Auswirkungen einer inhalativen NaCl- und Methacholinprovokation auf die Konzentration von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Zahnmedizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Daniel Patrick Dayton Gerritz
aus Dinslaken

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Thomas Kraus

Herr Privatdozent
Dr. med. Stefan Krüger

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Widmung

Ich widme diese Dissertationsarbeit meiner Frau Nicola

I Inhaltsverzeichnis

I		Inhaltsverzeichnis	**Seite**
II		Abkürzungsverzeichnis	
1		**Einleitung**	**01**
2		**Derzeitiger wissenschaftlicher Kenntnisstand**	**03**
	2.1	Oxidativer Stress und Nitrotyrosin	03
	2.2	Atemkondensat	09
	2.3	Potentielle Einflussfaktoren	14
	2.4	Unspezifischer bronchialer Provokationstest mit Methacholin	15
3		**Ziele dieser Arbeit**	**22**
4		**Material und Methoden**	**23**
	4.1	Übersicht über den Versuchsaufbau	23
	4.2	Anamnese und Kollektiverstellung	25
	4.3	Gewinnung und Sammlung von Atemkondensat	29
	4.4	Spirometrie und Bodyplethysmographie	32
	4.5	Provokationstest mit Methacholin	36
	4.6	Provokationstest mit isotoner Kochsalzlösung	38
	4.7	Probenaufbereitung und Bestimmung der Nitrotyrosinkonzentration	38
	4.8	Statistische Methoden: Erfassung und Analyse der gemessenen Nitrotyrosinwerte und der gesammelten Probandendaten	44
5		**Ergebnisse**	**47**
	5.1	Probandenkollektiv	47
	5.2	Inhalative Provokation mit NaCl	49
	5.3	Inhalative Provokation mit Methacholin	64
6		**Diskussion**	**94**
	6.1	Diskussion der Methoden	94
	6.2	Diskussion der Ergebnisse nach Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung	97
	6.3	Diskussion der Ergebnisse nach Provokationstestung mit Methacholin	100
	6.4	Schlussfolgerung	103
7		**Zusammenfassung**	**105**
8		**Literatur**	**106**
9		**Anhang**	**115**
10		**Danksagung**	**119**
11		**Erklärung zur Datenaufbewahrung**	**120**
12		**Lebenslauf**	**121**

II Abkürzungsverzeichnis

AF	*Atemfrequenz*
AMV	*Atemminutenvolumen*
ATS	*American Thoracic Society*
AZV	*Atemzeitvolumen*
CF	*Zystische Fibrose*
COPD	*Chronisch obstruktive Lungenerkrankung*
DGAUM	*Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin*
ERV	*Exspiratorisches Reservevolumen*
ERS	*European Respiratory Society*
FEV_1	*Forcierte exspiratorische Einsekundenkapazität*
FRC	*Funktionelle Residualkapazität*
FVC	*Forcierte Vitalkapazität*
GPx	*Glutathion-Peroxidase*
H_2O_2	*Wasserstoffperoxid*
iNOS	*Induzierte NO-Synthase (siehe NOS)*
IRV	*Inspiratorisches Reservevolumen*
ITGV	*Intrathorakales Gasvolumen*
IVC	*Inspiratorische Vitalkapazität*
IQR	*Interquartilsabstand*
k	*Geschwindigkeitskonstante*
MEF25, MEF50, MEF75	*Max. exspiratorischer Spitzenfluss bei 25%, 50% bzw. 75% der VC_{max}*
MTC	*Methacholin*
MW	*Mittelwert*
NO	*Stickstoffmonoxid*
NOS	*NO-Synthase (siehe NO)*
NT	*Nitrotyrosin*
PEF	*Exspiratorischer Spitzenfluss*
PIF	*Inspiratorischer Spitzenfluss*
R_{eff}	*Effektiver Atemwegswiderstand*
RR	*nach Riva-Rocci (Blutdruck)*
R_{tot}	*Totaler Atemwegswiderstand*
RV	*Residualvolumen*
SD	*Standardabweichung*
SOD	*Superoxid-Dismutase*
sR_{eff}	*Spezifischer effektiver Atemwegswiderstand*
sR_{tot}	*Spezifischer totaler Atemwegswiderstand*
TLC	*Totalkapazität*
VC	*Vitalkapazität*
VC_{in}	*Inspiratorische Vitalkapazität*
VC_{max}	*Maximale Vitalkapazität*
VT	*Atemzugvolumen*

1 Einleitung

In der pneumologischen Diagnostik von Atemwegserkrankungen stehen aktuell eine Vielzahl unterschiedlicher Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Diese diagnostischen Verfahren sind sowohl invasiv als auch nicht-invasiv.
Das Spektrum der angewendeten Methoden reicht von einfachen und häufig eingesetzten Funktionsuntersuchungen, wie der Spirometrie und der Bodyplethysmographie, bis zu unspezifischen bzw. spezifischen bronchialen Provokationstestungen und den bildgebenden Verfahren, wie dem Röntgen oder der Computertomographie. Die beiden letztgenannten Methoden sind nicht invasive Verfahren, die jedoch eine Strahlenexposition für den zu Untersuchenden in sich bergen und somit der speziellen Indikation bedürfen.

In der arbeitsmedizinischen Diagnostik von Atemwegserkrankungen sowie auch bei wissenschaftlichen Fragestellungen, bei denen die Prävention im Vordergrund steht, sind vor allem jene Verfahren von besonderem Interesse, die minimale Beeinträchtigungen und Belastungen für den Patienten bedeuten und sich als möglichst spezifisch und sensitiv erwiesen haben.

Die unspezifische bronchiale Provokation mit Methacholin (MTC) ist eine Methode, mit welcher die individuelle Reagibilität des Bronchialsystems eines Patienten überprüft werden kann und die in der arbeitsmedizinischen Frühdiagnostik von Atemwegserkrankungen einen hohen Stellenwert hat.
Diese Untersuchungsmethode beruht auf der Inhalation einer definierten Menge eines Methacholin-Aerosols in steigender Dosierung, welches *per definitionem* beim „Lungengesunden“ zu keinerlei Veränderung führt, während ein Mensch mit einem hyperreaktiven Bronchialsystem mit einer Atemwegsverengung reagiert. Eine präzise Erfassung der eingeatmeten Aerosoldosis und der Ausprägung der bronchialen Reaktion sorgt schließlich in der Praxis für die Aussagefähigkeit und Verwendbarkeit eines inhalativen Provokationstests.

Obwohl derzeit die unspezifische bronchiale Provokationsmethode weltweit eine breite Anwendung findet [*Scott et al. (1991)*], gibt es in der Literatur bislang nur wenige Studien, die die Atemwegsreaktionen auf die Methacholin-Aerosolinhalation näher untersucht haben. Exemplarisch genannt sei hier eine im Rahmen der Zulassung von Methacholin als Diagnostikum angefertigte randomisierte

Doppelblindstudie über die Wirksamkeit und die Nebenwirkungen von Methacholin im unspezifischen bronchialen Provokationstest [*Huber et al. (2000)*].

In der internationalen Literatur gibt es derzeit jedoch keinen Hinweis auf Untersuchungen, ob Methacholin beim Menschen adverse Atemwegseffekte, wie das Auslösen von oxidativen Stressreaktionen in der Lunge bzw. in den unteren Atemwegen, induziert.

Untersuchungen, die sich mit dem Nachweis von oxidativem Stress in den Atemwegen auseinandergesetzt haben, nutzten nicht-invasive Nachweismethoden wie die Sputuminduktion oder die Methode der Ausatemluftanalyse. Hierbei wurden das Stickstoffmonooxid (NO) oder das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als messbare Parameter für oxidativen Stress untersucht.

In den letzten Jahren steht mit der kommerziell erhältlichen Atemkondensatsammelmethode eine weitere nicht-invasive Methode zur Gewinnung von Material aus den tiefen Atemwegen zur Verfügung. Mit dieser Untersuchung kann ohne Belastung für den Probanden bzw. Patienten aus den unteren Atemwegen stammendes Material gewonnen werden, um dieses auf Veränderungen des Lungenstoffwechsels bzw. des Entzündungsstatus der Lungen zu untersuchen. Auf diese Weise können die unteren Atemwege auch auf oxidative Stressvorgänge nicht-invasiv untersucht werden. Die Methode erlaubt gemäß der ihr zugrunde liegenden Hypothese die Sammlung von schwerflüchtigen Bestandteilen der Ausatmungsluft, welche die Zusammensetzung der bronchoalveolären extrazellulären Auskleidungsflüssigkeit widerspiegeln.

