaktivierung zu vermindern. Die verminderte Katalaseaktivität und eine mangelnde Ausstattung mit MnSOD könnte der Pyocyanin-vermittelten Zytotoxizität zuzuschreiben sein [O' Malley et al. 2003]. Analog erschienen während Exazerbationen von Patienten mit COPD *Streptococcus pneumoniae* und nicht verkapselte *Haemophilus influenzae*; die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion von Neutrophilen im Blut war bei derartigen Patienten während Exazerbationen erhöht und normalisierte sich in der Rekonvaleszenzphase [Repine et al. 1997].

### 1.1.4 Wasserstoffperoxid und Gefäßsystem

Es wird angenommen, dass oxidativer Stress an Endothelzellen des Gefäßsystems zur Entstehung von Krankheiten wie Arteriosklerose und Bluthochdruck beiträgt. Sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen des Gefäßsystems sind in der Lage, ROS zu bilden und weisen erhöhte Spiegel bei Arteriosklerose und Bluthochdruck auf. Eine steigende Produktion von Superoxidanion kann zu einer abnehmenden Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) führen, aufgrund einer Radikal-Radikal-Reaktion, die schneller abläuft als die Reaktion zwischen Superoxidanion

und Superoxiddismutase. Eine Hauptquelle der Superoxid- und Hydrogenperoxid-Produktion ist eine membrangebundene NADPH-abhängige Oxidase. Die Aktivität dieser Enzyme wird durch Angiotensin II reguliert, das nach prolongiertem Gebrauch von Nitroglycerin erhöht ist [Harrison 1997]. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte vasculäre NADPH-abhängige Oxidase-Aktivität assoziiert ist mit erniedrigter NO-vermittelter Vasorelaxation, die wiederum einen Risikofaktor für Arteriosklerose darstellt [Guzik et al. 2000].

Einige Autoren vertreten die Meinung, dass Lipoproteine, die durch Peroxynitrit verändert wurden, zur Entstehung einer Arteriosklerose führen. Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von Gefäßendothelzellen mit NO(2)-LDL über eine verminderte Expression und Aktivität von CuZnSOD zu einem Anstieg von ROS führte, die wiederum zur Toxizität von NO(2)-LDL beitragen könnte [Matsunaga et al. 2001].

### 1.1.5 Wasserstoffperoxid und Xanthin-/Xanthinoxidase-System

Xanthinoxidase bildet  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$ . Xanthinoxidase wurde in erhöhter Konzentration im Lungengewebe von Ratten gefunden, die Zigarettenrauch ausgesetzt waren. Der Anstieg von Xanthinoxidase im Lungengewebe reflektierte möglicherweise die Konversion von Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase durch Elastase oder Oxidanzien und/oder einer vermehrten Bildung von Xanthindehydrogenase. Eine Reaktion zwischen xanthinoxidaseabhängigen  $O_2^{\cdot-}$  und Serum führte zur Bildung von Chemotaxinen für PMN. Dies könnte ein weiterer für die Rekrutierung von PMN im Lungengewebe von Rauchern verantwortlicher Mechanismus sein. Außerdem war die Konzentration der Xanthinoxidase in zellfreier Lungenlavage von Patienten mit COPD im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern erhöht und assoziiert mit einer erhöhten  $O_2^{\cdot-}$ -Produktion, vermehrten DNA-Schäden und einer erhöhten Harnsäureproduktion. Erhöhte Xanthinoxidaseaktivitäten im Lungengewebe könnten zu einer erhöhten  $H_2O_2$ -Konzentration im Exhalat von Rauchern besteuern [Repine et al. 1997].

Das Xanthin/Xanthinoxidase-System wird mit der Histaminfreisetzung aus Mastzellen in Verbindung gebracht. Die sekretorische Freisetzung von Histamin konnte durch Superoxiddismutase oder Katalase alleine nicht unterdrückt werden. Zusammen verhinderten sie die Histaminfreisetzung. Die lytische Histaminfreisetzung

schien bei höheren Konzentration oder längerer Inkubationszeit von Xanthinoxidase zu der Hydrogenperoxid-Produktion in Beziehung zu stehen [Menon et al. 1989].

In späteren Arbeiten wurde die Histaminfreisetzung als ein von Superoxidanionen getriggert und von Energie und Temperatur abhängiger Prozess beschrieben. Superoxidanionen führten zu einem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg, begleitet von einer ansteigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Zellen. Daraus wurde geschlossen, dass ein intrazellulärer Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Verbindung steht mit einer Superoxidanionen induzierten Histaminfreisetzung [Akagi et al. 1994]. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass Histamin die Superoxidanionenproduktion in stimulierten Phagozyten verhindert. Darüber hinaus wurde auch die Produktion von  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-12 über  $\text{H}_2$ -Histamin-Rezeptoren verhindert und die Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit von Makrophagen unterdrückt [Azuma et al. 2001].

#### 1.1.6 Wasserstoffperoxid und Apoptose

$\text{H}_2\text{O}_2$  wird auch für den Zelltod durch Apoptose verantwortlich gemacht. Für den Zelluntergang durch Apoptose scheint eine Abnahme der  $\text{O}_2^-$ -Konzentration eine wichtige Rolle zu spielen. Diese war assoziiert mit einer Reduktion des intrazellulären Milieus, bestätigt durch einen Anstieg des GSH/GSSG-Verhältnisses (reduziertes/oxidiertes Glutathion) und einen abfallenden intrazellulären pH-Wert. Die Behauptung, dass ein Abfall der  $\text{O}_2^-$ -Konzentration die Apoptose triggert, wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die Apoptose in Zellen mit  $\text{O}_2^-$ -Spiegeln, die nahe oder über der Ausgangskonzentration gehalten wurden, durch Hemmung des stärksten  $\text{O}_2^-$  abbauenden Enzyms, der CuZnSOD, verzögert werden konnte [Clément et al. 1998]. Bronchialepithelien von Asthmatikern zeigten sich gegenüber einer durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgelösten Apoptose empfindlicher als Bronchialepithelien von Gesunden [Bucchieri et al. 2002]. In der Tat ist bekannt, dass das Bronchialepithel von Asthmatikern durch einen Verlust von Zylinderepithel charakterisiert ist.

#### 1.1.7 Wasserstoffperoxid und Vitamin E

Das mitochondriale Elektronentransportsystem verbraucht mehr als 85 % des gesamten Zellsauerstoffs. 5 % des Sauerstoffs werden von den Mitochondrien benötigt, um Superoxide, Wasserstoffperoxid und andere ROS unter normalen physiologischen Bedingungen zu erzeugen. Mäuse, die über 15 Wochen mit einer

Vitamin E-Mangel-Diät gefüttert wurden, hatten eine fast 5-fach höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in ihrer Skelettmuskulatur als Mäuse, die mit einer Vitamin E-angereicherten Diät ernährt wurden. Weibliche Tiere profitierten deutlich mehr von der Vitamin E-angereicherten Diät als männliche.

Vitamin E ist also in der Lage, die mitochondriale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion direkt zu steuern. Die erste Folge einer mitochondrialen Überproduktion von ROS ist ein Gewebeschaden, wie er beim Vitamin E-Mangel-Syndrom gesehen wird. [Chow *et al.* 1999].

## **1.2 Chronisch-obstruktive Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)**

### **1.2.1 Charakteristika**

Die COPD (chronic obstructive pulmonary disease) ist ein grosses weltweites Gesundheitsproblem mit wachsender Prävalenz, Morbidität und Mortalität. Weltweit ist die COPD die vierthäufigste Todesursache. Es wird erwartet, dass sie im Jahre 2020 unter den häufigsten Todesursachen auf Platz 3 und bezüglich der Krankheitsfolgen - gemessen an der Summe an Jahren, die durch vorzeitigen Tod verloren gehen, und an Jahren, die mit einer schweregradgewichteten Behinderung (daily disability adjusted life year) einhergehen - von Rang 12 auf Rang 5 der weltweit häufigsten Erkrankungen vorrücken wird [Lopez AD, Murray CJL 1998].

Valide Angaben zur Prävalenz der COPD in Deutschland liegen nicht vor. Die Prävalenz der chronischen Bronchitis wird bei der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland auf 10-15 % geschätzt. Der Anteil der chronisch-obstruktiven Bronchitis an der Gesamtprävalenz ist nicht genau bekannt. Querschnittsuntersuchungen in Deutschland haben gezeigt, dass bei etwa 14 % der erwachsenen Bevölkerung mit einer Einschränkung der Lungenfunktion zu rechnen ist. Lebensqualität und Prognose werden durch die obstruktive Ventilationsstörung nachhaltig beeinflusst [Konietzko u. Fabel 2000].

Unbestritten ist die sozioökonomische Bedeutung der COPD. Einer prospektiven Krankheitskostenstudie zur Folge fallen in Deutschland hochgerechnet jährlich direkte Kosten (Arzneimittel, stationäre Behandlung, ärztliche Leistungen) von 4,5 Mrd. Euro und indirekte Kosten (Arbeitsunfähigkeit, Pflegekosten) von 3,94 Mrd. Euro durch die COPD an [Rychlik *et al* 2001].



Vor einigen Jahren wurde unter der Federführung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die GOLD-Initiative (Global Initiative for Chronic Lung Disease) begründet, die sich zum Ziel gesetzt hatte, die Erkrankung mehr ins Bewusstsein der medizinischen wie der allgemeinen Öffentlichkeit zu rücken sowie eine einheitliche Diagnostik und evidenzbasierte Therapie vorzuschlagen. Die Richtlinien der GOLD-Initiative wurden im November 2002 von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und der Deutschen Atemwegsliga unter Berücksichtigung der Bedingungen in Deutschland überarbeitet.

Eine zentrale Leistung der GOLD-Initiative bestand darin, dass erstmals eine allgemein verbindliche Definition der COPD versucht wurde. Dies wurde erschwert durch die Tatsache, dass verschiedene Aspekte der COPD auf unterschiedlichen Voraussetzungen basieren. So ist die chronische Bronchitis rein klinisch definiert als Husten und Auswurf für mindestens 3 aufeinanderfolgende Monate in mindestens 2 aufeinanderfolgenden Jahren (WHO). Die chronisch-obstruktive Bronchitis wird lungenfunktionsanalytisch, das Lungenemphysem hingegen pathoanatomisch definiert. Da es schwierig und teilweise in der Praxis unmöglich ist, die jeweils dominierende Pathophysiologie herauszuarbeiten, opferte die GOLD-Initiative die scheinbare Genauigkeit der Differenzierung teilweise dem allgemeinen Begriff der COPD [Vogelmeier 2003].

Die COPD umfasst demzufolge eine Symptomatik und funktionelle Beeinträchtigung der Lunge, die charakterisiert ist durch eine Kombination aus chronischem Husten, gesteigerter Sputumproduktion, Atemnot, Atemwegsobstruktion und eingeschränktem Gasaustausch. Die COPD lässt sich als eine Krankheit definieren, die durch eine progrediente, nach Gabe von Bronchodilatoren und/oder Glucocorticoiden nicht vollständig reversible Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer chronischen Bronchitis und/oder eines Lungenemphysems gekennzeichnet ist. Nicht unter die Diagnose fallen andere Ursachen einer Atemwegsobstruktion wie Asthma bronchiale und Mukoviszidose, Bronchiektasie und Bronchitis obliterans. Die Einteilung von Patienten mit COPD in Patientengruppen mit chronisch-obstruktiver Bronchitis und mit Lungenemphysem ist mit den routinemäßigen Kenngrößen der Lungenfunktion häufig schwierig, insbesondere im Frühstadium. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung erscheint die Unterscheidung zwischen chronisch-obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem mittels differenzierter Lungenfunktionsanalytik und bild-

gebender Diagnostik auch im Hinblick auf die optimale Nutzung vorhandener Therapieoptionen sinnvoll [Worth et al. 2002].

### 1.2.2 Pathomechanismen

Die klinische Manifestation und Progression der Erkrankung kann auf eine Reihe von Faktoren wie  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel, rezidivierende bronchopulmonale Infekte, inhalative Noxen, sozioökonomischer Status, niedriges Geburtsgewicht und häufige bronchopulmonale Infekte in der Kindheit zurückgeführt werden. Bekanntermaßen sind ca. 90 % der Patienten mit COPD Raucher. Aus bislang unbekanntem Gründen entwickeln jedoch nur ca. 10-20 % der Raucher eine COPD. Rauchen scheint die schädlichen Effekte anderer inhalativer Noxen der Umwelt zu unterstützen und umgekehrt [Repine et al. 1997]

Initial kommt es zu einer Entzündungsreaktion im Bereich der Bronchiolen mit einer Verengung dieser Strukturen und einem Widerstandsanstieg in den peripheren Luftwegen. Dadurch kommt es zu einer Dehnung und Scherung im Bereich der Anheftung der Alveolen an die terminalen und respiratorischen Bronchiolen mit einem allmählich fortschreitendem Verlust der alveolären Strukturen. Es finden sich eine Vergrößerung der mukösen Drüsen, Atrophie des Bronchialknorpels und eine Hyperplasie der glatten Muskulatur. Eine Obstruktion wird häufig mit einer Erniedrigung des FEV<sub>1</sub>-Wertes gleichgesetzt. Diese kann sowohl auf eine veränderte Bronchialgeometrie wie auch auf eine verminderte Elastizitätskraft zurückgeführt werden. Beim Lungenemphysem liegt eine Erweiterung der lufthaltigen Strukturen aufgrund eines destruierenden Prozesses in Form einer völligen oder teilweise Zerstörung der Azini oder ihrer Komponenten vor. Hierbei lässt sich ein zentrilobuläres von einem panlobulären Emphysem unterscheiden.

Das zentrilobuläre Lungenemphysem, das meist pathogenetisch mit einem Nikotinabusus vergesellschaftet ist, beginnt in den oberen Lungenabschnitten und ist hier am stärksten ausgeprägt. Beim panlobulären Lungenemphysem besteht eine Assoziation zum  $\alpha^1$ -Antitrypsinmangel. Es beginnt in den Lungenunterlappen und schreitet von peripher nach zentral fort. Daneben existieren auch Mischformen, wie sie typischerweise bei Patienten, die an einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung leiden, vorkommen.

Die Sputumdiagnostik zeigt insbesondere Besiedlungen mit *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moxarella catarrhalis*. Die Lungenfunktionsanalyse ergibt z.T. massiv erhöhte Werte für die funktionelle Residualkapazität (FRC) und das Residualvolumen (RV) aufgrund des Verlustes an elastischen Rückstellkräften der Lunge und einer verfrühten Inspirationsphase bei einer verlängerten Expirationsphase. Auch eine Zunahme der totalen Lungenkapazität (TLC) tritt häufig auf. Als dynamischer Parameter weist der Quotient aus forciertem expiratorischem Volumen in der ersten Sekunde ( $FEV_1$ ) und der forcierten Vitalkapazität (FVC) bei Werten unter 70 % auf eine relevante Obstruktion hin [Pauwles et al 2001].

Nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und der Deutschen Atemwegsliga liegt bereits bei einer Einschränkung des  $FEV_1/VC < 70\%$  eine leichtgradige COPD vor, selbst wenn der Wert von  $FEV_1 \geq 80\%$  des Sollwertes beträgt [Worth et al. 2002]. Funktionell gelten für die Diagnose des Emphysems nach der American Thoracic Society eine Abnahme des korrigierten  $DL_{CO}$ -Wertes kleiner als 80 % des Sollwertes und/oder einem RV größer als 120 % des Sollwertes. Es kann jedoch auch bei normalen Werten für den Transferfaktor ein mittelschweres Emphysem bestehen.

In der Pathogenese der COPD und des Lungenemphysems spielt  $\alpha_1$ -Antitrypsin eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Peroxynitrit, Phagozyten und chemisch erzeugte Oxidanzien Antiproteasen inaktivieren können. Ausserdem können stimulierte Alveolarzellen des Typs II und Alveolarmakrophagen den  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor in Gegenwart von MPO (neutrophile Myeloperoxidase) inaktivieren, wie beim Meerschweinchen gezeigt. Die Empfänglichkeit der  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Methionin-Gruppen bezüglich Schäden durch Oxidanzien und die Tatsache, dass einige Zigarettenraucher erhöhte  $\alpha_1$ -Antitrypsinspiegel mit oxidierten Methioninketten in der Lungenlavage aufwiesen, legten eine Inaktivierung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin durch Oxidanzien, als eine Voraussetzung für Gewebeschäden durch Elastase *in vivo*, nahe. Diese Daten wurden gestützt durch eine weitere Untersuchung, die demonstrierte, dass die Empfänglichkeit für Schäden an isoliertem Lungengewebe durch eine niedrige, nicht-toxische  $H_2O_2$ -Dosis nach Perfusion mit Neutrophilenelastase deutlich stieg. Im Gegensatz dazu war die Neutrophilenelastase in Abwesenheit von Oxidanzien nicht merklich toxisch.

Ferner hat im Verständnis der COPD der Eisenstoffwechsel eine zunehmende Bedeutung. Die Eisenkonzentrationen sind in Alveolarmakrophagen (AM) und in der Lavage von Zigarettenrauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht. Gesättigte freie Fettsäuren, gewonnen aus Zigarettenrauch, können 2-wertiges Eisen in organisches Eisen umwandeln und die Produktion von HOCl in stimulierten polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) *in vitro* steigern. Eisen liegt im Körper aufgrund seiner hohen Reaktionsfähigkeit in verschiedenen gebundenen Formen, wie z.B. in Transferrin, Caeruloplasmin und Ferritin vor. Diese Schutzmechanismen könnten im Falle der COPD gestört sein, da Zigarettenrauch und Oxidanzien in der Lage sind, Eisen aus Ferritin freizusetzen [Repine et al 1997].