Als geeigneter sensitiver und reproduzierbarer Parameter zum Nachweis von oxidativen Stressvorgängen im menschlichen Körper wurde in der Vergangenheit bereits die positive Korrelation von 3-Nitrotyrosin dokumentiert [*Schwedhelm (2000)*].

Da es wie eingangs erwähnt bisher noch unklar ist, ob eine Provokation mit Methacholin oxidativen Stress in den tieferen Atemwegen verursacht, widmet sich die hier vorliegende Studie dieser Fragestellung. Der Einfluss einer inhalativen Atemwegsexposition gegenüber Methacholin bzw. gegenüber 0,9%iger Kochsalzlösung auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat als Marker für oxidativen Stress soll im Detail untersucht werden.

2 Derzeitiger wissenschaftlicher Kenntnisstand

2.1 Oxidativer Stress und Nitrotyrosin

Der Begriff „oxidativer Stress“ beschreibt eine Stoffwechsellage, die auf einem Missverhältnis zwischen oxidativen und antioxidativen Faktoren beruht.
Zu den oxidativen Faktoren gehören freie Radikale und reaktive Sauerstoffmetabolite wie die Superoxidradikale, Wasserstoffperoxide und Lipidoxide, die bei verschiedenen enzymatischen und nichtenzymatischen Verbindungen entstehen. Diesen Oxidantien stehen antioxidative Faktoren gegenüber, die die reaktiven Oxidantien mit dem Ziel beseitigen, Zell- und Gewebsschädigungen möglichst zu limitieren.

Das Zusammenspiel zwischen den Oxidantien und Antioxidantien im menschlichen Organismus spielt u. a. bei der Atmungskette eine lebenswichtige Rolle.
Sauerstoff ist ein zentrales Element bei der Energiegewinnung des menschlichen Körpers und ist somit lebensnotwendig. Bei dem Vorgang der Energiegewinnung wird der Sauerstoff in den Mitochondrien mit Hilfe einer langen von Enzymen katalysierten Kette chemischer Redoxreaktionen zusammen mit Wasserstoff zu Wasser reduziert.
Dieser Vorgang lässt sich folgendermaßen beschreiben:
Durch die gleichzeitige Übertragung von vier Elektronen und vier Protonen auf jedes Sauerstoffmolekül geschieht gemäß der Gleichung $4e^- + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 2\ H_2O$ die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Aufgrund des explosionsartigen Ablaufes einer direkten Oxidation (*Knallgasreaktion*: $2\ H_2 + O_2 \longrightarrow 2\ H_2O$) ist sie *in vivo* in die zahlreichen, bei physiologischer Temperatur ablaufenden Teilschritte der Atmungskette zerlegt. Reaktionsort der Atmungskette sind die Mitochondrien und das Enzym „Cytochrom-Oxidase“, das als Antioxidanz speziell für die Reduktion von O_2 zu H_2O verantwortlich ist. Bei der Cytochrom-Oxidase handelt es sich um einen Häm-Proteinkomplex, ein Membranprotein der Mitochondrien, welches für die Aufnahme von Elektronen im letzten Schritt der Atmungskette zuständig ist. Die hierfür notwendigen Elektronen erhält die Cytochrom-Oxidase vom Cytochrom c, das durch die Elektronenabgabe oxidiert wird. Die Cytochromoxidase gibt diese Elektronen an den Sauerstoff weiter. In ihrem aktiven Zentrum enthält die Cytochrom-Oxidase eine bimetallische Anordnung aus einem Eisenatom in einer Hämgruppe und einem Kupferatom. Dort wird nahezu der gesamte Sauerstoff verbraucht, den der Mensch einatmet.

Das O_2-Molekül dient somit am Ende der mitochondrialen Elektronentransportkette als endgültiger Sammlungsort und Ziel aller Elektronen, die am Anfang der Kette eingespeist wurden. Aufgrund seiner hohen Affinität zu Elektronen ist der molekulare Sauerstoff für diese Aufgabe besonders gut geeignet.
Nimmt der Sauerstoff ein Elektron auf, entsteht das Superoxidanionradikal O_2^- ($O_2 + e^- \longrightarrow {}^{\bullet}O_2^-$), und der Organismus wird mit dieser schädlichen Sauerstoffspezies konfrontiert [*Sies (1986)*]. Da dieses Radikal ein ungepaartes Elektron aufweist, handelt es sich um ein höchst instabiles und hochgradig reaktives Molekül, welches bestrebt ist drei weitere Elektronen anzuziehen.
Die Folge sind Oxidationsprozesse, die Membranproteine, Enzyme und DNS verändern oder auch zerstören können. Um dieses zu verhindern, hat die Cytochrom-Oxidase die Aufgabe, das Sauerstoffmolekül im aktiven Zentrum solange sicher zu binden, bis die benötigten vier Elektronen vorhanden sind, um den Sauerstoff in zwei Moleküle Wasser zu reduzieren. Die Ausprägung und damit die Effektivität der Cytochromoxidase ist aufgrund von genetischen Varianten des Enzyms individuell unterschiedlich ausgeprägt. Kommen allelische Varianten bei mindestens 1% der Bevölkerung vor, so spricht man von Polymorphismus [*Oesch (1994)*]. Diese genetischen Variationen können die Effektivität der Cytochrom-oxidase stärken, schwächen oder gar ihr komplettes Fehlen verursachen [*Daly (1995)*].

Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass auch unter physiologischen Bedingungen kleinere Mengen freier Radikale gebildet werden und es damit zu potentiellen Schädigungen innerhalb der Zelle kommen kann.

Neben dem Auftreten von Superoxidanionradikalen (${}^{\bullet}O_2^-$) innerhalb der Atmungskette werden Superoxidanionradikale (${}^{\bullet}O_2^-$) auch bei der Immunabwehr in aktivierten Entzündungszellen des menschlichen Körpers in erster Linie in polymorphkernigen Granulozyten (PMN), Makrophagen und Eosinophilen erzeugt. Dabei wird Sauerstoff in Form von Radikalen freigesetzt, indem dieser enzymatisch mittels NAD(P)H-Oxidase in der Plasmamembran reduziert wird [*Babior et al. (1973); Babior (1999)*].
Die so entstehenden freien Radikale unterstützen den Organismus bei der Abtötung mikrobieller Infektionserrreger und beeinflussen viele Ent-zündungsvorgänge. Ein unerwünschter Nebeneffekt ist die hierbei hervorgerufene Schädigung des benachbarten Gewebes, da das Superoxidanionenradikal (${}^{\bullet}O_2^-$) in kürzester Zeit mit einer Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen reagieren kann [*Halliwel & Gutteridge (1986)*].

Zum Schutz vor diesen Stoffwechselprozessen wird unter Beteiligung der Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) [*McCord & Fridovich (1969); Fridovich (1995)*], Katalase und/oder Glutathion-Peroxidase (GPx) das Superoxidanionenradikal O_2^- wie folgt neutralisiert:

Zunächst erfolgt die Dismutation (1) von Superoxidanionradikalen ($^{\bullet}O_2^-$) mittels der intrazellulären Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutasen (CuZnSOD) oder mittels der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutasen (MnSOD). Den zytosolischen Dismutasen ist eine membranständige, extrazelluläre Superoxid-Dismutase (EC-SOD) gegenübergestellt, die man insbesondere in der Lunge und in den Blutgefäßen findet. Die Aufgabe der Superoxid-Dismutase ist es, durch Elimination von O_2^- zu verhindern, dass in einer Reaktion mit Stickstoffmonoxid das aggressive Peroxynitrit ($ONOO^-$) entsteht.

(1) $$2\ {}^{\bullet}O_2^- + 2\ H^+ \xrightarrow[(SOD)]{} H_2O_2 + O_2$$

Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist wiederum ein hochreaktives Molekül, welches ebenfalls toxisch wirken kann. Zum Schutz der Zelle dienen die Enzyme Katalase (2) und/oder Glutathion-Peroxidase (GPx)(3), welche H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff reduzieren. Bei der Glutathion-Peroxidase (GPx) ist reduziertes Glutathion (GSH) notwendig, das zu Glutathiondisulfid (GSSG) metabolisiert wird.

(2) $$2\ H_2O_2 \xrightarrow[(Katalase)]{} 2\ H_2O + O_2$$

oder

(3) $$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow[(GPx)]{} 2\ H_2O + GSSG$$

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den reaktiven Sauerstoffverbindungen und den schützenden Antioxidantien.

Kommt es allerdings zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes zu Gunsten der reaktiven Sauerstoffspezies ($^{\bullet}O_2^-$; H_2O_2), so spricht man von „oxidativem Stress“.