Oxidanzien können ferner die Mucosproduktion in Epithelzellen in Zellkulturen erhöhen und die Zilienfunktion abschwächen. Sie stimulieren die Produktion von Thromboxanen, reduzieren die Surfactantaktivität und schädigen Fibroblasten. Alle diese Prozesse könnten zur Schädigung von Lungenstrukturen und ihren Funktionen sowie zur Störung von Reparaturmechanismen beitragen [Repine et al. 1997]. Im Lungengewebe schädigen die toxischen Sauerstoffprodukte von Phagozyten des Gefäßsystems und der Atemwege die Alveolarzellen.

### 1.2.3 Evidenz für eine mögliche Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Es wird angenommen, dass an der Pathogenese des Lungenschocksyndroms (ARDS) neben dem Komplementsystem ROS, u.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligt sind [Ward 1983]. Beatmete Patienten, die eine Schocklunge (ARDS) entwickelten, wiesen im Exhalat deutlich höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen auf als solche, die kein ARDS entwickelten (1,68±0,35 µM vs. 0,34±0,08 µM). Gleichzeitig war die Konzentration von Plasma-Lysozym, als Maß für den Zellumsatz von Neutrophilen *in vivo*, bei Patienten mit ARDS im Vergleich zu Patienten ohne Schocklunge erhöht (9,2±2,2 U/ml vs. 3,4±1,1 U/ml) [Baldwin et al. 1986].

Daher lag es nahe, auch bei Patienten mit COPD H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Exhalat zu messen. In der Tat fanden sich in einer Gruppe von (nicht exazerbierten) Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu Gesunden erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werte (0,205±0,054 µmol/l vs. 0,029±0,012 µmol/l). Während einer akuten Exazerbation stiegen bei den Patienten mit COPD die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werte an (0,600±0,075 µmol/l) [Dekhuijzen et al. 1996]. In einer anderen Arbeit wurden im Exhalat von Patienten mit stabilern COPD im Vergleich zu

einer gesunden Kontrollgruppe von Nichtrauchern im Mittel 10-fach höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Werte gemessen ( $0,48 \pm 0,67 \mu\text{M}$  vs.  $0,05 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ) [Nowak et al. 1999]. Diese Daten wurden durch eine weitere Arbeit bestätigt, die ebenfalls bei Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu Gesunden deutlich höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel fand ( $0,5 \pm 0,11 \mu\text{M}$  vs.  $0,12 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ) [De Benedetto et al. 2000].

## 1.3 Asthma bronchiale

### 1.3.1 Charakteristika

Das Asthma bronchiale ist eine entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch bronchiale Hyperreagibilität und variable Atemwegsobstruktion. Typische Symptome sind Atemnot, häufig anfallsartig auftretend, auch nachts und am frühen Morgen, Husten, Giemen, glasig-zähes Sputum [Wettengel et al. 1998]. Es gibt eine erbliche Disposition, u.a. aufgrund einer Beziehung zwischen dem HLA-System und der Bereitschaft zur Bildung spezifischer IgE-Antikörper (Atopie). Die IgE-Immunantwort ist mit dem HLA-B8-Gen assoziiert. Die Reaktion des IgE bildenden Systems ist wahrscheinlich nicht alleine genetisch determiniert. Jedoch fördert die Atopie die Manifestation und das Auftreten des Asthma im jüngeren Lebensalter.

Darüber hinaus ist regelhaft beim manifesten Asthma eine gesteigerte Hyperreagibilität nachweisbar. Hierunter versteht man die gesteigerte Bereitschaft der Atemwege, auf nicht-immunologische Reize mit einer Engstellung der Atemwege zu reagieren. Zahlreiche Faktoren kommen als Auslöser in Betracht: Physikalische Reize (kalte Luft, Inhalation von destilliertem Wasser, Hyperventilation, Lachen, Husten, forcierte Atemmanöver, inhalierte Partikel), chemische Reize ( $\text{SO}_2$ , intensive Gerüche, Haar- und Körperspray), pharmakodynamische Substanzen (Histamin, Methacholin, Carbachol, Acetylcholin, Prostaglandine, Cysteinyl-Leukotriene, Beta-Rezeptorenblocker). Während spezifische Reize nur bei entsprechend sensibilisierten Asthmatikern eine Reaktion hervorrufen, können die genannten unspezifischen Stimuli bei jedem Asthmатiker wirksam werden.

### 1.3.2 Pathomechanismen

Bei der Sofortreaktion des allergischen Asthma bronchiale setzen wenige Minuten (bis 120 Minuten) nach Allergenexposition die Symptome Engegefühl und Atemnot ein, die auf einen Bronchospasmus zurückzuführen sind, der u.a. durch Anwendung von Beta-Sympathomimetika unterbrochen werden kann. Dieser Reaktionstyp wird über primäre, sogenannte spasmogene Mediatoren (Histamin, Prostaglandine, plättchenaktivierender Faktor), die nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion aus Membranphospholipiden von Mastzellen gebildet werden, vermittelt. Der verzögerte Reaktionstyp erklärt das Auftreten von langandauernden Beschwerden. Hierbei kommt es 4 bis 6 (2-24) Stunden nach der Allergenexposition zu einer erneuten Atemwegsobstruktion, die länger andauert und in nur geringem Grade durch Beta-Sympathomimetika beeinflusst wird. Kortikosteroide hingegen zeigen eine gute protektive Wirkung. Dieser Reaktionsstyp wird durch sogenannte sekundäre Mediatoren (Neutrophilen-chemotaktischer Faktor, Leukotrien B<sub>4</sub>, plättchenaktivierender Faktor, Eosinophilen-chemotaktischer Anaphylaxie-Faktor, Prostaglandine) vermittelt, die ebenfalls nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion aus Mastzellen freigesetzt werden und das Einwandern von Entzündungszellen in die Bronchialwand verursachen.

Entzündungsreaktion und Hyperreagibilität sind korreliert. Nach einer verzögerten Reaktion genügen geringe spezifische oder unspezifische Reize um eine erneute Sofort- oder verzögerte Reaktion auszulösen. Die Histaminschwelle kann über Tage erniedrigt sein. Auch nach Allergenkarenz kann die Hyperreagibilität noch über Monate fortbestehen. Darüber hinaus können Infektionen Läsionen im Schleimhautepithel verursachen und zur Freisetzung von Mediatoren und dem Start einer allergischen Reaktion führen. Es entspricht der klinischen Erfahrung, dass Infektionen eine Überempfindlichkeit induzieren, verstärken und unterhalten können [Wettengel et al. 1995].

Eosinophile Granulozyten stellen auch eine Querverbindung zur COPD her. Eine Eosinophilie im peripheren Blut wurde als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer bronchialen Obstruktion und als ein negativer prognostischer Faktor bei neu diagnostizierten Patienten mit COPD identifiziert [Lacoste et al. 1993, Lebowitz & Postma 1995]. Ausserdem wurden in Biopsien der Bronchialwand von Patienten mit COPD eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen [Saetta et al. 1993] und in der

Lungenlavage erhöhte Spiegel für das eosinophilic cationic protein (ECP), als Marker einer verstärkten Eosinophilenaktivität, gefunden [Riise *et al.* 1995]. Daneben war die Reversibilität der Bronchialobstruktion korreliert mit einer bronchialen Eosinophilie bei Patienten mit starker Obstruktion und Emphysem. Aus heutiger Sicht muss sicher die Frage gestellt werden, ob es sich bei den genannten Patientenkollektiven um Patienten mit COPD ohne begleitendes Asthma handelte. Unabhängig davon scheinen Eosinophile eine Rolle bei Entzündungsreaktionen im Bronchialsystem bei verschiedenen Erkrankungen spielen zu können. Dies wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass Eosinophile sehr viel mehr  $O_2^-$  produzierten als Neutrophile *in vitro* [Sedgwick *et al.* 1998] und somit zum pulmonalen oxidativen Stress merklich betragen.

Jedoch fanden sich im Sputum von Patienten mit schwerem Asthma (FEV<sub>1</sub> 61 %Soll, Therapie mit oralen und inhalativen Steroiden) auch deutlich erhöhte Neutrophilenzahlen (53,0 [38,4-73,5] %), verglichen mit Sputumproben von Patienten mit leichtem Asthma (FEV<sub>1</sub> 91 %Soll, Therapie mit Beta-2-Agonisten bei Bedarf) (35,4 [29,8-46,1] %) und einer gesunden Kontrollgruppe (27,7 [20,6-42,2] %). Interleukin-8 (IL-8) und MPO-Spiegel waren in der Gruppe der schwerkranken Asthmatikern am höchsten. Die Eosinophilenzahl war sowohl bei leichten als auch bei schweren Verlaufsformen des Asthmas erhöht. Das ECP zeigte die höchsten Spiegel bei schwerkranken Asthmatikern. Dies bestätigte die Rolle von Eosinophilen beim Asthma, unterstrich aber auch die potentielle Rolle von Neutrophilen beim schweren Asthma [Jatakanon *et al.* 1999].

### 1.3.3 Evidenz für eine mögliche Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die Eosinophilenperoxidase benutzt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um HOBr, die Myeloperoxidase, um HOCl zu erzeugen. Bei Asthmatikern mit stabilem Asthma wurden im Sputum signifikant erhöhte Werte für die Eosinophilenperoxidase gemessen, während sich keine Erhöhung der Myeloperoxidase fand. Die 3-Bromotyrosinspiegel waren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe 3-fach erhöht, die 3-Chlorotyrosinspiegel wiederum waren nicht signifikant angehoben. Eosinophilenperoxidase und 3-Bromotyrosin waren streng miteinander korreliert [Aldridge *et al.* 2002].

In einer weiteren Arbeit konnte eine positive Korrelation zwischen Eosinophilen im Sputum, der ECP-Konzentration und den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spiegeln bei stabilen Asthmatikern in

leichten bis mittelschweren Krankheitsstadien gezeigt werden. Darüber hinaus fand sich auch eine Korrelation zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Neutrophilen bei Patienten mit mittelschwerem Asthma, die bei näherer Analyse auf nicht mit inhalativen Steroiden behandelte Patienten zurückzuführen war [Loukides et al. 2002].

Somit scheint bei leichtem Asthma eine erhöhte Eosinophilenzahl zu einer erhöhten Produktion von HOBr zu führen, während Neutrophile und die Produktion von HOCl in diesem Krankheitsstadium keine wesentliche Rolle spielen. Bei mittelschwerem und schwerem Asthma lassen erhöhte Neutrophilenzahl und Myeloperoxidase-Spiegel an eine zusätzliche Involvierung von Neutrophilen im Entzündungsprozess denken.

Die potentielle Funktion von Neutrophilen im Entzündungsprozess beim Asthma wurde unterstrichen durch die Beobachtung, dass Neutrophile von Asthmatikern mehr Superoxidradikale nach Stimulation mit Phorbolestern produzierten als solche von Gesunden. Dies wurde auf eine verstärkte NADPH-Oxidase-Aktivität zurückgeführt. Ebenso könnte eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation in Neutrophilen von Asthmatikern für eine erhöhte Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und nachfolgend erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Exhalat verantwortlich sein. Auch nach Stimulation von Neutrophilen von Asthmatikern bzw. Gesunden mit N-formyl-Methionin-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) fanden sich ähnliche Ergebnisse. Der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), als frühes Anzeichen einer Neutrophilenaktivierung, war in der Gruppe der Asthmatiker sehr viel höher als in der Gruppe der Gesunden ( $205 \pm 44$  nM vs.  $113 \pm 22$  nM). Entsprechend lag der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel im Exhalat der Asthmatiker 20-fach höher als bei den Gesunden ( $0,18 \pm 0,20$   $\mu\text{M}$  vs.  $0,01 \pm 0,04$   $\mu\text{M}$ ). Es konnte eine strenge Korrelation zwischen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen und der Änderung der intrazellulären Ca-Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) sowie der maximalen Geschwindigkeit des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieges festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass die erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel im Exhalat von Asthmatikern durch aktivierte Neutrophile im Verlauf einer Mukosaentzündung gebildet werden konnten [Antczak et al. 1999].

Erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen im Exhalat von Asthmatikern wurden auch in anderen Arbeiten mehrfach nachgewiesen [Dohlmann et al. 1993, Antczak et al. 1997, Jöbsis et al. 1997, Emelyanov et al. 2001, Loukides et al. 2002]. Die Konzentration im Exhalat war bei Kindern mit stabilem Asthma bronchiale im Vergleich zu Gesunden erhöht [Jöbsis et al. 1997, Dohlmann et al. 1993], insbesondere wenn



diese keine antiinflammatorische Therapie erhielten [Jöbsis et al. 1997]. Bei akut erkrankten Kindern mit Asthma stiegen die Werte an ( $1,5 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$ ) im Vergleich zu stabilen Asthmatikern ( $0,54 \pm 0,56 \mu\text{mol/l}$ ) und Gesunden ( $0,25 \pm 0,27 \mu\text{mol/l}$ ). Bei den akut erkrankten Asthmatikern wurde allerdings nicht zwischen einer Infektion des oberen oder unteren Respirationstraktes unterschieden. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen korrelierten mit dem klinischen Zustand der Patienten [Dohlmann et al. 1993]. Andere Autoren berichteten, dass die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel im Exhalat bei Patienten mit mittelschwerem Asthma ( $0,95 \mu\text{M}$ ) höher lagen als bei Patienten mit persistierendem leichtem Asthma ( $0,59 \mu\text{M}$ ) oder solchen mit intermittierendem leichtem Asthma ( $0,27 \mu\text{M}$ ) [Loukides et al. 2002].

## **1.4. Bronchiektasen**

### **1.4.1 Charakteristika**

Unter Bronchiektasen versteht man sackförmige oder zylindrische Erweiterungen großer Bronchien mit Destruktion der Bronchialwand und meist auch der nachgeschalteten Alveolarbezirke. Die entstandenen Blindsäcke verursachen in der Regel eine bakterielle Besiedlung. Bronchiektasen können umschrieben oder diffus ausgebildet, angeboren oder erworben sein. Angeborene Bronchiektasen sind die Folge einer gestörten Zilienfunktion oder Alveolardifferenzierung. Hierzu zählt man das Syndrom der unbeweglichen Zilien, das sogenannte "immotile cilia syndrome", wozu auch die Ziliendyskinesie gerechnet wird. Diese Anomalie führt zu rezidivierenden sinubronchialen Infektionen, Infertilität und Dextrokardie. Dieses Krankheitsbild ist auch unter dem Namen Kartagenersyndrom bekannt. Auch bei der Mukoviszidose können rezidivierende bronchopulmonale Infektionen aufgrund einer Störung der exogenen Drüsenfunktion zur Ausbildung von Bronchiektasen führen.

### **1.4.1 Pathomechanismen**

Einerseits führen kongenitale Mißbildungen mit präformierten Blindsäcken in der Regel zur Sekretretention mit sekundärer bakterieller Besiedlung. Die infektiöse Destruktion von Bronchialwandungen und peribronchiektatische Pneumonien können zur Ausweitung des Prozesses kommen. Sehr selten liegt ein William-Campbell-Syndrom mit Knorpelmangel in den größeren Bronchien und dadurch verursachter

dilatativer Bronchialwunderweiterung vor. Erworbene Bronchiektasen entstehen als Folge akuter oder chronischer bronchopulmonaler Entzündungen. In der Kindheit zählen zu den häufigsten Ursachen Masern, Keuchhusten oder Fremdkörperaspiration.

Im Erwachsenenalter entstandene Bronchiektasen finden sich insbesondere umschrieben bei der Oberfeldtuberkulose, nach Aspirationspneumonien (meist in den dorsobasalen Lungenanteilen) und im Rahmen einer chronisch-obstruktiven Bronchialerkrankung (meist symmetrisch, bevorzugt in den basalen Lungenabschnitten). Die Symptome der Bronchiektasie sind geprägt von der Art der Grunderkrankung sowie ihrer Lokalisation und Ausprägung. Als Leitsymptome finden sich produktiver Husten, besonders frühmorgens und nach Lagewechsel, gehäuft Hämoptysen und rezidivierende Pneumonien sowie eine zunehmende Bronchialobstruktion. Es wird in großen Mengen mukopurulenten Sputum, oft putride und stinkend produziert. Oft enthält der Auswurf Blutfäden. Fötide riechendes Sputum weist häufig auf die Besiedlung mit gramnegativen Problemkeimen, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* und Staphylokokken hin. [Fabel 1995].

#### **1.4.2 Evidenz für eine mögliche Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Ausgehend von der These, dass aktivierte Phagozyten zur Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beitragen und die BAL von Patienten mit Bronchiektasie signifikant mehr Neutrophile enthält als die einer gesunden Kontrollgruppe [Sepper et al. 1995], ferner bakterielle Infekte zur Rekrutierung und Aktivierung der Phagozyten beitragen, liegt es nahe, erhöhte Werte von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Bronchiektasie zu erwarten. In einer vorliegenden Arbeit wurden in der Tat erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spiegel bei Bronchiektasie berichtet. Diese korrelierten mit dem Krankheitsstadium, dass mittels Lungenfunktion (FEV<sub>1</sub>%Soll) festgelegt wurde. Zwischen Patienten, die mit inhalativen Steroiden behandelt wurden, und solchen ohne Behandlung ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Höhe der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Exhalat [Loukides et al. 1998].