Infolgedessen kann es zu Schädigungen an verschiedenen zellulären Bestandteilen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommen. Schäden an den Nukleinsäuren und damit Veränderungen am Erbgut sind hierbei von besonderer Bedeutung. Aber auch eine Schädigung von Lipiden als Hauptbestandteil von

Membranen und Proteinen in Form wichtiger Enzyme können das physiologische Gleichgewicht und die Eigenschaften einer Zelle empfindlich verändern.
Pathophysiologisch werden freie Radikale, die bei den oxidativen Stressvorgängen entstehen, nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie z. B. Arteriosklerose, Karzinogenese, dialysepflichtige Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus in Verbindung gebracht.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein weiteres Molekül, das im menschlichen Körper gebildet wird und hier ubiquitär vorkommt. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein reaktionsfreudiges Molekül, welches ein ungepaartes Elektron und somit ebenfalls die chemische Eigenschaft eines Radikals besitzt. Es erfüllt im menschlichen Organismus vielseitige Aufgaben sowohl bei physiologischen und als auch bei pathologischen Vorgängen:
So wird Stickstoffmonoxid in den Endothelzellen der Gefäße gebildet und wirkt indirekt auf das Gefäßsystem im Sinne einer Vasodilatation [*Rassaf et al. (2007)*]. Zudem nimmt es u.a. Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens und hemmt die Thrombozytenaggregation. Weiterhin übernimmt Stickstoffmonoxid im zentralen und peripheren Nervensystem die Funktion eines Botenstoffes (second messenger) und ist aufgrund seiner zytotoxischen und immunoregulatorischen Eigenschaften an der Immunabwehr beteiligt. Im Bereich der Atemwege entfaltet Stickstoffmonoxid schnell eine vaso- und bronchodilatatorische Wirkung.
Gebildet wird Stickstoffmonoxid mittels des Enzyms NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure Arginin, Sauerstoff und NADPH. Dabei existieren von der NO-Synthase drei unterschiedliche Isoenzyme, zwei konstitutive NO-Synthasen (endotheliale und neuronale cNOS) und eine induzierbare NO-Synthase (iNOS).
Während die konstitutiven NO-Synthasen sich für die beschriebenen homöostatischen, kardialen und neuralen Eigenschaften verantwortlich zeigen, wird die induzierbare NO-Synthase - hauptsächlich durch Zytokine und Endotoxine vermittelt - von den Zellen des Immunsystems und von Endothelzellen gebildet.
Eine Aktivitätszunahme der induzierten NO-Synthase und damit die vermehrte Bildung von Stickstoffmonoxid findet bei pathologischen Vorgängen wie z.B. bei Entzündungen, Sepsis, Autoimmunerkrankungen oder Ischämie statt. Umgekehrt kann die Expression der induzierten NO-Synthase durch Glukokortikoide oder durch Zytokine unterdrückt werden.
In den Atemwegen wird die iNOS von Alveolarmakrophagen und von Alveolar- sowie Bronchialepithelzellen exprimiert, welche dort somit den größten Teil des NO bilden.

Das unter physiologischen Bedingungen gasförmige Stickstoffmonoxid hat in vivo eine Konzentration von 10-100 nM [*Malinski & Taha (1992)*]. Aufgrund der geringen Größe und der elektrischen Neutralität kann NO leicht durch Membranen diffundieren und entsprechend seine Wirkung entfalten [*Rassaf et al. (2007)*].
Eine besondere Affinität besitzt Stickstoffmonoxid zu metallhaltigen (vor allem eisenhaltigen) Proteinen wie Oxyhämoglobin (Fe^{2+}), mit dem es zu Nitrat und Methämoglobin (Fe^{3+}) reagiert. Aufgrund der hohen Konzentration von Oxyhämoglobin und der großen Reaktivität mit NO ist diese Reaktion die häufigste von NO im menschlichen Körper [*Lancaster (1994)*]. Die NO-Konzentration wird somit nicht nur von der Aktivität der NO-Synthasen reguliert. Eine weitere Reaktionsmöglichkeit des NO stellt die Reaktion mit schwefelhaltigen Aminosäuren und Proteinen im Blut zu Nitroso-Verbindungen dar. Diese können umgekehrt wieder NO freisetzen.

Von besonderer Bedeutung sind Reaktionen von Stickstoffmonoxid und Superoxidanionen. Bei dieser außerordentlich schnell ablaufenden Reaktion ($k=\sim 7 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$) [*Huie & Padmaja (1993)*] entsteht eines der potentesten Oxidantien im Organismus, das Peroxynitrit ($ONOO^-$) (4):

(4) $^{\bullet}NO + O_2^- \longrightarrow ONOO^-$

Unter physiologischen Bedingungen reduziert allerdings die Superoxid-Dismutase (SOD) trotz deutlich langsamerer Reaktionsgeschwindigkeit ($k=2 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$) [*Klug et al. (1972)*] nahezu alles O_2^- zu H_2O_2 und O_2 (1). Die Ursache für diesen Sachverhalt liegt in der hohen intrazellulären SOD-Konzentration (4-10 µM) [*Nakano et al. (1990)*] begründet.
Die Bildung von Peroxynitrit aus NO und O_2^- wird daher beinahe ausschließlich durch die NO-Konzentration bestimmt. Steigt etwa die NO-Konzentration z.B. unter pathologischen Bedingungen an, so entsteht entsprechend mehr Peroxynitrit [*Koppenol (1998)*].
Die Halbwertszeit von Peroxynitrit unter physiologischen Bedingungen (37℃; pH 7,5) beträgt etwa 0,8 sec [*Koppenol et al. (1993)*]. Innerhalb biologischer Systeme kann aufgrund der hohen Reaktivität von Peroxynitrit von noch kürzeren Halbwertszeiten ausgegangen werden. Bei dem Zerfall von Peroxynitrit entstehen letztlich weitere reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen wie z.B. Nitrit (NO_2^-) und Hydroxylradikal ($^{\bullet}OH$), welche ebenfalls sehr stark oxidativ wirksam sind.

(5) $ONOO^- + H^+ \longrightarrow {}^{\bullet}OH + NO_2$

Peroxynitrit ist somit eine stark reaktive Verbindung, [*Übersicht bei: Beckmann (1996); Murphy et al. (1998)*] die nicht nur oxidativ wirken kann, sondern auch mit einer Vielzahl von Stoffen direkt reagiert. In zahlreichen Studien, die z.B. die Oxidation von Proteinen [*Ischiropoulos & al Mehdi (1995)*], DNS [*Inoue & Kawanishi (1995)*] und Lipiden [*Radi et al. (1991)*] sowie die Nitrierung bzw. Nitrosylierung der Aminosäure Tyrosin [*Ischiropoulos (1998)*] behandelten, wurde dies dokumentiert.

Die Reaktion von Peroxynitrit mit der in Proteinen vorkommenden Aminosäure Tyrosin ergibt die Bildung von 3-Nitrotyrosin. Dabei reagiert das aus NO und O_2^- entstandene Peroxynitrit mit Tyrosinresten eines Proteins und bindet in ortho-Position eine Nitrogruppe:

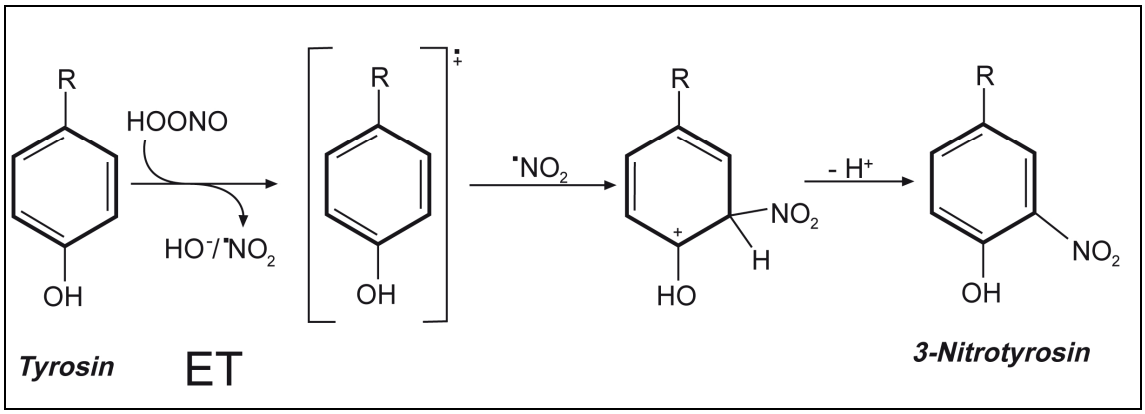


Abbildung 2.1: Ein möglicher Mechanismus für die Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Peroxynitrit (HOONO) und Tyrosin. ET = Elektronentransfer; R = organischer Rest. (*Quelle: Pryor und Squadrito, 1995*)

Im Gegensatz zum reaktiven Peroxynitrit handelt es sich bei 3-Nitrotyrosin um eine stabile Verbindung. Das Auftreten von 3-Nitrotyrosin korreliert direkt mit dem Auftreten von Peroxynitrit, so dass 3-Nitrotyrosin als indirekter Marker für in vivo entstandenes NO bzw. Peroxynitrit [*Ischiropoulos (1998)*] und somit als wichtiger Indikator für oxidativen Stress angesehen werden kann *[Schwedhelm (2000)].*

Abschließend sei erwähnt, dass in einigen Studien auch eine alternative Entstehung von Nitrotyrosin durch die Enzyme Eosinophilenperoxidase [*Wu et al. (1999)*] und Myeloperoxidase [*van der Vliet et al. (1997), Sampson et al. (1998), Eiserich et al. (1998)*] diskutiert wird.