## 1.5 Problemstellung

Die vorliegenden Daten geben Hinweise darauf, dass die Konzentration des exhalieren  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei entzündlichen Atemwegserkrankungen erhöht sein kann. Offen ist jedoch die Frage, ob sich verschiedene Erkrankungen in der Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}$  unterscheiden und inwieweit die teilweise inkonsistenten Ergebnisse auf ein ungünstiges Verhältnis von Effektstärke zu Variabilität zurückzuführen ist.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war somit, herauszufinden, ob sich Patienten mit COPD oder Asthma bronchiale oder Bronchiektasen sowie eine gesunde Kontrollgruppe bezüglich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Atemkondensat unterscheiden. Sekundäres Ziel war es, die methodologische Variabilität der Nachweismethode zu erfassen, durch Wiederholungsmessungen (biologische) Messwertschwankungen zu quantifizieren sowie die erhaltenen Werte unter den Bedingungen praktischer klinischer Anwendung in einen Bezug zu anderen Krankheitsdaten zu stellen. Zu diesem Zweck sollten in Einzelfalldarstellungen solche Daten herangezogen werden, die bei der Behandlung der entsprechenden Krankheitsbilder routinemäßig erhoben werden.

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Gerätebeschreibung**

Im Forschungslabor des Krankenhauses Großhansdorf wurde ein Geräteaufbau konstruiert, der sich zur Exhalatgewinnung eignete. Dieser setzte sich zusammen aus einer Thermostatanlage mit Umwälzpumpe in Form eines Kompakt-Tischgerätes der Firma Julabo, Fabrikat F34-HC, einem aus Kupfer hergestelltem Kühler mit einem Zu- und Ablauf für Kühlflüssigkeit, aus Verbindungsstücken aus PVC-Rohr, zwei In-Ex-Ventilen zur Verhinderung einer Rückatmung von Atemluft aus dem Kühler, sowie einem Mundstück. Vor jeder Messung wurden drei Teflonschläuche in dafür vorgesehene Kupfer-Röhren im Innenraum des Kühlers eingeschoben. Diese Röhren wurden während des Versuches ständig von Kühlflüssigkeit umspült, so dass eine konstant tiefe Temperatur in den Teflonschläuchen gewährleistet war. Die Kühleinheit war auf minus 20°C eingestellt, so dass das gewonnene Exhalat sofort ausfror. Die Ventile waren so angelegt, dass die eingeatmete Luft vor den gekühlten Teflonschläuchen angesogen wurde und die Ausatmung durch die Teflonschläuche erfolgte. Auf diese Weise waren Umgebungseinflüsse ausgeschlossen.

### **2.2 Exhalatgewinnung**

Vor der Exhalatgewinnung spülten alle Patienten den Mund mit Leitungswasser aus, um mögliche Kontaminationen mit Speiseresten und Speichel zu vermeiden. Während des Versuches trugen die Patienten eine Nasenklemme, um die Atmung durch das Sammelsystem zu leiten. Das Exhalat wurde während 10 min dauernder Ruheatmung gewonnen. Hierzu atmete der Patient über ein Mundstück in das oben beschriebene Sammelsystem für Atemkondensat.

### **2.3 Exhalatverarbeitung**

#### **2.3.1 Exhalataufbewahrung**

Das Exhalat wurde in den Teflonschläuchen bei minus 20°C ausgefroren, sodann in gefrorenem Zustand in Reagenzgläsern gesammelt und bei minus 80°C bis zur Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration tiefgefroren gelagert. Zwischen der Exhalat-

gewinnung und dem Erhalt der Messwerte vergingen nie mehr als 6 Stunden, um einer Degradation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zuvorzukommen.

### **2.3.2 Bestimmung der $\alpha$ -Amylase im Exhalat**

Als Indikatorenzym zur Erfassung möglicher Kontaminationen des Exhalates mit stark wasserstoffperoxidhaltigen Sekreten der Nasenschleimhaut oder mit Speichel wurde das Enzym  $\alpha$ -Amylase in den Exhalatproben gemessen. Dabei handelte es sich um eine Bestimmung der Gesamt-Amylase, also einschließlich der Isoenzyme Pankreas-Amylase (P-Amylase) und Speichel-Amylase (S-Amylase). Eine Erhöhung der Amylase führte zum Ausschluss der Proben.

## **2.4 Methode und Materialien der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bestimmung**

### **2.4.1 Methode der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bestimmung**

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen wurden nach der Methode von Gallati und Pracht zur Peroxidaseaktivitätsbestimmung mit den Substraten  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin bestimmt [Gallati & Pracht 1985].

Peroxidase aus Meerrettich wird häufig bei Enzymimmunoassays als Markierungs- und Indikatorenzym verwendet. Hierzu steht mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ein Redoxindikator zur Verfügung, der im Gegensatz zur früher angewandten Substanz o-Phenylendiamin keine oder nur geringe mutagene und kanzerogene Aktivitäten besitzt. In Anlehnung an die Oxidation des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidins kann angenommen werden, dass auch unter der katalytischen Einwirkung der Peroxidase 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in einem ersten Schritt zum blaugefärbten Radikalkation und in einem zweiten Schritt zum gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumsalz oxidiert wird. Kinetische Studien der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung zeigten, dass die Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität stark von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration beeinflusst wird sowie vom pH-Wert der Testlösung, von der Konzentration von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin sowie der Reaktionsdauer.

Das oxidierte blaugefärbte 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation kann durch die Senkung des pH-Wertes zum gelben 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion überführt werden. Dabei ist der Anteil an 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-

diphenochinon-4,4'-diimoniumion zum blaugefärbten 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Eine vollständige Umsetzung zum 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion und somit die Ausbildung eines einzigen Absorptionsmaximums bei der Wellenlänge 450 nm wird bei einem pH-Wert von 1 und tiefer erreicht. Dies ist vor allem bei der Durchführung von enzym-immunologischen Tests, bei denen die Peroxidase als Indikatorenzym eingesetzt wird, von Vorteil. Durch eine Absenkung des pH-Wertes in der Testlösung kann zugleich die peroxidatische Aktivität sofort und vollständig gestoppt werden.

*Gallati & Pracht [1985]* beschrieben ursprünglich das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Peroxidase-System zur quantitativen Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wie folgt:

- In einer Photometerküvette von 10 mm Schichtdicke werden 0-40  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0,2 mol/l Kaliumcitratpuffer vom pH-Wert 3,95 bei Anwesenheit von 1,0 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch Zugabe von 20 mg/l Peroxidase katalytisch vollständig umgesetzt.
- Die Absorption der Testlösung wird bei der Wellenlänge 370 nm gemessen.
- Anhand einer mitgeführten Standardreihe kann die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration der Probe direkt abgelesen werden.
- Die Nachweisgrenze dieses enzymatischen Systems wird bei einem Messbereich von 0-40  $\mu\text{mol/l}$  mit etwa 2  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  angegeben.

Zur Verbesserung des Verfahrens wurde als vorteilhaft angegeben, nach einer bestimmten Reaktionsdauer die peroxidatische Aktivität zu stoppen und den während der Indikatorreaktion entstandenen Farbkomplex zu stabilisieren, so dass die photometrische Messung innerhalb einer gewissen Zeitdauer zeitunabhängig durchgeführt werden kann. Als Stopp-Substanz eignet sich Schwefelsäure, die eine ausreichende Senkung des pH-Wertes bewirkt und das blaugefärbte Radikalkation zum gelbgefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumion überführt, das eine wesentlich höhere Absorption besitzt und bei 450 nm gemessen wurde.

## 2.4.2 Materialien zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Bestimmung

### Zitronensäurepuffer

Es wurde ein Zitronensäurepuffer auf der Grundlage von citric acid tripotassium salt C-8385 der Firma Sigma wie folgend beschrieben hergestellt: 6,45 g citric acid tripotassium salt in 40 ml aqua-bidest lösen. Anschließend den pH-Wert der Lösung mit 25%iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,8 einstellen und den Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit aqua bidest. auffüllen.

### TMB

Es wurde TMB (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin) T-2885 der Firma Sigma eingesetzt. 125 mg TMB wurden vorsichtig unter Anwendung der nötigen Sicherheitsvorkehrungen in eine Glasflasche eingewogen und mit 2,5 ml Aceton gelöst und anschließend mit 22,5 ml Methanol versetzt. Diese Lösung war 21 mM und musste lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Erst unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde eine 420 µM Lösung aus dem Methanol-Stamm unter Zugabe von Zitronensäurepuffer hergestellt.

### Peroxidase

Aus einem Peroxidase-Lyophilisat 413470 (2500 U ) der Firma Boehringer Mannheim wurde mit PBS als Puffersystem eine Stammlösung mit einer Aktivität von ca. 52 U/ml hergestellt.

### PBS

Dieses Puffersystem wurde hergestellt aus: 1 g / 500 ml KCl, 1 g / 500 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 g / 500 ml NaCl sowie 7,2 g / 500 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Das Puffersystem wurde 10-fach verdünnt eingesetzt.

### Stopplösung

Als Stopplösung und zur Herstellung eines stabilen gelben Farbkomplexes wurde 4 N Schwefelsäure benutzt.

### Wasserstoffperoxid

Zur Herstellung der Eichkurven wurde Hydrogen Peroxide 30 % (w/w) der Firma Sigma/Aldrich H-1090 verwendet. Die Stammlösung wurde bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Aus dieser Stammlösung, die einer 9,8 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung entsprach, wurde vor jedem Versuch eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 12,5 µM, 4 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,125 µM, 0,062 µM erstellt, um Eichkurven zu

erhalten. Die höchste Konzentration musste bei Zugabe zum Ansatz, bestehend aus TMB-Lösung und Peroxidase-Lösung, augenblicklich eine blaue Farbe zeigen und diente derart als Positivkontrolle. Zu jeder Messung wurde eine eigene Standardkurve mitgeführt.

### **2.4.3 Ablauf der Messung**

Nach Ansatz der Reagenzien und Exhalatgewinnung wurde der Assay auf einer Mikrotiterplatte (COSTAR 3591) durchgeführt. Standardproben, Blank- und Exhalatproben wurden jeweils in Doppelbestimmung mitgeführt. Als Blank diente eine Probe, die alle Reagenzien, jedoch keine Standardlösung enthielt. Um einen Volumenausgleich zu schaffen, wurde aqua bidest. anstelle der Standardlösung bzw. des Exhalats eingesetzt. Anhand des Blanks war es möglich, die Eigenextinktion der verwendeten Reagenzien zu erfassen. Zur Messung wurde nachstehender Ablauf befolgt:

1. Mit einer Multipipette wurden 100  $\mu$ l TMB-Lösung in alle Test-wells vorgelegt.
2. Mit einer Multipipette wurden jeweils 10  $\mu$ l Peroxidase in die wells direkt zur TMB-Lösung gegeben.
3. Die Standard-Lösungen (100  $\mu$ l) wurden zum Ansatz pipetiert. Die Blank-wells erhielten statt Standard-Lösung 100  $\mu$ l aqua bidest.
4. Die Testplatte wurde bei Raumtemperatur 20 min abgedunkelt inkubiert.
5. In jedes well wurden 50  $\mu$ l Stopplösung zugegeben.
6. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und die Daten mit dem Programm BIOLINX ausgewertet.

### **2.4.4 Auswertung der Standards**

Die Standards wurden zeitgleich mit den Patientenproben als Doppelbestimmungen weiterverarbeitet und photometrisch ausgewertet.

Von den Absorptionen der Standards sowie der Patientenproben wurde der Blankwert, der die Eigenabsorption der verwendeten Lösungen widerspiegelte, abgezogen. Dieses Vorgehen diente der besseren Vergleichbarkeit der Messungen, da Effekte, wie sie z.B. durch Verwendung von unterschiedlich alten Lösungen entstehen können, auf diese Weise berücksichtigt wurden. In einer halblogarithmischen Darstellung wurden die Absorptionen gegen die Konzentrationen aufgetragen. Die so



erhaltene Asymptote bot im Vergleich zu einer Geraden eine bessere Auflösbarkeit im Bereich der niedrigeren Konzentrationen und war deshalb einer rein linearen Darstellung vorzuziehen.

In den meisten Messungen wurde ein Kontrollstandard mit der Konzentration 4  $\mu\text{mol/l}$  mitgeführt. In zwei Fällen erfolgte die Kontrolle mit einem Standard der Konzentration 1  $\mu\text{mol/l}$  bzw. 2  $\mu\text{mol/l}$ . Die Kontrollstandards wurden genauso hergestellt wie ein Standard der gleichen Konzentration der Standardreihe. Die Aufbewahrung der Kontrollstandards erfolgte in flüssigem Stickstoff bei minus 196 °C meist über mehrere Tage.

#### 2.4.5 Zugabe von Katalase zu den Standards

Katalase ist ein Enzym, das in pflanzlichen und tierischen Geweben allgemein verbreitet ist und Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zerlegt ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Katalase gehört zu den Peroxidasen, einer Gruppenbezeichnung für Oxidoreduktasen. Sie kann auch von anderen Donoren, z.B. Äthanol, Wasserstoff auf Wasserstoffperoxid übertragen.

Durch Zusatz von Katalase zu den Standardproben sollte geprüft werden, ob das entstandene und gemessene Reaktionsprodukt durch eine Oxidation von TMB durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt wurde oder ob es sich um eine unspezifische Reaktion handelt. Eine Farbreaktion, die nicht die Oxidation von TMB durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  voraussetzt, lässt sich nicht durch Katalase blockieren. Somit ist mit unveränderten Absorptionswerten in mit Katalase versetzten Proben zu rechnen.

Umgekehrt kommt es bei einer Reaktion, die Wasserstoffperoxid als Redoxpartner benötigt, durch den Einsatz von Katalase zur Zerlegung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff. Ohne Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel ist eine Umsetzung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in das im ersten Reaktionsschritt blaugefärbte Radikalkation und dessen weitere Umwandlung in das gelbgefärbte 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'diphenochinon-4,4'-diimoniumsalz nicht möglich. Somit müssten die Absorptionen von Proben, die mit Katalase versetzt wurden, deutlich niedriger liegen als Absorptionen von Proben ohne Katalase.

Zur Überprüfung wurden Proben des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Standards mit den Konzentrationen 12,5, 4, 2 und 1  $\mu\text{mol/l}$  mit 10  $\mu\text{l}$  Katalase versetzt und 5 Minuten bei Raum-

temperatur inkubiert. Anschließend wurden diese Proben wie die Standardproben ohne Katalase weiter bearbeitet.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) wurden für alle angegebenen Messgrößen berechnet. In der Einzeldarstellung der Gruppen wurden die ungewichteten Mittel über alle Messungen zur Berechnung verwendet. Zusätzlich wurden Variationskoeffizienten (CV) berechnet, indem die Standardabweichung als Prozent des Mittelwertes ausgedrückt wurde. Für den Vergleich der Gruppen wurden die Mittel der individuellen Mittelwerte pro Patient herangezogen, um eine Verzerrung durch die ungleiche Zahl der Messungen zu vermeiden.

Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mittels des Mann-Whitney U-Tests. Zu diesem Zweck wurden bei Mehrfachmessungen die Mittelwerte der Messungen jedes einzelnen Patienten eingesetzt. Zur Kontrolle wurden jeweils nur die ersten Messungen jedes Patienten miteinander verglichen bzw. alle Messungen aller Patienten als unabhängige Messungen behandelt. Da das Ergebnis bezüglich der statistischen Signifikanz gleich ausfiel, wird im Folgenden (Kap. 3.10) nur das mit den individuellen Mittelwerten erhaltene Ergebnis dargestellt. Die Güte der Beziehung zwischen verschiedenen Variablen wurde mittels linearer Korrelationskoeffizienten nach Pearson quantifiziert. Statistische Signifikanz wurde immer dann angenommen, wenn der Fehler erster Art ( $p$ ) kleiner als 0.05 war.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Standardkurve

Die Standardkurven waren auswertbar, jedoch war die Bestimmung von niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, die in den sehr flach verlaufenden Anteil der Kurve fielen, als problematisch anzusehen. Die Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen unterhalb von  $0,125 \mu\text{M}$  ergab im Mittel Standardabweichungen, die höher lagen als die Mittelwerte der Absorption (Tab. 1). Die Schwankungen der Standardabsorptionen kommen auch in den Graphiken der Beziehung zwischen den Absorptionen der Standards und Blank-Proben in 3.3 zur Geltung. Die Absorptionen sind in willkürlichen Einheiten angegeben, da sie in diesem Rahmen nur als Relativwerte Gültigkeit haben.

**Tabelle 1: Absorption der Standardreihe**

$\text{H}_2\text{O}_2$ Standard ( $\mu\text{M}$ )	12,5	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062
Mittelwert	242,3	80,5	42,4	23,9	13,0	8,00	7,3	6,4
Standardabweichung	18,5	12,6	9,8	8,6	7,1	6,3	8,1	8,3
CV %	7,7	15,7	23,1	36,0	54,8	78,9	111,4	129,6

#### 3.2 Mit Katalase versetzte Standardproben

Die Auswertungen ergaben für den Standard mit  $12,5 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  einen deutlichen Abfall der Absorptionswerte auf das Niveau der Blankabsorption (Tab. 2). Daraus konnte gefolgert werden, dass zum einen in den Standardproben eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängige Reaktion ablief und gemessen wurde, und zum anderen eine ausreichende Menge Katalase benutzt wurde. Bei den Standardproben  $4 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  lagen die Absorptionen der Ansätze mit Katalase deutlich oberhalb der Standards ohne Katalase. Die Eigenabsorption der Katalase schien bei diesen Konzentrationen den Effekt des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbaus und den damit verbundenen Absorptionsabfall zu überwiegen. Der Zusatz von Katalase in niedrigen Konzentrationen ist daher nicht als sinnvoll zu erachten.