2.2 Atemkondensat

Die Lunge ist durch ihre große Oberfläche und durch ihre lebensnotwendige Aufgabe der Atmung mit einem täglichen Atemvolumen von 15 bis 25 m^3 mehr als alle anderen Organe der Umwelt ausgesetzt. Dieses bedeutet konsekutiv eine hohe Beanspruchung der Atemwege.

Aufgrund ihrer Lage und ihres komplexen und verzweigten Aufbaus ist die Lunge der Untersuchung nur bedingt zugänglich. In der klinischen Diagnostik von potentiellen Atemwegsveränderungen bzw. Lungenerkrankungen bedarf es daher unterschiedlicher, zum Teil nicht-invasiver als auch invasiver Untersuchungsmethoden.

Zu berücksichtigen ist, dass die gängigen in der Routinediagnostik eingesetzten nicht-invasiven Verfahren wie die Lungenfunktionsanalysemethoden (*z. B. die Spirometrie, die Bodyplethysmographie und die Diffusionskapazitätsbestimmung*), die Belastungsuntersuchung (*Spiroergometrie*) und auch die bildgebenden Verfahren (*Röntgen und Computertomographie der Lunge*) jeweils Teilaspekte der Lungenfunktion bzw. der Lungenmorphologie untersuchen. Die Stoffwechselvorgänge in den Atemwegen werden durch die genannten Verfahren nicht erfasst. Für die Untersuchung von metabolischen Vorgängen im Bereich der tieferen Atemwege werden Probenanalysen wie z.B. die Sputumanalyse bzw. der Einsatz der invasiven Bronchoskopie mit Gewinnung einer bronchoalveolären Lavage (*BAL*) benötigt. Durch die Untersuchung der genannten Proben gelingt es, metabolische Vorgänge in der Lunge in gewissem Umfang zu erfassen. Die Probengewinnung ist allerdings aufwendig und für den Patienten belastend. Die Sputumgewinnung bedarf ggf. einer vorherigen Kochsalzprovokation, und die BAL-Gewinnung mit Hilfe der Bronchoskopie ist ein invasives Vorgehen. Aufgrund dieser belastenden bzw. invasiven Techniken ist ein potentieller Einfluss dieser Verfahren unmittelbar auf die Probe nicht auszuschließen [*Loos et al. (1987)*].

Mit Hilfe der heute kommerziell verfügbaren Atemkondensatsammelmethode eröffnet sich die Möglichkeit zur nicht-invasiven Gewinnung von nichtgasförmigen Bestandteilen in der Ausatmungsluft. Die Methode erlaubt ohne Belastung für den Patienten bzw. den Probanden aus der Lunge und den tiefen Atemwegen stammendes Material zu sammeln und dieses einer weiteren Analyse zuzuführen. Diese Untersuchungsmethode ist daher für jeden Patienten oder Probanden ohne weitere Risiken zumutbar und kann von jedem Patienten, der ohne fremde Hilfe atmen kann, beliebig oft durchgeführt werden. Mit Hilfe eines speziellen Adapters (*z.B. VentAdapter™; Firma Jaeger/Toennis GmbH, Höchberg/Bayern*) ist die Untersuchung aber grundsätzlich auch beim beatmeten Patienten durchführbar.

In den Grundzügen stellt sich diese Methode wie folgt dar:

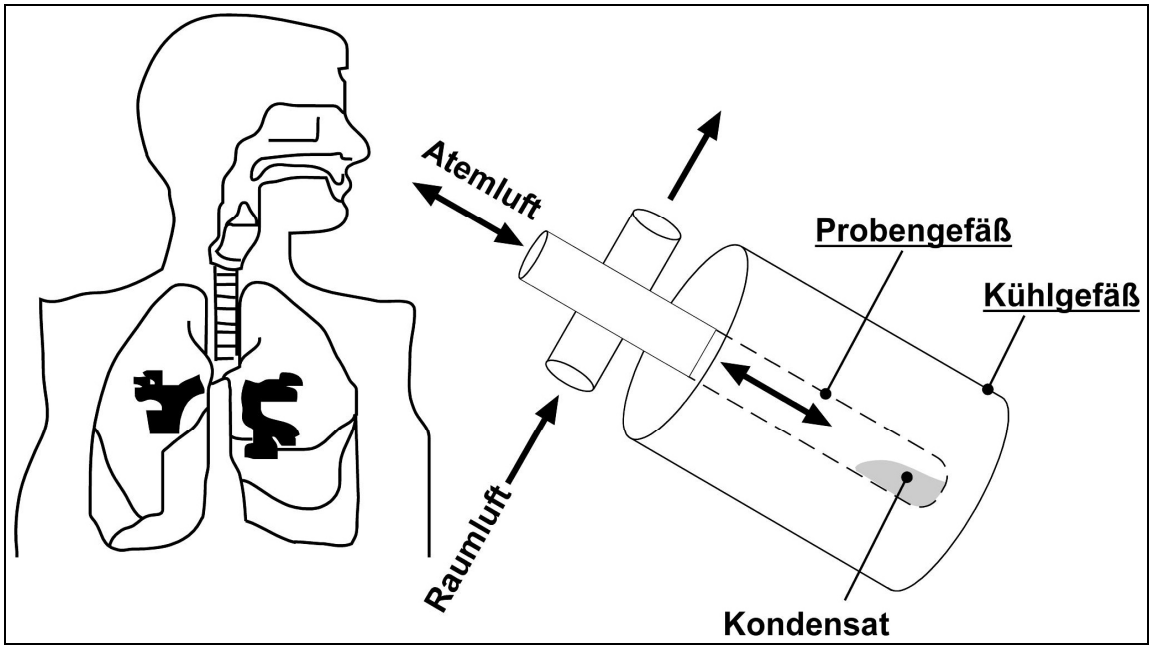


Abbildung 2.2: Schemazeichnung zum Aufbau und zur Funktionsweise der Atemkondensatgewinnung (*modifiziert nach Kharitonov und Barnes, 2001*)

Mit Hilfe einer speziellen Vorrichtung werden die Bestandteile der Ausatmungsluft durch ein Nichtrückatmungsventil in ein Sammlungsrohr geleitet, welches die Ausatmungsluft auf Temperaturen von bis zu -10℃ herunterkühlt. In der Folge werden Aerosole, Wasserdampf und andere nichtgasförmige Bestandteile an der inneren Wandung des Sammlungsgefäßes als *Atemkondensat* abgeschieden. Die Konstruktion der Apparatur verhindert dabei eine mögliche Kontamination mit Speichel [*Becher et al. (1997)*]. Des Weiteren erlaubt diese Methode während der Probensammlung bei Auftreten von Niesen, Hustenreiz oder übermäßiger Speichelansammlung eine passagere und problemlose Unterbrechung der Atmung am Gerät. Die Menge des gesammelten Ausatemkondensates ist abhängig vom Atemminutenvolumen (=*Ventilationsvolumen pro Minute*) [*Reinhold et al. (2000)*], der Temperatur sowie der Feuchtigkeit der Ausatmungsluft. Daher ist eine ruhige und gleichmäßige Atmung während der Atemkondensatspende wichtig.

Das so gewonnene Atemkondensat und die darin enthaltenen Biomoleküle können unter Einhaltung einer entsprechenden Qualitätssicherung (*z.B. adäquate Lagerung und Kühlung, etc.*) haltbar gemacht und dem breiten Spektrum aktueller Analysemethoden unterzogen werden.