**Tabelle 2: Mittelwerte der Absorptionen der Standards, Blanks mit und ohne Katalase sowie Differenzen (Proben ohne Katalase minus- Proben mit Katalase)**

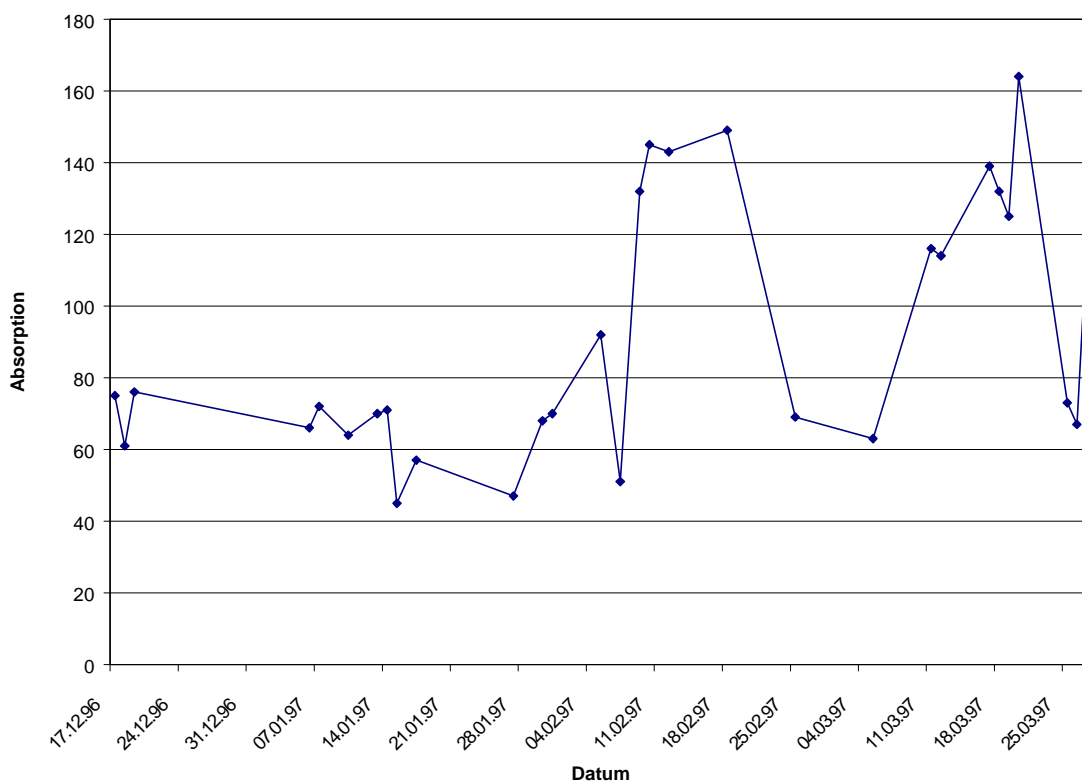
Absorptionen	Standard $12,5 \mu\text{M}$	Standard $4 \mu\text{M}$	Standard $2 \mu\text{M}$	Standard $1 \mu\text{M}$	Blank
ohne Katalase	242,3	80,5	42,6	23,9	90,2
mit Katalase	75,0	75,6	73,5	69,5	73,0
Differenz	166,9	5,0	-30,9	-45,8	17,2

### 3.3 Blank-Werte

Der Mittelwert ( $\pm$ SD) aller Absorptionsmessungen betrug  $91,1 \pm 35,05$ . Die Standardabweichung lag demzufolge vergleichsweise hoch. Daneben fiel ein sprunghafter Anstieg der Absorption am 09.02.97 auf 132 auf. Die weiteren Messungen zeigten hohe Absorptionen am 25.02 und 05.03.97, sowie am 25. und 26.03.97 (Abb. 1). Eine Ursache für diese Phänomene konnte nicht gefunden werden. Maßnahmen wie Reagenzienwechsel, Wechsel des destillierten Wassers, tägliches Ansetzen einzelner oder mehrerer Reagenzien vermochten nicht die Schwankungen der Blankabsorptionen abzustellen. Es musste davon ausgegangen werden, dass es sich um methodologisch bedingte Schwankungen handelte.

Korrelationen zwischen den Absorptionen der Standardreihen und dem Blank bestätigten sich nicht (Tab. 3, Abb. 2-9). Hieraus konnte gefolgert werden, dass die Methode Messwerte lieferte, die unabhängig von den starken Schwankungen der Blank-Proben waren.

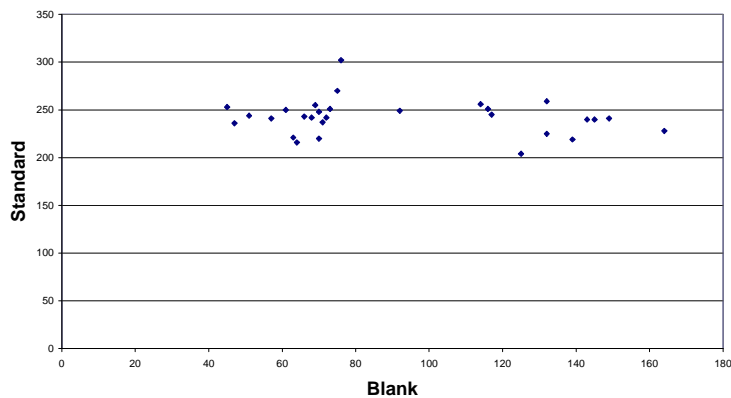
**Abb. 1:** Verlauf der Blank-Werte gegen die Zeit



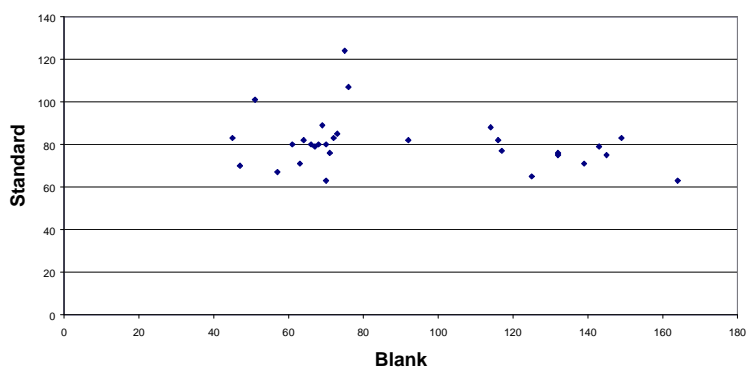
**Tabelle 3:** Korrelationskoeffizienten zwischen den Absorptionen der Blankproben und den Absorptionen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Standards

Standard (µM)	12,5	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062
Blank	-0,20	-0,26	-0,18	-0,17	-0,01	0,04	0,11	-0,09

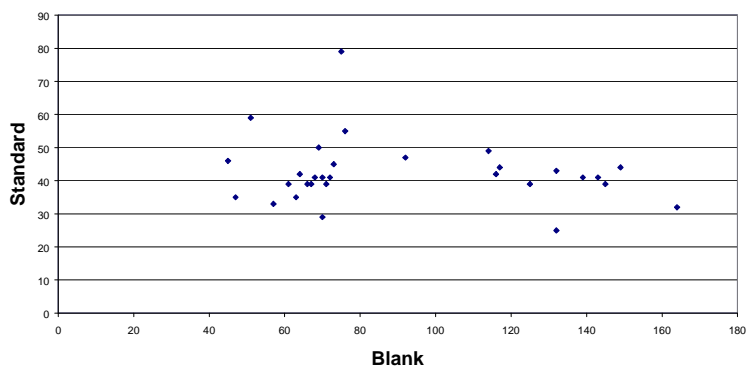
**Abb.2:** Absorption des 12,5 µM-Standards vs. Absorption der Blank-Proben



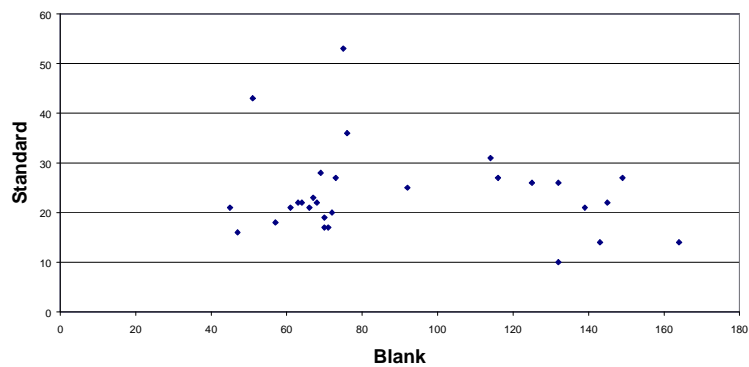
**Abb.3:** Absorption des 4 µM-Standards vs. Absorption der Blank-Proben



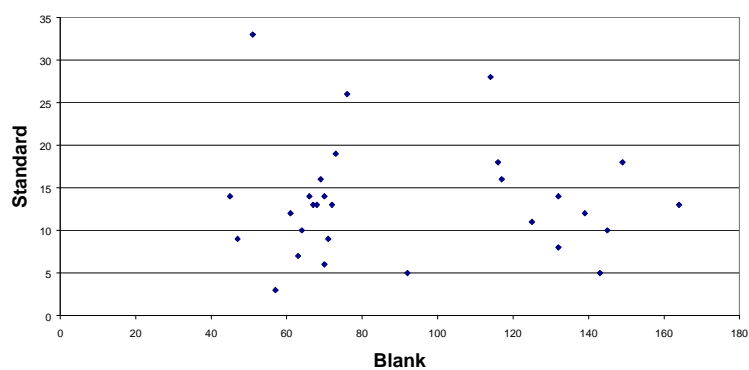
**Abb.4:** Absorption des 2 µM-Standards vs. Absorption der Blank-Proben



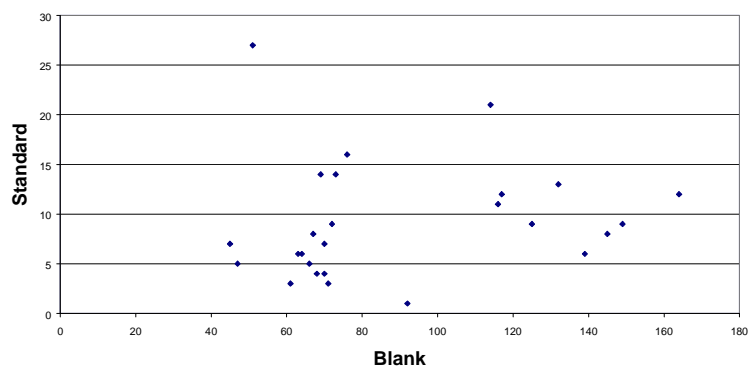
**Abb.5: Absorption des 1  $\mu\text{M}$ -Standards vs. Absorption der Blank-Proben**



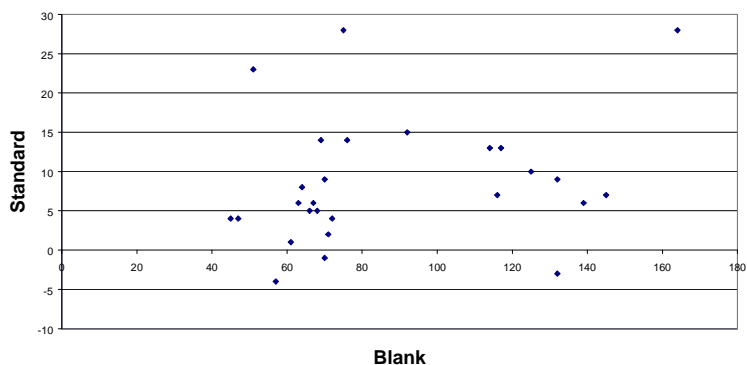
**Abb.6: Absorption des 0,5  $\mu\text{M}$ -Standards vs. Absorption der Blank-Proben**



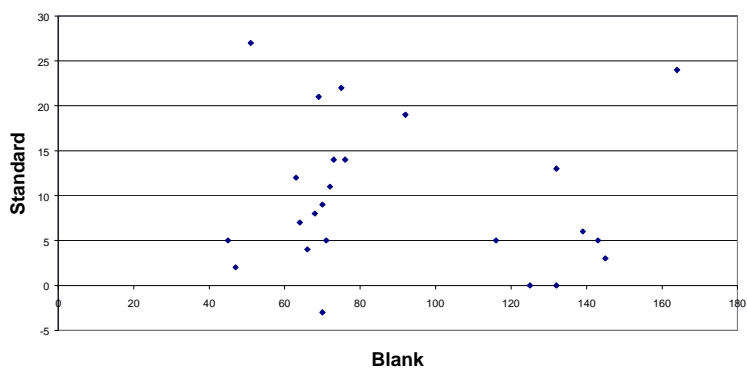
**Abb.7: Absorption des 0,25  $\mu\text{M}$ -Standards vs. Absorption der Blank-Proben**



**Abb.8: Absorption des 0,125 µM-Standards vs. Absorption der Blank-Proben**



**Abb.9: Absorption des 0,062 µM-Standards vs. Absorption der Blank-Proben**



### 3.4 Kontrollstandards

Die Messungen der Kontrollstandards ergaben für die definierte Konzentration von 4 µmol/l einen Mittelwert ( $\pm$ SD) von  $4,0 \pm 0,30$  µmol/l.

### 3.5 Beziehung Absorption / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in Patientenproben

Der Korrelationskoeffizient zwischen der pro Messung bestimmten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration der Patientenproben und dem Absolutwert der Absorption dieser Proben betrug  $-0,12$ . Dieses Ergebnis spiegelt das von Messung zu Messung stark unterschiedliche Niveau der Absorption wider und unterstreicht die Notwendigkeit der in der Studie verfolgten Methode, pro Messung eine eigene Standardkurve zu erstellen.

## 3.6 Ergebnisse der Kontrollgruppe

### 3.6.1 Charakteristika

Die Kontrollgruppe umfasste 9 Probanden (w/m: 5/4). Anamnestisch wurden Allergien, Asthma bronchiale, Bronchiektasen sowie obstruktive Lungenerkrankungen ausgeschlossen. Eine normale Lungenfunktion war Voraussetzung zur Aufnahme in die Kontrollgruppe. Das Alter betrug im Mittel (Bereich) 33,3 (23-48) Jahre. Die Probanden der Kontrollgruppe litten in den 14 Tagen vor der Messung nicht an einem Infekt des Nasen-Rachenraumes, des Bronchialsystems oder der Lunge. Keiner der Probanden nahm inhalative oder orale Steroide zu sich. Auch wurden keine inhalativen Beta-2-Sympathomimetika, Theophyllinpräparate oder Anticholinergika benutzt.

### 3.6.2 Messwerte

Die im Mittel ( $\pm$ SD) gemessene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration betrug  $0,31 \pm 0,22 \mu\text{M}$  (Tab. 4). Die Wiederholungsmessungen machten die intraindividuellen Schwankungen deutlich, mit Abweichungen vom individuellen Mittelwert, die zwischen 0,03 und 0,14  $\mu\text{M}$  rangierten.

**Tabelle 4:**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen der Kontrollgruppe

Datum	Pat.Nr.	Messung	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	individuelle Mittelwertabweichung
10.02.97	9	1	0,00	
12.02.97		2	0,07	0,03
11.03.97	10	1	0,37	
10.02.97	12	1	0,00	
12.02.97	42	1	0,12	
12.03.97		2	0,36	0,12
12.02.97	43	1	0,35	
27.03.97		2	0,25	0,05
11.03.97	44	1	0,56	
12.03.97		2	0,29	0,14
12.03.97	45	1	0,50	
18.03.97		2	0,65	0,08
12.03.97	46	1	0,40	
17.03.97		2	0,63	0,11
20.03.97	52	1	0,00	
26.03.97	3	1	0,35	
Mittelwert			0,31	
Standardabweichung			0,22	



### 3.7 Ergebnisse der Patienten mit Asthma

#### 3.7.1 Charakteristika der Patienten mit Asthma

Es wurden 8 Patienten (m/w: 2/6) mit Asthma bronchiale untersucht (Tab. 5). Eine Unterscheidung der Patienten in solche mit allergischem Asthma und solche mit nicht-allergischem Asthma erfolgte aufgrund der kleinen Fallzahl nicht. Alle Patienten wurden aus dem stationären Betrieb des Krankenhauses Großhansdorf rekrutiert. Die Diagnosen wurden von Pneumologen erstellt, die nicht in die Studie involviert waren.

Alle Patienten litten an einer akuten Exazerbation ihrer Erkrankung bei der stationären Aufnahme und wurden im Verlauf ihrer stationären Behandlung in die Studie aufgenommen. Das Alter betrug im Mittel (Bereich) 40 (17-50) Jahre. Der mittlere Wert von  $FEV_1\%VC_{max}$  war mit 55,9 % deutlich erniedrigt. Bei zwei Patienten fand sich eine Leukozytose ( $>10,5 /\mu l$ ) im peripheren Blutbild. Alle Patienten dieser Gruppe benutzten inhalative Beta-2-Sympathikomimetika. Nur die Patienten Nr. 37 und 54 erhielten keine systemisch wirksamen Cortisonpräparate. Ausser Pat. Nr. 48, der erst bei seiner letzten Messung mit einem Cortisonspray inhalierte, setzten alle Patienten während aller Messungen ein topisches Steroid ein. Theophyllin erhielten 6 von 8 Patienten.

Die folgende Tabelle gibt die individuellen Charakteristika der Patienten einschließlich der broncholytisch und antientzündlich wirksamen Medikamente wider.

**Tabelle 5: Charakteristika der Patienten mit Asthma bronchiale**

Pat. Nr.	Messung	Datum	FEV <sub>1</sub> (l)	FEV <sub>1</sub> /VC <sub>max</sub> (%)	BSG (mm/h)	Leukozyten (/μl)	Medikamente
30	1	29.01.97	1,44	60,3	15	6,4	A, BR, D, P, S, Sa, Su
	2	30.01.97					A, BR, D, P, S, Su
32	1	27.01.97	0,76	42,2	10	9,2	Br, BR, D, P, So, V
34	1	27.01.97	3,4	69,6	11	11,4	A, Be, BR, D, P, S, Su
	2	29.01.97					A, Be, BR, D, P, S, Su
	3	30.01.97					A, Be, BR, D, P, S, Su
	4	31.01.97					A, Be, BR, D, P, S, Su
	5	03.02.97					A, Be, BR, D, P, S, Su
	6	05.02.97	2,32				50,3
37	1	03.02.97	2,33	72,9	7	7,6	Be, BR, P, PT
	2	05.02.97					Be, BR, P, PT
39	1	07.02.97	1,16	48	8	7,1	A, Bs, D, F, S, Su, Th
	2	09.02.97					A, Bs, D, F, S, Su, Th
	3	10.02.97	1,32	56,8			9,2
48	1	17.03.97	1,5	42,8		12,3	Be, BR, D,
	2	18.03.97					Be, BR, D
	3	20.03.97	0,9	39,1			Be, BR, D
	4	25.03.97	1,2	42,8			A, Be, BR, D, F, PT, S
51	1	20.03.97	3,0	70,9		9,5	Al, Br, D F,
54	1	25.03.97	1,4	65,5	29	13,6	Bd, F, S
	2	27.03.97	1,72	65,4			Be, F, S

A = Atrovent (Ipratropium), Al = Allergospasmin (Cromoglicin + Reproterol), Bd = Berodual (Ipratropium + Fenoterol), Be = Berotec (Fenoterol), BR = Bronchoretard (Theophyllin), Br = Bronchospasmin (Reproterol), Bs = Bronchospray (Salbutamol), D = Decortin H (Prednisolon), F = Flutide (Fluticason), P = Pulmicort (Budesonid), PT = Pulmicort-Topinasal (Budesonid), Sa = Salbutamol (Salbutamol), S = Serevent (Salmeterol), So = Solosin (Theophyllin), Su = Sultanol (Salbutamol), Th = Theophyllin retard (Theophyllin), V = Volmac (Salbutamol)

### 3.7.2 Messwerte der Patienten mit Asthma

Der mittlere ( $\pm$ SD) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration betrug  $0,72 \pm 0,54 \mu\text{M}$  (Tab. 6). Die Wiederholungsmessungen spiegelten die intraindividuellen Schwankungen wider, mit Abweichungen vom individuellen Mittelwert zwischen 0,08 und 0,53  $\mu\text{M}$ .

**Tabelle 6:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen der Patienten mit Asthma

Pat.Nr.	Datum	Messung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	individuelle Mittelwertabweichung
30	30.01.97	1	1,28	
32	27.01.97	1	1,08	
34	27.01.97.	1	0,76	
	30.01.97	2	1,26	
	31.01.97	3	1,69	
	05.02.97	4	0,84	0,34
	05.02.97	1	1,13	
37	07.02.97	1	1,26	
	09.02.97	2	0,08	
	10.02.97	3	0,08	0,53
	17.03.97	1	0,44	
48	18.03.97	2	0,50	
	20.03.97	3	0,00	
	25.03.97	4	0,00	0,23
	20.03.97	1	0,00	
51	26.03.97	1	0,97	
	27.03.97	2	0,82	0,08
Mittelwert			0,72	
Standardabweichung			0,54	

### 3.7.3 Einzelverläufe

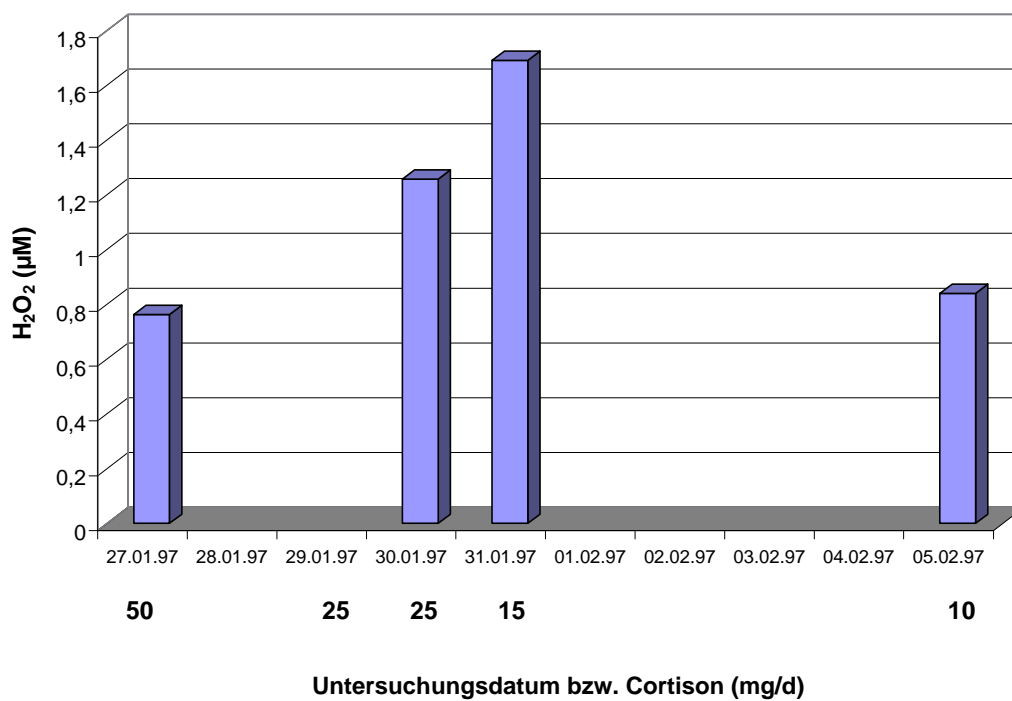
#### 3.7.3.1 Einzelverlauf bei Patient Nr. 34

Patient Nr. 34 (Abb. 10) wurde wegen einer Exazerbation stationär behandelt und erhielt zunächst für 4 Tage 100 mg Cortison p.o. tgl.. Es erfolgte eine stufenweise Reduktion auf 50 mg (27.01.97), 25 mg (29.01.97), 15 mg (31.1.97) und schließlich auf 10 mg (05.02.97) Cortison tgl. Die weitere Medikation bestand während aller Messungen aus Serevent DA (4x2 Söge), Pulmicort DA (4x2 Söge), Berotec DA (b. Bdf.), Feucht-Inhalation mit Sultanol und Atrovent (4xtgl.), Theophyllin-Kps. (350-0-500 mg).

Die Reihe der Messwerte begann mit einer relativ niedrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,76 µM (27.01.97) (Abb. 10). Diese stieg unter Cortisonreduktion an auf maximal 1,69 µM (31.01.97). Unter weiterer Reduktion fiel der Spiegel dann auf 0,84 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (05.02.97). Die Lungenfunktion erbrachte zunächst (27.01.97) eine mittelgradige Obstruktion, die dann (05.02.97) nur noch am Kurvenverlauf im Fluss/Volumen-Diagramm sichtbar war. Der PaO<sub>2</sub>-Wert lag anfangs (27.01.97) bei 67,7 und stieg im Verlauf (07.02.97) auf 74,1 mm Hg an. In der Sputumzytologie (30.01.97) wurden vermehrt Eosinophile und Charcot-Leyden-Kristalle gesehen. Die

mikrobiologische Aufarbeitung des Sputum am 29.01.97 erbrachte das Wachstum von *Staphylococcus aureus*.

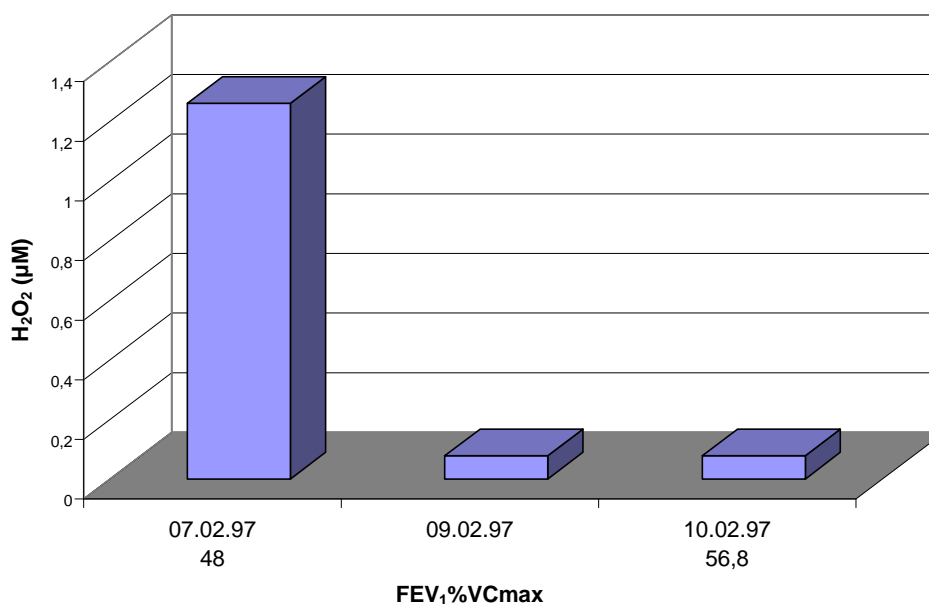
**Abb.10: Einzelverlauf Pat.Nr. 34**



### 3.7.3.2 Einzelverlauf bei Patient Nr. 39

Patientin Nr. 39 (Abb. 11) wurde wegen einer Exazerbation aufgenommen. Sie war zeitlebens Nichtraucherin. Die Leukozyten stiegen von 7,1 / $\mu$ l (7.02.97) auf 9,2 / $\mu$ l (10.02.97) leicht an. Die BSG war mit 8 mm/h (7.02.97) nicht erhöht. Die medikamentöse Behandlung bestand während aller Messungen aus Decortin H 50 mg 1x tgl., Flutide DA 2x2 Söge, Serevent 2x2 Söge, Bronchospray b.Bdf. und einer Feuchtinhalation mit Sultanol und Atrovent. Zum Zeitpunkt der ersten Messung war bereits eine 7-tägige Cortisontherapie (50 mg/d) erfolgt. Die Lungenfunktion verbesserte sich unter dieser Therapie und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spiegel fielen parallel dazu.

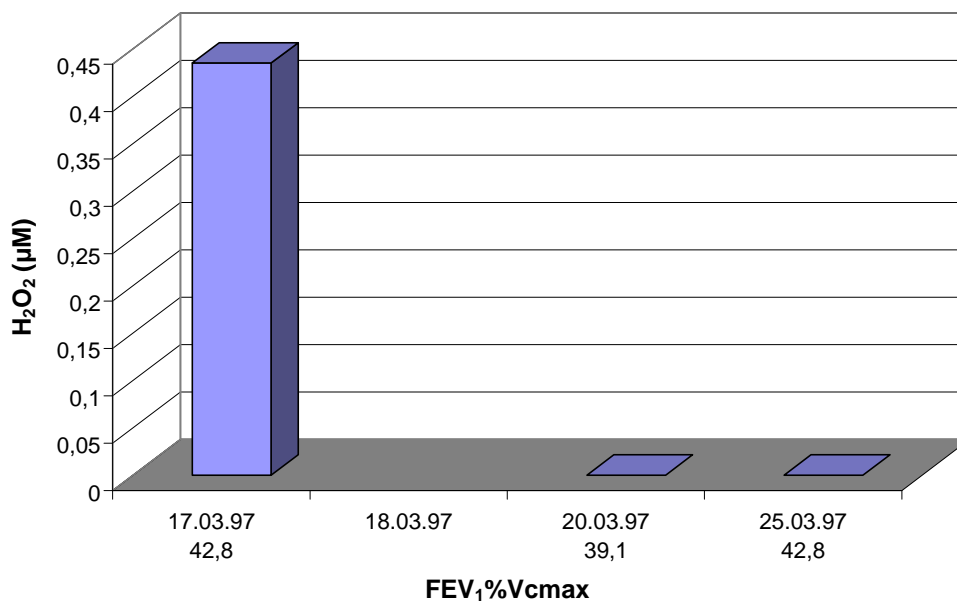
**Abb.11: Einzelverlauf Pat.Nr. 39**



### 3.7.3.3 Einzelfverlauf bei Patient Nr. 48

Patient Nr. 48 (Abb. 12) wurde wegen einer Exazerbation aufgenommen. Die Leukozyten waren mit 12,3 / $\mu$ l (17.03.97) erhöht. Anfangs (17.03.97) verabreichte sich der Patient bis zu 20x2 Hübe Berotec. Während des Aufenthaltes reduzierte sich der Gebrauch von Berotec auf 8x2 Hübe tgl. (25.03.97). Ausserdem wurde die Medikation ergänzt durch Flutide 2x2 Söge (25.03.97) und Serevent 2x2 Söge (25.03.97). Die Einnahme von Theophyllin 2x350 mg p.o., die Anwendung von Atrovent 4x1 Hub und von Pulmicort Topinasal 2x2 Söge (25.03.97) war während aller Messungen unverändert. Die Cortisondosis konnte von anfangs 50 mg auf 30 mg tgl. (25.03.97) reduziert werden. Die klinische Besserung drückte sich zwar in der Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werte aus, da ausgehend von 0,44  $\mu$ M (17.03.97), die weiteren Messungen (20.03.97, 25.03.97) kein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mehr nachweisen konnten, nicht aber in den Lungenfunktionswerten, die keine signifikante Besserung zeigten.

**Abb.12: Einzelfverlauf Pat.Nr. 48**



### 3.8 Ergebnisse der Patienten mit COPD

#### 3.8.1 Charakteristika

An der Studie nahmen 10 Patienten teil (w/m: 1/9). Alle Patienten wurden aus dem stationären Betrieb des Krankenhauses Großhansdorf rekrutiert. Die Diagnose war von unabhängigen Pneumologen gestellt. Alle Patienten litten unter einer akuten Exazerbation bei der stationären Aufnahme und wurden im Verlauf ihrer Behandlung in die Studie eingeschlossen. Das Alter der Patienten betrug im Mittel (Bereich) 62,9 (48-83) Jahre. Der Wert des  $FEV_1\%VC_{max}$  lag im Mittel bei 38,8 %.

Bei 6 Patienten konnte eine Leukozytose im peripheren Blutbild festgestellt werden. Alle Patienten wurden mit inhalativen und 9 Patienten mit oralen Cortisonpräparaten behandelt. Nur Patient Nr. 31 nahm kein orales Steroid ein. Alle Patienten benutzten Beta-2-Sympathomimetika inhalativ, 8 setzten regelmäßig Ipratropiumbromid inhalativ ein. Alle Patienten wurden mit oralen Theophyllinpräparaten behandelt. Patient Nr. 25 erhielt bis zum Vortag der  $H_2O_2$ -Messungen Antibiotika, die Patienten Nr. 28 und 41 wurden während der Studie antibiotisch behandelt. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 1 Gelegenheitsraucher (Patient Nr. 40), 1 Raucher (Patient Nr. 38) und 8 Exrauchern zusammen. 2 Patienten (Nr. 26, Nr. 27) wurden dauerhaft, 1 Patient (Nr. 28) intermittierend mit nasaler Sauerstoffgabe behandelt. Einer der beiden dauerhaft mit Sauerstoff versorgten Patienten (Nr. 27) wurde zusätzlich nichtinvasiv beatmet. Bei Pat.Nr. 25 wurde zusätzlich ein Bronchialkarzinom diagnostiziert.