2.2.1 Bestandteile des Atemkondensates und deren Entstehung:

Unter Kondensation versteht man allgemein den Übergang eines gasförmigen Stoffes in seinen flüssigen Aggregatzustand unter Abkühlung oder Druckerhöhung. Das hierbei entstehende Produkt ist das sogenannte Kondensat.

Entsprechend handelt es sich beim Atemkondensat um den in flüssiger Form vorliegenden Anteil der ausgeatmeten Luft, des Exhalates.

Das Exhalat setzt sich zusammen aus gasförmigen Bestandteilen, einer Aerosolfraktion und im Wesentlichen aus Wasserdampf *[Kietzmann et al. (1993); McCafferty (2004)].*

In der Vergangenheit wurden Atemkondensatproben unterschiedlichster Probandenkollektive (*z.B. Lungengesunde, Mukoviszidose-Patienten, etc.*) gesammelt und analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass sich große individuelle Unterschiede in Punkto Qualität und Quantität der gewonnenen Atemkondensatproben fanden. Zu den bisher untersuchten Parametern im Atemkondensat zählen Wasserstoffperoxide, Eicosanoide, Proteine, Zytokine, Produkte der Lipidperoxidation, Peptide, Amine, Nitrate, Nitrite, S-Nitrosothiol und Nitrotyrosin *[Übersicht bei Gessner (2005) S.14-16].*

Dass das Atemkondensat als Matrix für verschiedene Marker und Mediatoren dient, entspringt der Hypothese, dass Aerosolpartikel in der Ausatemluft die Zusammensetzung der individuellen bronchoalveolären extrazellulären Auskleidungsflüssigkeit widerspiegeln. Jedoch sind die genauen Entstehungsorte aller im Atemkondensat enthaltenen Bestandteile derzeit im Detail noch unbekannt. Wissenschaftlich bestätigt ist, dass es zu einem dynamischen Austauschvorgang zwischen der Atemluft und dem Gewebe kommt. Aufgrund ihrer großen Gesamtaustauschfläche gelten die Alveolen verglichen mit den übrigen Anteilen der Atemwege damit als wahrscheinlichster Herkunftsort.

Allgemein ist der Austausch der verschiedenen Stoffe abhängig von der Größe der Austauschfläche, der Permeabilität und der Diffusionsgeschwindigkeit der verschiedenen Moleküle. Die Diffusionsgeschwindigkeit steht wiederum in einer Abhängigkeit von der Temperatur und den herrschenden Konzentrationsgradienten.

Aktuell existieren die folgenden theoretischen Ansätze über die Herkunft der im Atemkondensat befindlichen Bestandteile:

- Substanzen mit einer sehr geringen Plasmahalbwertszeit oder einer großen Molekülgröße werden direkt auf der Oberfläche des Respirationstraktes gebildet. [*Rothe (2001)*]
- In einem umschriebenen Abschnitt des Respirationstraktes kommt es zu einer erhöhten Produktion eines Stoffes. Als Beispiel für einen ähnlichen Mechanismus sei die erhöhte NO-Produktion im nasalen Anteil des Respirationstraktes genannt. [*Becher (1997)*]
- Zuletzt sind noch Substanzen wie etwa Ethanol oder Aceton zu nennen, die zwar an anderer Stelle im menschlichen Organismus gebildet werden, aber via Blutbahn in die Atemwege und letztlich so in das Atemkondensat gelangen. Charakteristisch für diese Stoffe sind deren kleine Molekülgröße und die lange Plasmahalbwertszeit. [*Rothe (2001)*]

Das Vorhandensein von weiter oberhalb in den Atemwegen gebildeten Substanzen lässt sich ausschließen, da die in diesen Abschnitten herrschende laminäre Strömung für die Bildung von Aerosolen zu gering ist [*Gessner et al. (2004)*].
Unter dem Begriff „laminare Strömung“ versteht man die Bewegung von Gasen und Flüssigkeiten in Schichten ohne das Auftreten von Turbulenzen, sprich ohne Verwirbelungen und ohne Querströmungen. Die Folge dessen sind eine mangelnde Vermischung der einzelnen Luftschichten und das nahezu Ausbleiben von Reibung von bewegenden Partikeln in diesen Abschnitten.
Zudem ist die Austauschfläche in diesen Abschnitten im Vergleich zur Größe der Oberfläche der Alveolen vernachlässigbar gering [*Rothe (2001)*].
Eine mögliche Kontamination der Probe durch Speichel kann, wie anhand von Amylasetests durch Becher et al. (1997) bewiesen wurde, durch den standardisierten Apparaturaufbau bei der Probengewinnung ausgeschlossen werden.

Wie bereits oben geschildert, setzt sich das Exhalat aus gasförmigen Bestandteilen, Wasserdampf und einer Aerosolfraktion zusammen *[Kietzmann et al. (1993); McCafferty et al. (2004)]*. Dampf- und Aerosolphase stellen dabei den Hauptanteil dar. Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Beschaffenheit von Wasserdampf und Aerosol des Exhalates sind beide Fraktionen daher auch Träger unterschiedlicher nachweisbarer Marker und Mediatoren im Atemkondensat:
In der Dampfphase sind jene Stoffe enthalten, die in Wasser unlöslich sind, wie das 3-Nitrotrosin. Das Vorhandensein dieser Stoffe im Atemkondensat kommt durch die Entstehung eines binären Systems zwischen dem Wasser des Biomoleküls und dem Wasser der Lungenoberfläche zustande. Die einzelnen bestehenden

Dampfdrücke addieren sich und *„schleppen“* somit das Biomolekül mit in die Gasphase, in der es schließlich exhaliert wird.

Die Aerosolphase beinhaltet hingegen nur die wasserlöslichen Substanzen. In wissenschaftlichen Studien wurde nachgewiesen, dass in einem Liter Luft bei Ruheatmung nur 10 Teilchen Aerosol enthalten sind [*Papineni et al. (1997)*]. Der Anteil dieser Phase an der Gesamtmenge des Exhalates kann daher als sehr gering angenommen werden.
Durch eine forcierte Exspiration kann der Anteil der Aerosolphase im Exhalat allerdings gesteigert werden. Der Grund für diese Zunahme ist durch die Atelektasenbildung im Exspirationsvorgang zu erklären. Bei der Bildung von Atelektasen kommt es zu einem Kollaps der Alveolen und damit zu einem breitflächigen Anliegen der Alveolenwände aneinander. In der Inspirationsphase werden diese anliegenden Wände wieder auseinandergerissen, und die im Flüssigkeitsfilm der Alveolen befindlichen Substanzen gelangen dadurch in das Exhalat.
Substanzen, die in der Aerosolphase des Atemkondensates vorkommen, sind zum einen flüchtige Stoffe bzw. volatile organic compounds (=*„flüchtige organische Substanzen“, abgekürzt: VOC*) wie H_2O_2 und zum anderen nichtflüchtige Bestandteile, wie Proteine oder anorganische Salze. Charakteristisch für die nichtflüchtigen Substanzen ist ihre Wasserlöslichkeit und ihre bei 37°C sehr niedrigen Dampfdrücke. Der Nachweis dieser Substanzen ist mit den heute zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Methoden noch nicht im Detail möglich.

Die Ausatemluft hat beim Verlassen der oberen Atemwege eine Temperatur von ca. 37°C und ist praktisch vollständig wasserdampfgesättigt.
Nach Rothe *(2001)* optimiert eine Abkühlung des Kondensates auf -10°C den Kondensationsvorgang der Ausatemluft. Somit lässt sich auch die Gewinnung der im Atemkondensat enthalten Marker auf ein Optimum maximieren. Der Kondensationsgewinn wird unterstützt durch die große Kondensationsfläche entlang der Wandung des Sammlungsgefäßes. Kondensiert ein Gas, so wird die zum Verdampfen aufgewandte Verdampfungswärme in Form der sogenannten Kondensationswärme wieder frei. Die Kondensationswärme verhindert ein Gefrieren des Atemkondensates, wodurch es in seinem flüssigen Aggregatzustand verbleibt.

Es lassen sich anhand einer Analyse des auf diese Weise gewonnenen Atemkondensates Biomarker wie das im Rahmen dieser Studie gemessene 3-Nitrotyrosin nachweisen.