**Tabelle 7: Charakterika der Patienten mit COPD**

Pat.Nr	Datum	FEV <sub>1</sub> (l)	FEV <sub>1</sub> /V <sub>Cmax</sub> (%)	BSG (mm/h)	Leukozyten (/µL)	Medikamente		
24	17.12.96	1,08	41,4	2	8,1	A, Ae, BR, D, P		
	18.12.96					A, Ae, BR, D, P		
	19.12.96	1,36	36,1			A, Ae, BR, D, P		
25	17.12.96	1,00	34,6	90	9,7	A, BR, D,Su, P,		
	18.12.96	0,88	35,8			A, BR, D,Su, P,		
	19.12.96					10,3	A, BR, D,Su, P,	
	06.01.97	1,04	26,2			A, BR, D,Su, P,		
	07.01.97	0,96	28,9			A, BR, D,Su, P,		
	10.01.97					A, BR, D, F, Su, P,		
	13.01.97					A, BR, D, F, Su, P,		
26	06.01.97	1,16	31,1	36	8,5	A, Bc, BR, Bs, D, Su,		
	07.01.97	1,36	39,8			A, Bc, BR, Bs, D, Su,		
	10.01.97					A, Bc, BR, Bs, D, Su,		
	13.01.97					A, Bc, BR, Bs, D, Su,		
	14.01.97					A, Bc, BR, Bs, D, Su,		
	15.01.97					A, Bc, BR, Bs, D, Su,		
	17.01.97					11,0	A, Bc, BR, Bs, D, Su,	
31.01.97	A, Bc, BR, Bs, D, Su,							
27	16.01.97	0,6	28,6	32	16,3	A, BR, Bs, D, F, S		
	17.01.97	0,76	31,1			33	8,4	A, BR, Bs, D, F, S
13.01.97	A, BR, D, F, Su							
14.01.97	A, BR, D, F, Su							
15.01.97	8,8			A, BR, D, F, Su				
16.01.97	A, BR, D, F, Su							
17.01.97	10,5			A, BR, D, F, Su				
29	16.01.97			1	30			5
	17.01.97	1,32	39,1	Ae, BR, D, P				
	27.01.97			18,7	Ae, BR, D, P			
	29.01.97			1,24	37,7	Ae, BR, D, P		
	30.01.97			Ae, BR, D, P				
31	06.01.97	1,44	39,7	4	7,8	Bd, BR, P, S		
	07.01.97	2,12	48,4			Bd, BR, P, S		
	10.01.97					Bd, BR, P, S		
	14.01.97					Bd, BR, P, S		
38	03.02.97	0,76	39,7	10	7,8	A, Bd, BR, D, F, Su,		
	05.02.97	0,64	34,5			A, Bd, BR, D, F, Su,		
	07.02.97					A, Bd, BR, D, F, Su,		
	09.02.97					A, Bd, BR, D, F, Su,		
40	10.02.97	0,64	34,5	10	7,8	A, Bd, BR, D, F, S,		
	07.02.97	1,56	49,2			Su,		
41	09.02.97	1,72	52,1	11	15,5	A, Bd, BR, D, F, S,		
	07.02.97	1,21	52,7			Su,		
	09.02.97	1,32	58,4			A, Bd, BR, D, F, S,		
						Su,		

A = Atrovent (Ipratropium), Ae = Aerodur (Terbutalin), Bd = Berodual (Ipratropium + Fenoterol), BR = Bronchoretard (Theophyllin), Bs = Bronchospray (Salbutamol), D = Decortin H (Prednisolon), F = Flutide (Fluticason), P = Pulmicort (Budenosid), s = Serevent (Salmeterol), Su = Sultanol (Salbutamol)



### 3.8.2 Messwerte

**Tabelle 8:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen der Patienten mit COPD

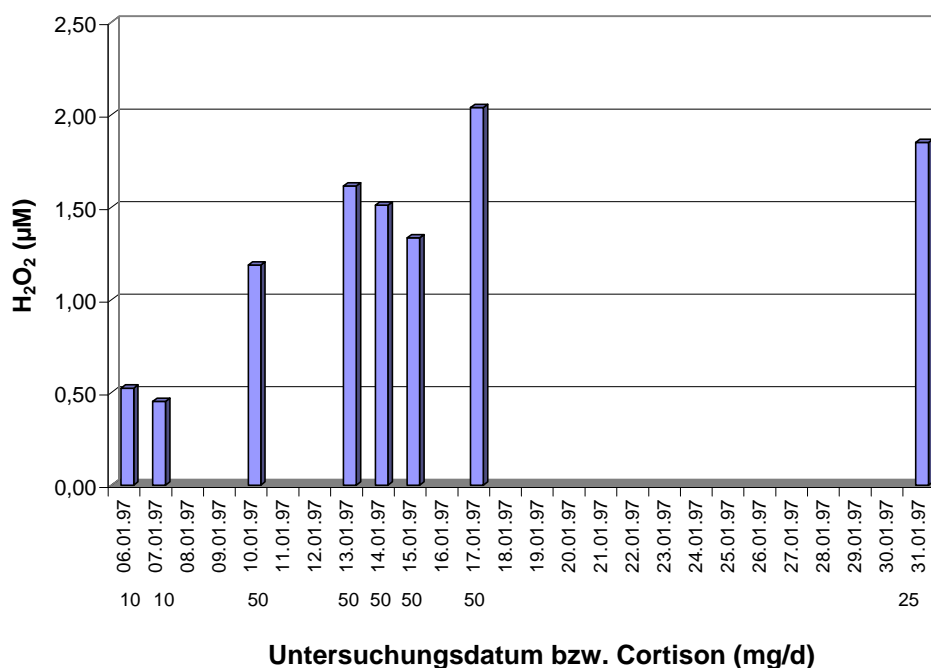
Pat.Nr.	Datum	Messung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	individuelle Mittelwertabweichung
24	17.12.96	1	0,63	0,13
	18.12.96	2	0,23	
	19.12.96	3	0,44	
25	17.12.96	1	0,74	0,24
	18.12.96	2	0,77	
	19.12.96	3	0,35	
	06.01.97	4	0,13	
	07.01.97	5	0,13	
	10.01.97	6	0,77	
	13.01.97	7	0,53	
26	06.01.97	1	0,52	0,45
	07.01.97	2	0,45	
	10.01.97	3	1,19	
	13.01.97	4	1,62	
	14.01.97	5	1,51	
	15.01.97	6	1,34	
	17.01.97	7	2,04	
	31.01.97	8	1,85	
27	17.01.97	1	0,96	0,18
28	13.01.97	1	0,17	
	14.01.97	2	0,32	
	15.01.97	3	0,50	
29	17.01.97	4	0,71	0,22
	17.01.97	1	0,79	
	27.01.97	2	1,35	
31	30.01.97	3	0,92	0,24
	06.01.97	1	0,13	
	07.01.97	2	0,22	
	10.01.97	3	0,79	
40	14.01.97	4	0,50	0,56
	07.02.97	1	1,86	
41	09.02.97	2	0,74	0,58
	07.02.97	1	1,16	
	09.02.97	2	0,00	
Mittelwert			0,77	
Standardabweichung			0,54	

Die mittlere ( $\pm$ SD) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration betrug  $0,77 \pm 0,54$  µM. Die Wiederholungsmessungen spiegelten die intraindividuellen Schwankungen wider, mit Mittelwertabweichungen zwischen 0,13 und 0,58 µM.

### 3.8.3 Einzelverlauf bei Patient Nr. 26

Patient Nr. 26 (Abb. 13) erlitt während seines stationären Aufenthaltes eine Exazerbation, die sich vor allem durch eine klinische Befundverschlechterung ausdrückte. Die Leukozyten stiegen von 8,5 / $\mu$ l auf 11,0 / $\mu$ l an. Die Exazerbation spiegelte sich nicht in den Lungenfunktionsmessungen (FEV<sub>1</sub>%VC<sub>max</sub> 31,1 % (06.01.97) und 39,8 % (17.01.97)) wider. Die Medikation bestand aus einem inhalativen Steroid (2x2 Hub tgl.), einem inhalativen Beta-2-Sympathomimetikum (b.Bdf.), einer Feuchtinhalation mit einem Betasympathomimetikum und Ipratrobiumbromid (4xtgl.), Theophyllin p.o. (350 mg 2xtgl.) und Cortison p.o. (06.01.-09.01.97: 10 mg tgl.; 10.01.-17.01.97: 50 mg tgl.; ab 31.01.97: 25 mg tgl.). Ungeachtet einer Erhöhung der Cortisondosis kam es zu einem deutlichen Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Exhalat.

**Abb.13: Einzelverlauf Pat.Nr. 26**



### **3.9 Ergebnisse der Patienten mit Bronchiektasen**

#### **3.9.1 Charakteristika**

An der Studie nahmen 6 Patienten (w/m: 3/3) mit Bronchiektasen teil. Das mittlere Alter (Bereich) der Patienten betrug 56 (18-74) Jahren. Unter den Patienten befanden sich 4 Nichtraucher, 1 Exraucher (Patient Nr. 47) sowie 1 Raucher (Patient Nr. 49). Alle Patienten wurden aus dem stationären Betrieb des Krankenhauses Großhansdorf rekrutiert. Die Diagnose wurde von unabhängigen Pneumologen gestellt. Alle Patienten litten an einer Exazerbation ihrer Krankheit bei der stationären Aufnahme und wurden im Verlauf ihrer stationären Behandlung in die Studie aufgenommen. Der mittlere Wert von  $FEV_1\%V_{C_{max}}$  lag bei 67,0 %.

Bei 3 Patienten fand sich eine Erhöhung der BSG. Im peripheren Blutbild eines Patienten konnte eine Leukozytose festgestellt werden. 4 Patienten benutzten regelmäßig ein inhalatives Cortisonpräparat, 2 Patienten wurden mit oralen Steroiden behandelt. Inhalative Beta-2-Sympathomimetika wurden von allen Patienten angewendet. Mit Ausnahme von Patient Nr. 47 wendeten alle Ipratropium inhalativ an. Theophyllinpräparate wurden von 2 Patienten eingenommen, 3 Patienten wurden antibiotisch behandelt, in zwei Fällen mit einer gentamicinhaltigen Inhalation (Patient Nr. 33 und 36); in einem weiteren Fall (Patient Nr. 47) wurde mit einer oralen Therapie am Tag der letzten Messung (25.03.97) begonnen. Patient Nr. 36 wurde zusätzlich zur inhalativen Therapie auch systemisch antibiotisch behandelt.

**Tabelle 9: Charakteristika der Patienten mit Bronchiektasen**

Pat. Nr.	Datum	Messung	FEV <sub>1</sub> (l)	FEV <sub>1</sub> /VC <sub>max</sub> (%)	BSG (mm/h)	Leukozyten (/µl)	Medikamente
33	30.01.97	1		54,7	22	9,8	A, Ae, D, P, Su
	31.01.97	2	0,64				A, Ae, D, P, Su
35	27.01.97	1	1,64	52,2		13,2	A, Bd, D, P, Su, Th
	29.01.97	2					A, Bd, D, P, Su, Th
36	31.01.97	1	1,01	49,6	3	6,3	A, Bd, BR, P, Su, Th
	03.02.97	2	1,2	55,8			A, Bd, BR, P, Su, Th
	05.02.97	3					A, Bd, BR, P, Su, Th
47	17.03.97	1	1,8	70,5	38	5,6	Su
	18.03.97	2					Su
	19.03.97	3					Su
	20.03.97	4					Su
	25.03.97	5	1,8	69,8			Su
49	18.03.97	1	2,34	55,2	18	6,6	A, At, Su
	19.03.97	2	2,4	54			A, At, Su
50	18.03.97	1	4,96	87,1	1	5,2	A, Su
	19.03.97	2					A, Su
	20.03.97	3					A, Su
	25.03.97	4					A, Su

A = Atrovent (Ipratropium), Ae = Aerodur (Terbutalin), At = Atemur (Fluticason), Bd = Berodual (Ipratropium + Fenoterol), BR = Bronchoretard (Theophyllin), D = Decortin H (Prednisolon), P = Pulmicort (Budesonid), Su = Sultanol (Salbutamol), Th = Theophyllin (Theophyllin)

### 3.9.2 Messwerte der Patienten mit Bronchiektasen

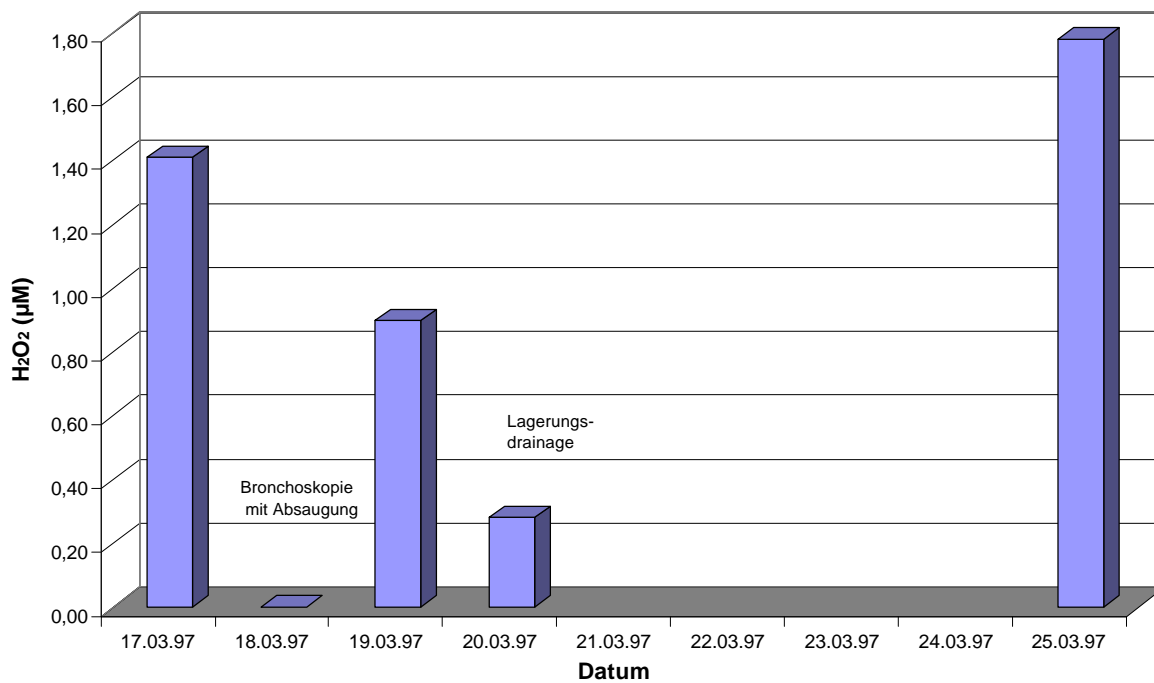
Die mittlere ( $\pm$ SD) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration betrug  $1,21 \pm 1,52$  µM. Die Wiederholungsmessungen zeigten intraindividuelle Schwankungen mit Abweichungen vom Mittelwert zwischen 0,12 bis 1,21 µM.

**Tabelle 10:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen der Patienten mit Bronchiektasen

Pat.Nr.	Datum	Messung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	individuelle Mittelwertabweichung
33	30.01.97	1	3,77	
	31.01.97	2	6,20	1,21
35	27.01.97	1	1,10	
36	31.01.97	1	1,00	
	05.02.97	2	0,76	0,12
47	17.03.97	1	1,41	
	18.03.97	2	0,00	
	19.03.97	3	0,90	
	20.03.97	4	0,28	
	25.03.97	5	1,78	0,59
49	18.03.97	1	0,92	
	19.03.97	2	0,52	0,20
50	18.03.97	1	0,33	
	19.03.97	2	0,66	
	20.03.97	3	0,00	
	25.03.97	4	0,63	0,24
53	26.03.97	1	1,48	
	27.03.97	2	0,00	0,74
Mittelwert			1,21	
Standardabweichung			1,52	

### 3.9.3 Einzelverlauf eines Patienten mit Bronchiektasen

Patient Nr. 47 (Abb. 14) wurde wegen einer Exazerbation stationär aufgenommen. Die Lungenfunktionswerte zeigten im Verlauf keine Änderungen (FEV<sub>1</sub>%VC<sub>max</sub> 70,5 % (17.03.97) und 69,8 % (25.03.97)). Die BSG war mit 38 mm/h (17.03.97) mäßig erhöht, während sich die Leukozytenzahl mit 5,6 /µl im Normbereich befand. Der PaO<sub>2</sub>-Wert stieg von 64,3 (17.03.97) auf 77,6 mm Hg (25.03.97) an. Der Patient war Ex-Raucher seit 11 Jahren. In einer Sputumprobe konnte *Haemophilus influenzae* nachgewiesen werden. Die medikamentöse Behandlung bestand aus einer Feuchtinhalation mit Sultanol (2x tgl.) und einer antibiotischen Therapie mit Ciprobay, die am 25.03.97 begonnen wurde. Am 18.03.97 erfolgte wenige Stunden vor der Exhalatgewinnung eine therapeutische Bronchoskopie mit ausgiebigen Absaugungen putriden Sekretes. Es konnte anschließend kein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mehr nachgewiesen werden. Die Messung vom 20.03.97 erfolgte nach einer effizient durchgeführten Lagerungsdrainage und erbrachte eine niedrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Exhalat.

**Abb.14: Einzelverlauf Pat.Nr. 47**

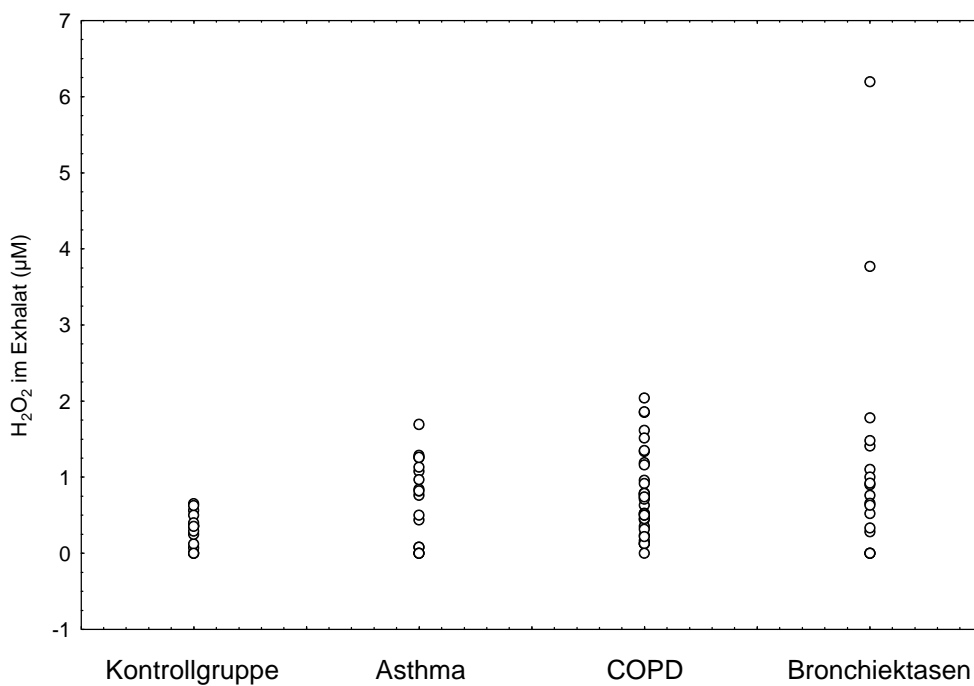
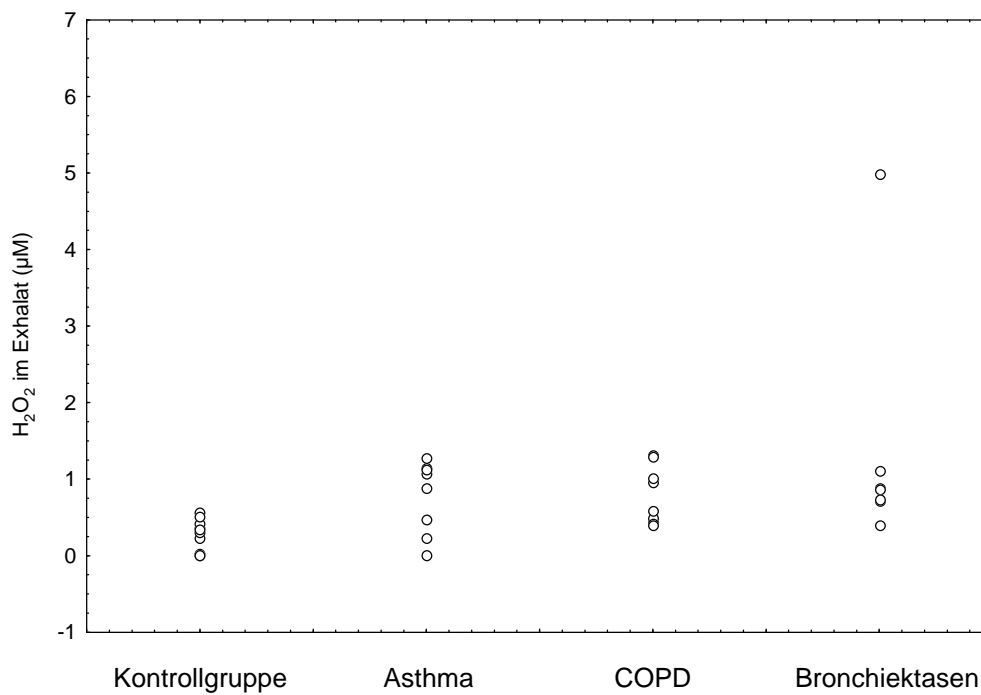
### 3.10 Statistischer Vergleich zwischen den Gruppen

Zur Veranschaulichung sind in Abb. 15 alle Messungen vergleichend aufgetragen. Die große Streubreite der Messungen ist zum einen anhand der Einzelwerte, zum anderen im Vergleich der interindividuellen Standardabweichungen sowie der Abweichungen der Einzelmessungen pro Patient vom individuellen Mittelwert zu erkennen. In Tab. 11 sind im Unterschied zu den bei der Einzeldarstellung der Gruppen gezeigten Werten die Mittel und Standardabweichungen der Mittelwerte pro Patient angegeben. Zum Vergleich sind die Streuungen innerhalb jedes Patienten dargestellt.

Es bestand ein signifikanter Unterschied ( $p=0,050$ ) zwischen den Werten der Kontrollgruppe (Mittelwert  $0,28 \mu\text{M}$ ) und der Patienten mit Asthma bronchiale (Mittelwert  $0,78 \mu\text{M}$ ; Abb. 16). Ebenso waren die Werte der Patienten mit COPD (Mittelwert  $0,77 \mu\text{M}$ ) von denen der Kontrollgruppe verschieden ( $p=0,0043$ ). Besonders ausgeprägt war der Unterschied zu den Werten der Patienten mit Bronchiektasen (Mittelwert  $1,39 \mu\text{M}$ ;  $p=0,0018$ ). Die Werte der Patienten mit Asthma oder COPD unterschieden sich aufgrund der Streuung nicht signifikant voneinander ( $p=1,0$ ) oder von den Werten der Patienten mit Bronchiektasen ( $p=0,91$  und  $p=0,63$ ).

**Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen (interindividuell) sowie Mittelwertabweichungen (intraindividuell) der Kontrollgruppe, Patienten mit Asthma oder COPD und der Patienten mit Bronchiektasen**

	Mittelwert $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	Standardabweichung (interindividuell)	Mittelwertabweichung (intraindividuell)
Kontrollgruppe	0,28	0,21	0,03 - 0,14
Asthma	0,78	0,48	0,08 - 0,53
COPD	0,77	0,38	0,13 - 0,58
Bronchiektasen	1,39	1,60	0,12 - 1,21

**Abb. 15:** Vergleichende Darstellung aller Einzelwerte**Abb. 16:** Pro Patient gemittelte Werte, die in den statistischen Vergleich Eingang fanden



## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen im Exhalat von Patienten mit Bronchiektasen, COPD oder Asthma bronchiale signifikant höher lagen als die Werte gesunder Kontrollpersonen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Asthma bronchiale und solchen mit COPD. Die höchsten Werte fanden sich bei Patienten mit Bronchiektasen. Auffällig war eine große Variabilität, die sich nicht in jedem Fall mit dem klinischen Verlauf oder therapeutischen Interventionen in Verbindung bringen ließ. Die entsprechenden Assoziationen schienen zum Teil auf zufälligen Koinzidenzen zu beruhen, auch wenn einige Übereinstimmungen mit einer vermehrten oder reduzierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion auffällig waren.

Exogen und endogen erzeugter oxidativer Stress wird als ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Atemwegserkrankungen angesehen. Daher besteht ein großes Interesse an invasiven und nichtinvasiven Methoden zur Diagnostik und zum Monitoring von entzündlichen Veränderungen der Atemwege. Zahlreiche Arbeiten der Vergangenheit beschäftigten sich mit der Fragestellung, ob Biomarker in der Lage sind, entzündliche Lungenerkrankungen ausreichend sensitiv und spezifisch zu beschreiben. Dies gilt insbesondere für vollständig nichtinvasive Methoden wie die Analyse der Ausatemluft. Mehrere Messgrößen wie exhalierendes Stickstoffmonoxid (NO), seine Metabolite oder Derivate wie Nitrit und Nitrat, Kohlenmonoxid (CO), Pentan und Äthan, TBARs (thiobarbituric acid-reactive substances) und auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  können im Exhalat bzw. Atemkondensat gemessen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Analysemethoden und der unterschiedlichen, meist kleinen untersuchten Populationen sind Vergleiche zwischen den Studien schwierig. Damit Biomarker in der täglichen klinischen Praxis zum Einsatz kommen können, sind genaue Charakterisierungen der Patienten, eine Standardisierung der Untersuchungsmethoden und Angaben zur Reproduzierbarkeit und Variabilität der Messwerte wünschenswert [van Beurden et al. 2002].

Alle Patienten der vorliegenden Studie wurden wegen einer Exazerbation ihrer Erkrankung stationär aufgenommen und im Verlauf ihrer Behandlung in die Studie aufgenommen. Zusätzlich zum Vergleich der Gruppen wurde anhand einiger Einzelverläufe ein Ausblick auf mögliche Zusammenhänge zwischen klinischem Zustand, medikamentöser, physikalischer oder invasiver Therapie, Laborparametern und

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werten versucht. Diese Darstellungen von Einzelverläufen wurden nicht mit dem Anspruch erhoben, erschöpfende Antworten zu liefern. Ihre Ergebnisse werfen allerdings Fragen bezüglich der Aussagekraft von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Entzündungsmarker auf. Bei der Charakterisierung der Patienten wurden, soweit vorhanden, Parameter wie die Leukozytenzahl im venösen Blut, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Körpertemperatur oder Sputumuntersuchungen, Bronchoskopien mit Sekretabsaugungen, Lagerungsdrainagen und Lungenfunktionsmessungen berücksichtigt.

Die Verlaufsbeobachtung eines Patienten mit Asthma bronchiale (Nr. 34) zeigte unter Medikation mit hochdosiertem systemischem Cortison relativ niedrige Messwerte, die unter Cortisonreduktion stiegen. Die übrige antiobstruktive Therapie wurde unverändert fortgeführt. Erst bei klinischer Besserung des Patienten, Verbesserung einer initial nachweisbaren Obstruktion und deutlich gebessertem Sauerstoffpartialdruck waren auch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werte rückläufig. Möglicherweise waren die anfänglichen niedrigen Werte auf die verabreichte hohe Cortisondosis und die ansteigenden Werte auf eine zu frühzeitig erfolgte Reduktion des Cortisons zurückzuführen.

Die Beziehung von Steroiden und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werten im Exhalat von Asthmatikern wurde in einer nachfolgenden Arbeit von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht. Ergebnis war, dass die Anwendung topischer Cortikoide die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Exhalat senkte, mit einem Abfall vom ersten Behandlungstag an und stagnierenden Werten ab dem 43. Behandlungstag [Antczak et al. 2000]. Fallende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spiegel unter einer Cortisontherapie dürften in erster Linie auf eine verminderte Eosinophilenaktivität zurückzuführen sein, da Eosinophile die dominierenden Zellen in allen Stadien des Asthmas sind [Loukides et al. 2002], Eosinophile größere Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bilden als Neutrophile [Shult et al. 1985] und Cortison ein potenter Inhibitor der durch Eosinophile ausgelösten Entzündungsreaktion ist. Cortison ist in der Lage, die Produktion, Rekrutierung, Aktivierung und teilweise auch das Überleben von Eosinophilen zu verringern [Barnes et al. 1998].

Während der Verlaufsmessungen eines anderen Asthmikers (Nr. 39) fielen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen unter systemischer Cortisontherapie. Parallel verbesserte sich die Lungenfunktion, ein Phänomen, das sich bei einer Verlaufsbeobachtung eines

weiteren Asthmatikers (Nr. 48) nicht nachweisen ließ, obwohl die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Werte auf Null gesunken waren.

Eine inverse Korrelation zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{FEV}_1\%$ Soll wurde in mehreren Arbeiten berichtet, so in einer Studie mit 21 Asthmatikern [Antczak et al. 1997], bei Asthmatikern, die nicht mit Steroiden behandelt wurden [Emelyanov et al. 2001] sowie bei Asthmatikern in stabilisiertem Zustand in leichten bis mittelschweren Krankheitsstadien [Loukides et al. 2002]. Derartige Beziehungen fanden sich, soweit auswertbar, in der vorliegenden Arbeit nicht.

Die Verlaufsbeobachtung eines Patienten mit COPD (Nr. 26) zeigte ansteigende  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Werte trotz einer Erhöhung der Cortisondosis, begleitet von ansteigenden Leukozytenzahlen im venösen Blutbild während Infektexazerbation. Die übrige medikamentöse Therapie blieb während aller Messungen unverändert. Die klinische Befundverschlechterung kam in der Lungenfunktion nicht zum Ausdruck. Diese Beobachtung wirft die Frage nach der Wirkung von Cortison auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion bei Patienten mit COPD auf.

Da sich die Entzündungsmuster zwischen COPD und Asthma deutlich unterscheiden, wären unterschiedliche Auswirkungen eines Medikamentes auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Exhalat denkbar. Bei der COPD dominieren Makrophagen, Neutrophile und CD8-positive T-Lymphozyten in den Atemwegen und im Lungenparenchym. Auch findet sich eine erhöhte Anzahl von Makrophagen und Neutrophilen im Sputum und der Bronchiallavage. Dagegen zeichnet sich das Asthma durch eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen und eine gesteigerte Aktivität von Mastzellen und CD4-positiven T-Lymphozyten aus. Auch das Zytokinmuster unterscheidet sich, mit einer Dominanz von IL-8 und  $\text{TNF-}\alpha$  bei der COPD und von IL-4, IL-5 sowie IL-13 beim Asthma. Cortison scheint weder die für die COPD relevanten Entzündungszellen noch die Konzentration der Zytokine nennenswert zu drosseln [Barnes et al. 1998].

Der drastische Abfall der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Werte bei einem Patienten mit Bronchiektasen (Nr. 47) könnte durch eine Bronchoskopie mit ausgiebigen Absaugungen putriden Sekretes, die einige Stunden vor der Untersuchung durchgeführt wurde, verursacht gewesen sein. Beim gleichen Patienten zeigte eine weitere Messung relativ niedrige

Werte; dies könnte mit einer effizient durchgeführten Lagerungsdrainage in Verbindung stehen.

Nach Literaturdaten hat die inhalative Anwendung von Cortikosteroiden bei Bronchiektasenkrankheit keinen Einfluss auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Exhalat [Loukides et al. 1998]. Denkbar ist, dass Antibiotika auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion der neutrophilen Granulozyten Einfluss nehmen könnten. Beispielweise kann Erythromycin die spontane  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion in neutrophilen Granulozyten *in vitro* unterdrücken. Neutrophile Granulozyten von Patienten mit Panbronchiolitis, die klinisch von einer Erythromycintherapie profitierten, bilden weniger  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Vergleich zu Patienten, die klinisch nicht von der Therapie profitieren [Matsumota et al. 1997]. Der Mechanismus scheint auf einer Downregulation der Expression des beta-2-Integrins auf neutrophilen Granulozyten zu beruhen; dies geht mit einer Drosselung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und IL-8-Produktion einher [Lin et al. 2000].

Insbesondere die Verlaufsbeobachtungen liessen klar werden, dass eine Vielzahl von Faktoren das Messergebnis beeinflusste. Einen Eindruck von den Messwertschwankungen, unabhängig von Medikamenten, physikalischer Therapie, Infekten der oberen und unteren Atemwege oder einer chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankung, vermittelten die Wiederholungsmessungen der Gesunden. Der niedrigste Messwert betrug 0 und der höchste 0,65  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die höchste Mittelwertabweichung einer Kontrollperson lag bei 0,14.

Im Vergleich der einzelnen untersuchten Gruppen zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe die Werte für Mittelwert, interindividuelle Standardabweichung und die intraindividuelle Mittelwertabweichung am niedrigsten waren. Umgekehrt fanden sich in der Gruppe mit Bronchiektasen die höchsten Werte. Patienten mit COPD und Asthma bronchiale unterschieden sich kaum bezüglich Schwankungsbreite und Mittelwerten (vgl. Tab. 11). Dies legt nahe, dass die Variabilität der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messung im wesentlichen der Höhe des Messwertes proportional war, unabhängig von der Frage, ob die Streuung methodologisch oder biologisch bedingt war.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Untersuchung an 20 Patienten mit leichtgradiger COPD im stabilem Zustand. Es wurde 3x tgl. Exhalat gewonnen und fluorometrisch untersucht. Einmalige Exhalatgewinnungen und Untersuchung folgten an den Tagen 1, 2, 3, 8 und 21. Der Variationskoeffizient der COPD-Gruppe

über einen Zeitraum von 21 Tagen unterschied sich nicht wesentlich von demjenigen der gesunden Kontrollgruppe (45 % vs. 43 %). Allerdings fand sich, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, auch keine Unterschied zwischen den Gruppen. Jedoch stieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel im Verlauf des Tages an, sowohl bei den Patienten mit COPD als auch bei den Gesunden [van Beurden et al. 2002]. Es steht zu vermuten, dass die erhöhte Standardabweichung der COPD-Gruppe im Vergleich zu den Gesunden in der vorliegenden Arbeit durch die Auswahl der Patientengruppe bedingt war. Alle Patienten wurden wegen einer Exazerbation stationär aufgenommen und im Verlauf ihrer Behandlung in die Studie eingeschlossen. Daher waren Änderungen des klinischen Zustandes unvermeidbar bzw. beabsichtigt. Es war ja gerade das Ziel der Einzelfallanalyse, Beziehungen zwischen derartigen Änderungen und solchen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zu finden.

Physiotherapeutische Maßnahmen scheinen ebenfalls Auswirkungen auf den oxidativen Stress bei Patienten mit COPD zu besitzen. So wurden bei derartigen Patienten, die sich einem Übungsprogramm unterzogen, signifikant erhöhte  $\text{O}_2^-$ -Werte gemessen [Couillard et al. 2002]. Ausserdem fand sich ein erhöhtes GSSG/GSH-Verhältnis bei Patienten mit COPD nach körperlichem Training im Vergleich zu Patienten mit COPD, die zuvor mit Allopurinol, einem Xanthinoxidase-Inhibitor, behandelt wurden. Es ist auch von anderen Erkrankungen, ebenso wie von Sportlern, wohlbekannt, dass körperliche Belastung eine oxidative Stress-Situation hervorruft.

Darüber hinaus konnten die Messungen in der vorliegenden Arbeit nicht zu definierten Tageszeiten durchgeführt werden, so dass circadiane Schwankungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion eine Rolle gespielt haben könnten. Derartige Schwankungen wurden wiederholt beschrieben und im Atemkondensat nachgewiesen [Jörres 2003, van Beurden et al. 2002].

Da auch rein methodologische Störfaktoren zu den Messwertschwankungen beitragen konnten, wurden eine Kontrollprobe, eine Standardkurve und ein Blank-Wert in jeder Messreihe mitgeführt. Die Standardabweichung der Kontrollprobe (4  $\mu\text{M}$ ) betrug 0,3  $\mu\text{M}$  und war damit akzeptabel. Die Standardkurven zeigten Probleme bei der Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen  $<0,5 \mu\text{M}$  auf, indem die Standardabweichung 7,11 Absorptionseinheiten betrug bei einer mittleren Absorption

von 12,97 Einheiten. Bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen  $<0,25 \mu\text{M}$  lag die Standardabweichung im Mittel sogar höher als der Absorptionsmittelwert. Daher war in den unteren Konzentrationsbereichen ( $0,5\text{-}0,062 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) von vornherein mit Variationskoeffizienten der Absorption von 55-130 % zu rechnen. Dies war deshalb problematisch, weil sich die meisten Werte im unteren Messbereich bewegten und eine Unterscheidung in normale und erhöhte Werte dadurch erschwert wurde. Im Verlauf fielen ebenfalls starke Schwankungen der Blank-Werte auf. Ungeachtet dessen lieferte die Methode Messwerte, die nicht von den unterschiedlichen Blank-Absorptionen beeinflusst waren, da diese nicht mit den Absorptionen des Standards korrelierten. Welche Faktoren die Schwankungen der Blank-Werte hervorgerufen haben ließ sich nicht eruieren. Insofern erwies sich die Entscheidung, in aufwendiger Weise für jede einzelne Messung eine eigene Eichkurve zu erstellen und damit das Problem der wechselnden Blank-Werte einzugrenzen, als vorteilhaft.