Somit steht die Atemkondensatsammelmethode als innovative und nicht-invasive diagnostische Methode zur frühzeitigen Erkennung von Veränderungen des Lungenstoffwechsels bzw. zur Untersuchung des allgemeinen physiologischen Zustandes der Atemwege zur Verfügung. Adverse Atemwegseffekte könnten so bereits vor der Manifestation struktureller oder funktioneller Veränderungen der Atemwege mit Hilfe der Atemkondensatanalyse frühzeitig entdeckt werden.
Somit eröffnet sich in der pneumologischen Diagnostik die Möglichkeit, adverse Atemwegseffekte möglichst frühzeitig zu detektieren, bevor sie als bereits manifeste krankhafte Veränderungen mit Hilfe konventioneller Techniken wie z.B. der Spirometrie oder der Bodyplethysmographie nachweisbar sind.
Die Atemkondensatmethode kann dazu benutzt werden, Entzündungsreaktionen [*Becher et al. (1997); Horváth et al. (1998)*], Krebswachstum [*Gessner (1998); Gessner (2004)*], Allergien, degenerative Prozesse und auf den Organismus wirkende Umwelteinflüsse zu erkennen bzw. Hinweise zu ihrer Erkennung zu liefern.

2.3 Potentielle Einflussfaktoren

Im Rahmen dieser Studie wurden die Probanden auch individuell unter Berücksichtigung des Atopiestatus betrachtet und verglichen. So ließ sich das Probandenkollektiv zur Hälfte in „Atopiker“ und zur anderen Hälfte in „Nicht-Atopiker“ unterteilen.

Der Begriff Atopie und damit die Diagnose Atopiker setzen folgende medizinische Hintergründe voraus:
Die Atopie umfasst die klinischen Erscheinungsbilder des allergischen Soforttyps, die im so genannten atopischen Formenkreis zusammengefasst werden. Der atopische Formenkreis umfasst die allergische Rhinitis, die allergische Konjunktivitis, das allergische Asthma und die allergische Dermatitis.
Bei der allergischen Rhinitis, der allergischen Konjunktivitis und beim allergischen Asthma handelt es sich um eine IgE-Antikörper vermittelte allergische Reaktion (Typ I-Allergie). Die allergische Dermatitis hingegen ist zellvermittelt; hierbei kann es sich sowohl um eine Typ IV-Allergie (z.B. Nickel) als auch eine Typ I-Allergie (z.B. Latex) handeln. [*Schmidt et al. (2005)*].

2.4 Unspezifische bronchiale Provokation mit Methacholin

Das Asthma bronchiale und die chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) stellen die häufigsten Krankheitsbilder mit intermittierend bzw. passager oder auch chronisch auftretender intrathorakaler Atemwegsobstruktion dar. Bei Patienten mit diesen Atemwegserkrankungen ist es möglich, durch wiederholte Lungenfunktionsprüfungen den Verlauf der Erkrankung zu beobachten. Dabei gilt eine große Variabilität im Obstruktionsgrad als Hinweis auf eine vermehrte Atemwegsempfindlichkeit des Patienten gegenüber Umweltreizen. Überempfindliche Atemwege reagieren bei inhalativer Exposition gegenüber Umweltnoxen mit einer Atemwegsobstruktion. Deshalb ist es für die Diagnose und Therapie von großem Interesse, neben der Kausalitätsprüfung - sprich den Erkrankungsauslöser zu eruieren - auch den Schweregrad der Erkrankung zu verifizieren.

Zur Diagnose und Objektivierung von obstruktiven Atemwegserkrankungen v.a. mit variabler Atemwegsobstruktion können verschiedene Arten von Provokationstests angewendet werden. Dank dieser Untersuchungstechniken lassen sich die morphologischen Veränderungen ebenso wie die funktionellen Symptome durch bronchiale Provokationstests mit bronchokonstriktiv wirksamen Reizen reproduzierbar nachweisen. Mit Hilfe dieser Testmethoden gelingt es dem Untersucher, das Ausmaß der individuellen Empfindlichkeit der Atemwege eines Patienten gegenüber einer bestimmten Noxe nachvollziehbar zu überprüfen. Theoretisch geht man von einer engen Korrelation zwischen individuellem Grad der Überempfindlichkeit der Atemwege und dem Schweregrad eines Krankheitsprozesses aus. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass das Ausmaß einer Überempfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Stimuli in seiner Ausprägung variieren kann.

In der klinischen Anwendung von bronchialen Provokationstests wird generell zwischen unspezifischen und spezifischen Provokationstests unterschieden.

Die unspezifischen Tests nutzen physikalische, irritative oder pharmakodynamische Reize, um eine Hyperreagibilität der Bronchien zu verifizieren. Bei den spezifischen Tests erfolgt die Provokation gezielt mit einem spezifischen Antigen, wie z.B. mit Mehlstaub o.ä.. Während die unspezifischen Provokationen standardmäßig in der pneumologischen Diagnostik zur Objektivierung einer individuellen bronchialen Hyperreagibilität eingesetzt werden, sind die spezifischen Provokationen mit den entsprechenden Allergenen nur zum Nachweis einer Hyperreagibilität der Atemwege auf ein spezifisches Allergen indiziert. Derzeit finden bronchiale Provokationstestungen sowohl zu

wissenschaftlichen Zwecken als auch im Rahmen von diagnostistischen Zielsetzungen ihre Anwendung.

Die weltweit gebräuchlichste Substanz zur Objektivierung der unspezifischen bronchialen Hyperreagibilität ist das Methacholin (Acetyl-β-Methylcholinchlorid) [*Scott & Braun (1991)*]. Hierbei handelt es sich um ein direktes Parasymphatikomimetikum. Methacholin stimuliert direkt das cholinerge (parasympathische) System, indem es wie Acetylcholin an den Muscarinrezeptoren parasympatisch innervierter Organe angreift. Wirkungen bzw. Nebenwirkungen eines Parasympathikomimetikums sind daher je nach Zielorgan unterschiedlich, wie beispielsweise eine Abnahme der Herzfrequenz oder eine Senkung des Augeninnendrucks. So führt eine Inhalation von Methacholin zu einer Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur und löst bei Vorliegen einer Atemwegshyperreagibilität eine individuell z.T. unterschiedlich starke Obstruktion der Atemwege aus. Methacholin wirkt dabei in seiner Anwendung kumulativ. D.h. bei einer Wirkdauer von ca. 30 bis 60 Minuten nach Inhalation führt, sofern die Abstände der einzelnen Expositionen nicht zu groß gewählt werden, jede weitere Inhalation von Methacholin zu einer Summierung der vorher inhalierten Dosis an Methacholin.

Im Jahre 1984 wurden erstmals Leitlinien für die Durchführung von bronchialen Provokationstests [*Gonsior (1984)*] formuliert. Speziell für Methacholin in der Durchführung von bronchialen Provokationstests mit pharmakologisch wirksamen Substanzen hat die American Thoracic Society eine entsprechende Leitlinie [*American Thoracic Society (2000)*] verfasst. Ziel dieser Leitlinie war es, einen Standard für möglichst reproduzierbare Ergebnisse bei der Durchführung einer unspezifischen bronchialen Provokation mit Methacholin zu erhalten, indem sie eine Definition präziser Messbedingungen sowie von Indikationen und Kontraindikationen zur Auswahl der Patienten und der Fragestellungen vorschreibt.

2.4.1 Indikationen für eine unspezifische bronchiale Provokation mit Methacholin *(gemäß American Thoracic Society, 2000)*

Der bronchiale Inhalationstest mit Methacholin ist eine Methode zur näheren Beurteilung der individuellen bronchialen Reagibilität auf unspezifische Inhalationsnoxen. Zum Beispiel kann der Nachweis einer bronchialen Hyperreagibilität zur Diagnose eines Asthma bronchiale beitragen. Denn ein Asthma bronchiale bedeutet eine akut und intermittierend auftretende Atemwegsobstruktion, welche im Intervall durch eine Lungenfunktionsprüfung

eventuell nicht verifizierbar ist. Der Nachweis einer bronchialen Hyperreagibilität, die möglicherweise einem manifesten Asthma bronchiale meist Jahre vorausgeht, kann so die Diagnose sichern.

Allerdings ist eine bronchiale Hyperreagibilität nicht als monokausale Reaktion des menschlichen Körpers auf die Umwelt anzusehen. Sie steht vielmehr in multikausalem Zusammenhang mit einer Vielzahl anderer Einflussfaktoren bzw. anderer Lungenerkrankungen. So steht im Vordergrund die Zigarettenrauch-assoziierte bronchiale Hyperreagibilität mit der hierdurch verursachten chronischen obstruktiven Atemwegserkrankung (COPD). Des Weiteren sind die hydropische Herzdekompensation, die zystische Fibrose (CF), die Bronchitis und die allergische Rhinitis zu nennen.