Die Nachweisgrenze des hier verwendeten Assays wurde ursprünglich von *Gallati & Pracht [1985]* zu ca.  $2 \mu\text{M}$  angegeben. Bemerkenswert ist, dass durch geeignete Wahl der Verdünnungen sowie weitere Standardisierung auch unterhalb dieses Wertes gemessen werden konnte, wie nachträglich durch die Tatsache belegt, dass signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden wurden. Vermutlich ist die Grenze für einen validen Nachweis mit dem verbesserten Verfahren bei ca.  $1 \mu\text{M}$  anzusetzen. Bei den Patienten, nicht jedoch den Gesunden lagen eine Vielzahl von Messungen oberhalb dieses Wertes (Abb. 15). Inzwischen sind Verfahren zum Nachweis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entwickelt worden, deren Sensitivität deutlich höher liegt, und der Einsatz von Biosensoren wird z.Z. erprobt. Insofern muss die vorliegende Arbeit als eine Pilotstudie angesehen werden, um mit den zur Zeit der Messungen im Labor zur Verfügung stehenden Verfahren eine mögliche Beziehung zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration und klinischem Zustand zu prüfen.

Als weiterer, möglicherweise auf die Messergebnisse Einfluss nehmender Faktor war die expiratorische Atemflussrate anzunehmen. In dieser Arbeit wurde das Exhalat gewonnen während einer 15 Minuten andauernden Ruheatmung, die nicht genauer spezifiziert war. In einer weiteren Arbeit [*Schleiss et al. 2000*] wurde die Abhängigkeit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von der expiratorischen Flussrate gezeigt. Hierzu wurde das Exhalat von 15 gesunden oder leichtgradigen Asthmatikern bei 3 verschiedenen Flussraten untersucht. Je niedriger die expiratorische Flussrate gewählt wurde, desto höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen wurden gemessen. Die

Abhängigkeit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von der expiratorischen Flussrate ist ein Indikator für seine Entstehung in den Bronchien, und nicht den Alveolen. Auch diese Arbeit fand trotz Standardisierung eine hohe Variabilität, die den Einsatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Marker für Atemwegsentzündungen begrenzte. Ferner wurde klar, dass die Flussabhängigkeit nur bei sehr niedrigen Ausatemraten zutage tritt, die bei normaler Ruheatmung eine verschwindend geringe Rolle spielen. Daher kann man davon ausgehen, dass die Messungen der vorliegenden Arbeit nicht durch die Flussabhängigkeit gestört waren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die vorliegende Arbeit höhere Konzentrationen des ausgeatmeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Patienten mit entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Bronchiektasen, COPD oder Asthma bronchiale im Vergleich zu Gesunden zeigte. Eine Differenzierung zwischen den Erkrankungen war jedoch nur insofern möglich, als extreme Werte sich nur bei Patienten mit Bronchiektasen fanden. Dies ist vermutlich durch die massive Neutrophilie zu erklären. Eine im eigentlichen Sinne spezifische Zuordnung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion zu den Krankheiten gelang nicht. Dies spiegelte sich insbesondere darin wider, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Asthma bronchiale und denen mit COPD bestand. Ferner ließ sich die große Variabilität der Messwerte nicht in eindeutiger Weise mit dem klinischen Verlauf oder therapeutischen Interventionen in Verbindung bringen. Daher muss aufgrund der vorliegenden Daten offen bleiben, inwieweit die Messung des ausgeatmeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  als diagnostischer Marker oder zur Verlaufskontrolle bei entzündlichen Atemwegserkrankungen geeignet ist. Die Entwicklung sensitiver, schneller Sensoren kann dieses Bild allerdings in der Zukunft ändern.

## 5 Zusammenfassung

Exogen und endogen erzeugter oxidativer Stress wird als ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Atemwegserkrankungen angesehen. Daher besteht ein großes Interesse insbesondere an nichtinvasiven Methoden zum Monitoring von entzündlichen Veränderungen der Atemwege.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Konzentration des exhalieren  $\text{H}_2\text{O}_2$ , als Marker des oxidativen Stress, bei entzündlichen Atemwegserkrankungen erhöht ist. Offen ist jedoch die Frage, ob sich verschiedene Erkrankungen in der Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unterscheiden und wie sich die möglichen Unterschiede zwischen Kranken und Gesunden zur Variabilität der Messungen verhalten.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu eruieren, ob sich Patienten mit COPD oder Asthma bronchiale oder Bronchiektasen sowie eine gesunde Kontrollgruppe bezüglich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Atemkondensat unterscheiden. Sekundäres Ziel war es, die methodologische Variabilität der Nachweismethode zu erfassen, durch Wiederholungsmessungen Messwertschwankungen zu quantifizieren sowie anhand von Einzelfallanalysen die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Werte in eine Beziehung zu Änderungen des klinischen Zustandes oder zu therapeutischen Interventionen zu bringen. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe von Patienten wiederholt gemessen. Alle Patienten waren stationär im Krankenhaus aufgenommen und wiesen daher einen größeren Schweregrad der Erkrankung auf als die Patienten der meisten vorangegangenen Studien.

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p=0,050$ ) zwischen der Kontrollgruppe (Mittelwert  $0,28 \mu\text{M}$ ) und den Patienten mit Asthma bronchiale (Mittelwert  $0,78 \mu\text{M}$ ). Ebenso waren die Werte der Patienten mit COPD (Mittelwert  $0,77 \mu\text{M}$ ) von denen der Kontrollgruppe verschieden ( $p=0,0043$ ). Besonders ausgeprägt war der Unterschied zu den Patienten mit Bronchiektasen (Mittelwert  $1,39 \mu\text{M}$ ;  $p=0,0018$ ). Die Werte der Patienten mit Asthma oder COPD unterschieden sich aufgrund der Streuung nicht signifikant voneinander ( $p=1,0$ ) oder von den Werten der Patienten mit Bronchiektasen ( $p=0,91$  und  $p=0,63$ ).

Auffällig war die große Variabilität innerhalb der Gruppen sowie von wiederholten Messungen einzelner Patienten. Beim Vergleich des klinischen Verlaufs mit den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Werten ließen sich bei einzelnen Patienten, insbesondere solchen mit Asthma, plausible Assoziationen finden, bei anderen hingegen nicht. Dies war vermutlich zum



wesentlichen Teil dadurch bedingt, dass viele der Messwerte nahe der Nachweisgrenze des verwendeten Assays lagen. Anhand der Eichkurven und Standards ließ sich die Variabilität der Messungen im relevanten Bereich auf bis zu 50 % abschätzen. Bei der hohen Variabilität der Werte von Patienten mit Bronchiektasen standen vermutlich biologische Ursachen im Vordergrund.

Somit zeigte die vorliegende Arbeit höhere Konzentrationen des ausgeatmeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Patienten mit entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Bronchiektasen, COPD oder Asthma bronchiale im Vergleich zu Gesunden. Eine Differenzierung zwischen den Erkrankungen war jedoch statistisch gesehen nicht möglich. Obgleich die Tatsache, dass Unterschiede der Messwerte zwischen Erkrankten und Gesunden mit dem vollständig nichtinvasiven Nachweis von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gefunden wurden, ermutigend ist, bestehen jedoch Zweifel, ob die Messung des ausgeatmeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  als diagnostischer Marker oder zur Verlaufskontrolle bei entzündlichen Atemwegserkrankungen unter praktischen Bedingungen geeignet ist. Vermutlich hat diese Messung ihren Stellenwert nur im Rahmen einer simultanen Messung vieler biochemischer Marker der Entzündung im Exhalat.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akagi M, Katakuse Y, Fukuishi N, Kan T, Akagi R (1994) Superoxide anion-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 732-734
- Aldridge RE, Chan T, van Dalen CJ, Senthilmohan R, Winn M, Venge P, Town GI (2002) Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 847-856
- Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piascecka G, Kurmanowska Z (1997) Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 10: 1235-1241
- Antczak A, Nowak D, Bialasiewicz P, Kasielski M (1999) Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 47:119-126
- Antczak A, Kurmanowska Z, Kasielski M, Nowak D (2000) Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. *Respir. Med.* 94:416-421
- Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Hidaka A, Ohura K (2001) Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF alpha and IL-12 by macrophages via H2-receptors. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1867-1875
- Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketani LH, Boxer LA, Devall LJ (1986) Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1: 11-14
- Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW (1998) Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. *New developments. Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 1-53
- Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, Richter A, Buchanan D, Wilson SJ, Ward J, Zummo G, Howarth PH, Djukanovic R, Holgate ST, Davies DE (2002) Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27:179-185
- Busse W, Randlev B, Sedgwick J (1989) The effect of azelastine on neutrophil and eosinophil generation of superoxide. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83: 400-405
- Chow CK, Ibrahim W, Wei Z, Chan AC (1999) Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 580-587
- Clément MV, Ponton A, Pervaiz S (1998) Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Letters* 440: 13-18
- Couillard A, Koechlin C, Cristol JP, Varray A, Prefaut C (2002) Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur. Respir. J.* 20: 1123-1129

- De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, Spacone A, Formisano S, Cocco R, Sanguinetti CM (2000) Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 55: 185-188
- Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Weidlers PL, van Herwaarden CL, Bast A (1996) Increased exhalation of hydrogen peroxide with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 813-816
- Dohlman AW, Black HR, Royall JA (1993) Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 955-60
- Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, Barnes PJ (2001) Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest* 120: 1136-1139
- Fabel H (1995) Bronchiektasen. In: Fabel H (Hrsg.), Teil III Krankheitsbilder. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (Fabel, Pneumologie, 2. Aufl., S 266-270)
- Gallati H, Pracht I (1985) Horseradish peroxidase :kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3',5,5'-teramethylbenzidine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23: 453-460
- Guzik TJ, West NE, Black E, Mc Donald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 86:85-90
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine, 3<sup>rd</sup> edn. Oxford University Press, Oxford
- Harrison DG (1997) Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 20 (11 Suppl 2): II-11-7
- Holz O, Jörres R, Kästner A, Magnussen H (1995) Differences in basal and induced DNA single-strand-breaks between human peripheral monocytes and lymphocytes. *Mutat. Res.* 332: 55-62
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Linn S, Chung KF, Barnes PJ (1999) Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160: 1532-1539
- Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC (1997) Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur. Respir. J.* 10: 519-521
- Jörres RA (2003) Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid in der Ausatemluft als Marker entzündlicher Aktivität. Dissertation, Universität Hamburg

- Konietzko N, Fabel H (2000). *Weißbuch Lunge*. Thieme, Stuttgart, New York
- Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve J, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB (1993) Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92: 537-548
- Lebowitz MD, Postma DS, Burrows B (1995) Adverse effects of eosinophilia and smoking on the natural history of newly diagnosed chronic bronchitis. *Chest* 108: 55-61
- Lin HC, Wang CH, Liu CY, Yu CT, Kuo HP (2000) Erythromycin inhibits beta-2-integrins (CD11b/CD18) expression, interleukin-8 release and intracellular oxidative metabolism in neutrophils. *Respir. Med.* 94: 654-660
- Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nat. Med.* 4: 1241-1243
- Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ, Barnes PJ (1998) Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158: 991-994
- Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Panagou P, Siafakas NM (2002) The relationship among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest* 121: 338-346
- Matsumoto K, Sugihara E, Ichikawa Y, Arikawa K, Honda J, Oizumi K (1997) Effects of erythromycin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by neutrophils. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 35: 3-8
- Matsunaga T, Nakajima T, Sonoda M, Koyama I, Kawai S, Inoue I, Katayama S, Hirano K, Hokari S, Komoda T (2001) Modulation of reactive oxygen species in endothelial cells by peroxynitrite-treated lipoproteins. *J. Biochem.* 130: 285-293
- Menon IA, Shirwadkar S, Ranadive NS (1989) Nature of the oxygen species generated by xanthin oxidase involved in secretory histamine release from mast cells. *Biochem. Cell Biol.* 67: 397-403
- Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P (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. *Respir. Med.* 93: 389-396
- O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE (2003) The pseudomonas secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285: L1077-L1086

- Pauwels RA, Buist AS, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS on behalf of the GOLD Scientific Committee (2001) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 1256-1276
- Repine JE, Bast A, Lankhorst I, Oxidative stress study group (1997) Oxidative Stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 341-357
- Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, Andersson B (1995) Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 50: 360-365
- Rychlik R, Pfeil T, Daniel D et al (2001) Zur sozioökonomischen Relevanz akuter Exazerbationen der chronischen Bronchitis in der Bundesrepublik Deutschland, *Dtsch. Med. Wschr.* 126: 353-359
- Saetta M, di Stefano A, Maestrelli P, Ferrarresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM (1993) Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis* 147: 301-306
- Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jörres RA (2000) The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *Eur. Respir. J.* 16:1115-1118
- Sedgwick JB, Vrtis RF, Gourley MF, Busse WW (1988) Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81: 876-883
- Sepper R, Konttinen YT, Ding Y, Takagi M, Sorsa T (1995) Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates with severity of disease. *Chest* 107: 1641-1647
- Shult PA, Graziano FM, Wallow IH, Busse WW (1985) Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J. Lab. Clin. Med.* 106: 638-645
- Spencer JP, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B (1996) Oxidative DNA damage in human respiratory tract epithelial cells. Time course in relation to DNA strand breakage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 17-22
- Szkudlarek U, Maria L, Kasielski M, Kauchka S, Nowak D (2003) Exhaled hydrogen peroxide correlates with the release of reactive oxygen species by blood phagocytes in healthy subjects. *Respir. Med.* 97: 718-725
- Ueda J, Saito N, Shimazu Y, Ozawa T (1996) A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 377-384
- van Beurden WJ, Dekhuijzen PN, Harff GA, Smeenk FW (2002) Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. *Respiration* 69: 211-216

- van Beurden, WJ, Dekhuijzen PN, Smeenk FW (2002) Exhaled biomarkers in COPD: their potential role in diagnosis, treatment and prognosis. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 57: 258-267
- Vogelmeier C (2003) Chronisch obstruktive Lungenerkrankung. *Der Internist* 44: 16-27
- Ward PA (1983) Role of toxic oxygen products from phagozytic cells in tissue injury. *Adv. Shock Res.* 10: 27-34
- Wettengel R (1995) Asthma. In: Fabel H (Hrsg.) Teil III Krankheitsbilder, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (Fabel, Pneumologie, 2. Aufl., S 286-325)
- Wettengel R, Berdel D, Hofmann D, Krause J, Kroegel C, Kroidl RF, Leupold W, Lindemann H, Magnussen H, Meister R, Morr H, Nolte D, Rabe KF, Reinhardt D, Sauer R, Schultze-Werninghaus G, Ukena D, Worth H (1998) Asthmatherapie bei Kindern und Erwachsenen. Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie. *Medizinische Klinik* 11: 639-650
- Worth H, Buhl R, Cegla U, Criée CP, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Meister R, Nowack D, Petro W, Rabe KF, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R (2002) Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 56: 704-738
- Zeck-Kapp G, Kapp A, Busse R, Riede UN (1990) Interaction of granulocytes and endothelial cells upon stimulation with tumor necrosis factor-alpha: an ultrastructural study. *Immunobiology* 181: 267-275

## **7 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar bis März 1997 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. H. Magnussen, Universität Hamburg, Fachbereich Humanmedizin, im Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie (ärztliche Leitung: Professor Dr. med. H. Magnussen), angefertigt. Die Messungen erfolgten im Forschungslabor des Krankenhauses Großhansdorf unter Anleitung durch Herrn Dipl.Ing. O.Holz, Dr. rer. nat. R.A. Jörres und Dr. med. K. Richter.

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 Dipl.Ing. 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.

## 8 Lebenslauf

Juliane Rudnik, geb. Seewald

Geboren am: 3. April 1964  
 Geburtsort: Wetzlar / Lahn  
 Religion: evangelisch  
 Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

08/70 - 08/74 Grundschole Biskirchen  
 09/74 - 08/76 Förderstufe Biskirchen  
 08/76 - 04/83 Gymnasium Philippinum, Weilburg  
 Abschluß: Abitur

### Berufsbildung

04/83 - 10/85 4 Semester Betriebswirtschaft, Justus-Liebig-Universität, Gießen  
 10/85 - 10/87 Staatliche Lehranstalt für Medizinisch-Technische-Assistenten  
 am Klinikum der Philipps-Universität, Marburg  
 Abschluss: Medizinisch-technische Laborassistentin  
 10/87 - 11/94 Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen

### Berufstätigkeit

11/87 - 03/95 Während der Studienzeit Tätigkeit als MTA, Institut für Klinische Chemie  
 und Pathobiochemie der Justus-Liebig-Universität, Gießen,  
 Bereich: Akut- und Notfall-Labor  
 Ärztliche Leitung: Prof. Dr.med. N. Katz  
 11/94 - 03/95 Lehrtätigkeit an der MTA-Schule der Justus-Liebig-Universität, Gießen  
 Ärztliche Leitung : Prof. Dr.med. N. Katz  
 03/95 - 09/96 Ärztin im Praktikum, Krankenhaus Großhansdorf  
 Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie  
 Ärztlicher Direktor: Prof. Dr.med. H. Magnussen  
 10/96 - 03/97 Wissenschaftliche Angestellte der Forschungsabteilung am Krankenhaus  
 Großhansdorf, Promotion  
 Ärztlicher Direktor: Prof. Dr.med. H. Magnussen  
 04/97 - 02/2000 Assistenzärztin am Krankenhaus Großhansdorf,  
 Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie  
 Onkologischer Schwerpunkt  
 Chefarzt: Dr.med. U. Gatzemeier  
 03/2000 - 06/2001 Assistenzärztin am Krankenhaus Elim, Hamburg,  
 Abteilung für Innere Medizin  
 Chefarzt: Dr.med. O. Coym  
 07/2001 - 07/2003 Assistenzärztin am Städtischen Klinikum Lüneburg,  
 Abteilung Innere Medizin  
 Chefarzt Prof. Dr.med. P.G. Lankisch



## **9 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.