Des Weiteren unterliegt das Ergebnis eines Methacholin-Provokationstests (*MTC-Test*) oftmals temporären Schwankungen durch den Einsatz von z.B. anti-inflammatorisch wirksamen Medikamenten.

Der bronchiale Provokationstest mit Methacholin wird daher am häufigsten verwendet, wenn das Vorliegen einer Asthma-Erkrankung als sehr wahrscheinlich gilt und die traditionellen Untersuchungsmethoden, wie etwa die Spirometrie keine eindeutige Diagnose eines Asthma bronchiale zulässt. Da der negative prädikative Wert größer ist als der positive prädikative Wert, ist die Durchführung einer inhalativen Provokation mit Methacholin nützlicher zum Ausschluss eines Asthma bronchiale als zu dessen Nachweis [*Fish (1993)*].

Damit bei einer bronchialen Provokation mit Methacholin der optimale diagnostische Wert erreicht wird, sollte die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Asthma bronchiale vor der Testung bereits zwischen 30% und 70% [*Perpina et al. (1993)*] liegen. Diese Wahrscheinlichkeit erhöht sich durch eine positive Anamnese mit den im Folgenden genannten Symptomen, die Hinweise auf eine Asthma-Erkrankung geben: Hierzu zählen Keuchen, Atemnot, Brustenge oder Husten unter folgenden Vorbedingungen:

1. bei Exposition mit kalter Luft,

2. nach körperlicher Anstrengung,

3. während einer Atemwegsinfektion,

4. in Folge einer inhalativen Exposition am Arbeitsplatz oder

5. nach Exposition mit einem Allergen oder einer anderen Asthma auslösenden Noxe.

Der Tabelle 2.1 sind zusammenfassend die Indikationen für die Durchführung eines bronchialen Inhalationstests mit Methacholin gemäß Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (*DGAUM*) zu entnehmen.

Tabelle 2.1*:* Indikationen für die Testung der unspezifischen bronchialen Hyperreagibilität [Quelle: *Klein (1997*)]

(1)	Anamnestisch Anfälle von Atemnot ohne klinisches oder lungenfunktionsanalytisches Korrelat
(2)	Husten unklarer Genese (nach Ausschluss anderer Ursachen)
(3)	"Inadäquate" Atemnot unter Belastung (neben der Lungenfunktions-messung vor und nach einer Ergometrie)
(4)	Gutachterliche Fragestellungen
(5)	Arbeitsmedizinische Fragestellungen
(6)	Wissenschaftliche Fragestellungen
(7)	Epidemiologische Fragestellungen

2.4.2 Kontraindikationen für eine unspezifische bronchiale Provokation mit Methacholin *(gemäß American Thoracic Society, 2000)*

Als Kontraindikationen für eine bronchiale Provokation mit Methacholin werden alle Bedingungen aufgefasst, die die Qualität der Testung vermindern oder den Patienten einer erhöhten Gefahr oder einem erhöhten Risiko aussetzen. Zur Vermeidung von etwaigen Komplikationen wird daher besonders in Voruntersuchungen und in der Anamnese darauf eingegangen.
Besondere Vorsicht ist geboten, wenn in der Vorgeschichte ein Status asthmaticus oder ein anaphylaktischer Schock eruierbar ist.

Allgemein unterscheidet man zwischen absoluten und relativen Kontraindikationen für die Durchführung einer inhalativen Provokationstestung mit Methacholin (*siehe hierzu Tabelle 2.2*).

Tabelle 2.2*:* Absolute und relative Kontraindikationen für die Provokationstestung mit Methacholin [Quelle: *American Thoracic Society (2000)*]

Absolute Kontraindikationen: • Schwere Atemwegsobstruktion (*FEV_1<50% oder <1L*) • Schwere arterielle Hypertonie (*systolisch RR>200, diastolisch RR>100*) • Zustand nach Herzinfarkt oder Schlaganfall < 3 Monate • Bekanntes Aortenaneurysma
Relative Kontraindikationen: • Moderate Atemwegsobstruktion (*FEV_1<60% bzw. <1,5l*) • Unfähigkeit die Spirometrie qualitativ akzeptabel durchführen zu können • Medikation mit Cholinesterasehemmern bei Patienten mit Myasthenia gravis • Schwangerschaft • Stillende Mütter

Während einer Methacholin-Provokation kann es gelegentlich zu dramatischen Abfällen von FEV_1 („*Einsekundenkapazität*“[1]) kommen. Die Gefahr für solche Zwischenfälle besteht vor allem bei Patienten mit einer eingeschränkten bzw. herabgesetzten Lungenfunktion (z.B. Vitalkapazität oder FEV1 verringert). Dennoch stellt eine herabgesetzte Lungenfunktion aber nur eine relative Kontraindikation dar, weil das allgemeine Risiko eines solchen ernst zunehmenden Zwischenfalles selbst bei Asthmatikern mit schwerer Atemwegsobstruktion nur sehr gering ist [*Martin et al. (1997)*].

Die Schwelle, ab wann eine herabgesetzte Lungenfunktion eine Kontraindikation darstellt, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. So werden z.B. laut Sterk et al. (1993) und Tashkin et al. (1992) ein Ruhe-FEV_1 <1,5 l oder <60% als relative Kontraindikation genannt. In anderen Studien entschieden sich die Untersucher für Ruhe-FEV_1-Werte von <70% oder <80% [*Scott & Braun (1991)*]. In einer Leitlinie des „National Asthma Education and Prevention Program“ von 2007 wird ein FEV_1-Ruhewert von <65% als Kontraindikation angegeben.

Abschließend sollte erwähnt werden, dass die Qualität und Aussagekraft eines MTC-Testes u. a. entscheidend von der Kooperativität des Patienten abhängt, die Atemmanöver bei der Spirometrie zu befolgen.

[1] FEV_1: Lungenfunktionsmessung, bei der nach maximaler Einatmung das innerhalb der ersten Sekunde ausgeatmete Luftvolumen gemessen wird: forcierte exspiratorische Einsekundenkapazität (= Volumen pro 1 Sekunde)

2.4.3 Pharmakologische Einflüsse *(gemäß American Thoracic Society, 2000)*

Vor Durchführung einer bronchialen Provokation mit Methacholin müssen diverse Einflüsse von Pharmaka ausgeschlossen werden. Dabei unterscheidet man für den Testablauf mit Methacholin abschwächend wirkende und verstärkend wirkende Medikamente.

Zu den Methacholin abschwächend wirkenden Medikamenten zählen die oralen oder inhalativen Kortikoide, die inhalativ applizierbaren, lang wirksamen β_2-Sympathomimetika, Mastzellstabilisatoren und Antiallergika wie DNCG (=*Dinatriumcromoglicicum*), Ketotifen, Nedocromil-Natrium, als auch Theophyllin, die kurz bis mittellang wirksamen inhalativen sowie oralen β_2-Sympathomimetika, die inhalativen Parasympathikolytika und abschließend die Antihistaminika.
Die Wirkung der Antihistaminika ist allerdings nur gering ausgeprägt.

Zu den Methacholin verstärkenden Medikamenten zählen β-Blocker, α-Sympathomimetika und Parasympathomimetika .

Die Tabelle 2.3 zeigt eine Auflistung der Methacholin verstärkenden und abschwächenden Medikamente inklusive der empfohlenen Karenzzeiten vor der Durchführung einer bronchialen Provokation mit Methacholin entsprechend der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin (*DGAUM*) [*modifiziert nach Gonsior et al. (2002)*].

Tabelle 2.3*:* Empfohlene Absetzfristen der Begleitmedikation der DGAUM
(modifiziert nach Gonsior et al. 2002)

Medikament	**Mindestabsetzfrist**
β-Sympathomimetika inhalativ	
-- kurz wirksame	6 Stunden
-- lang wirksame	24 Stunden
β2-Sympathomimetika oral	24 Stunden
Parasympatholytika inhalativ	
-- kurz wirksame	6 Stunden
-- langwirksame	24 Stunden
Parasympatholytika inhalativ	
-- kurz wirksame	6 Stunden
-- lang wirksame	24 Stunden
Theophyllin und –derivate[1)]	
-- kurz wirksame	12 Stunden
-- lang wirksame	24 Stunden
DNCG (=*Dinatriumcromoglicicum*)	24 Stunden
Nedocromil-Natrium	24 Stunden
Antihistaminika	
-- außer Astemizol	48 Stunden
-- Astemizol	6 Wochen
Kortikosteroide[2)]	14 Tage
Leukotrienantagonisten[3)]	5 Tage
zentral wirkende Antihypertensiva (*z.B. Rauwolfia-Alkaloide, Guanethidin, a-Methyldopa, Clonidin*)	21 Tage
trizyklische Psychopharmaka	21 Tage
β-Rezeptoren-Blocker	24 Stunden

Anmerkungen:
1) Bei Anwendung von Theophyllin sollte der Wirkstoffspiegel bestimmt werden.
2) Inhalationstests unter Kortikosteroidtherapie können das Ergebnis des Provokationstests im Sinne einer Abschwächung beeinflussen. Idealerweise sollten Kortikosteroide daher 14 Tage vor der Untersuchung abgesetzt werden.
3) Nach Rifflemann et al. 2002 und 2003.

3 Ziele dieser Arbeit

Die unspezifische bronchiale Provokation mit Methacholin ist eine Methode, mit welcher die individuelle Reagibilität des Atemwegssystems eines Patienten überprüft werden kann und die in der arbeitsmedizinischen Frühdiagnostik von Atemwegserkrankungen einen hohen Stellenwert hat. In der internationalen Literatur gibt es derzeit jedoch keinen Hinweis auf Untersuchungen, ob diese inhalierten Lösungsaerosole beim Menschen adverse Atemwegseffekte, wie das Auslösen von oxidativen Stressreaktionen in der Lunge bzw. in den unteren Atemwegen, induzieren.

Die nicht-invasive Gewinnung und Untersuchung des Atemkondensats aus den unteren Atemwegen ermöglicht die Erkennung von subklinischen adversen Atemwegseffekten anhand von Biomarkern und damit eine frühzeitige Intervention mit präventiver Zielsetzung. 3-Nitrotyrosin gilt als sensitiver Marker für oxidativen Stress.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer inhalativen Atemwegsprovokation mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. mit Methacholin auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat zu prüfen. Hierbei wurden potentielle Einflussfaktoren wie der Atopiestatus und die Rauchgewohnheiten berücksichtigt.

Es sollten folgende Hypothesen näher beleuchtet werden:

1. 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl) ist eine inerte Lösung. Die inhalative Atemwegsprovokation mit physiologischer Kochsalzlösung hat keinerlei Einfluss auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat.

2. Die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat unmittelbar nach dem Methacholintest ist höher als vor der Provokation.

3. Die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat 90min. nach dem Methacholintest ist höher als vorher und höher als unmittelbar nach dem Provokationstest.

4. Die unter 2. und 3. beschriebenen Effekte sind bei Rauchern stärker ausgeprägt als bei Nichtrauchern.

5. Die unter 2. und 3. beschriebenen Effekte sind bei Atopikern stärker ausgeprägt als bei Nichtatopikern.

6. Die unter 2. und 3. beschriebenen Effekte haben bei rauchenden Atopikern die stärkste Ausprägung und sind somit stärker als bei nichtrauchenden Atopikern, bei rauchenden Nichtatopikern und bei nichtrauchenden Nichtatopikern.

4 Material und Methoden

4.1 Übersicht über den Versuchsaufbau

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss einer inhalativen Provokation mit Methacholin unter Anwendung des „New Jaeger APS Protocol“ auf die 3-Nitrotyrosin-Konzentration im Atemkondensat der teilnehmenden Probanden zu untersuchen.

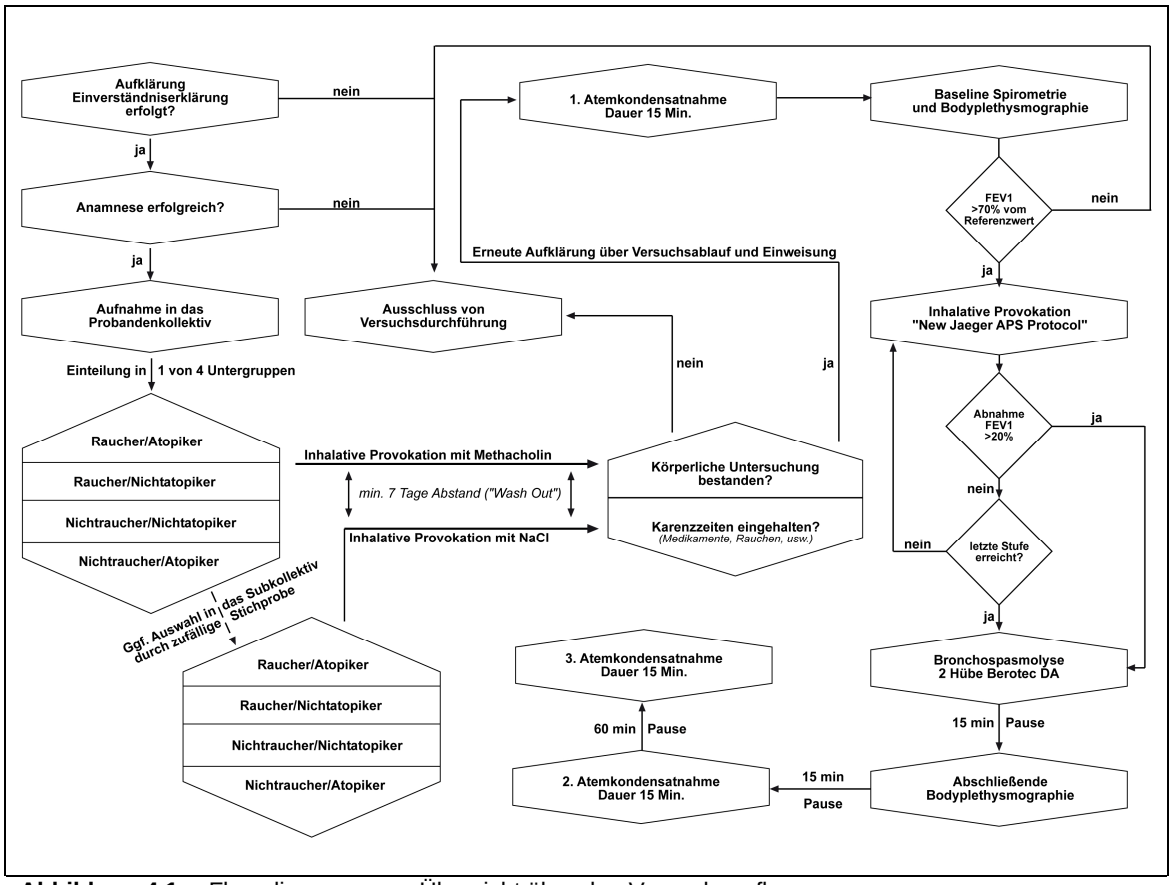


Abbildung 4.1: Flussdiagramm zur Übersicht über den Versuchsaufbau

Im Rahmen einer Machbarkeitsstudie wurde das Probandenkollektiv auf 20 Probanden festgelegt. Die Teilnahme an der Studie war für die Probanden freiwillig und unentgeltlich. Die Studienteilnehmer wurden eingehend über die Untersuchung aufgeklärt. Nur mit Einverständniserklärung erfolgte eine Teilnahme an der Studie.
Eine Übersicht über den Versuchsaufbau liefert Abbildung 4.1.
Zu Beginn wurden mittels eines speziellen Anamnesebogens (*Abb. 4.2; Abb. 4.3*) die Probanden ausgewählt und einer der insgesamt vier Probandengruppen zugeordnet. Die Zusammensetzung der Probandengruppen erfolgte nach den individuellen Rauchgewohnheiten und nach dem individuellen Atopiestatus:

1. Gruppe: „Raucher/Atopiker“,
2. Gruppe: „Raucher/Nichtatopiker“,

3. Gruppe: „Nichtraucher/Atopiker“ und
4. Gruppe: „Nichtraucher/Nichtatopiker“.

Nach einer klinischen Untersuchung, die die Auskultation von Herz und Lunge umfasste, erfolgte die erste Atemkondensatsammlung mit einer Dauer von 15 Minuten. Das gewonnene Atemkondensat wurde mit Hilfe einer Eppendorfpipette aus dem Auffangbehälter in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80℃ tiefgefroren gelagert.

Im Anschluss an die erste Atemkondensatprobengewinnung erfolgte zunächst eine lungenfunktionsanalytische Ausgangsuntersuchung. Anschließend wurde die standardisierte inhalative Provokationtestung gemäß „New Jaeger APS Protocol“ durchgeführt.

Nach Ablauf des Provokationstestes wurden jedem Probanden standardgemäß - entsprechend der Leitlinien - zwei Hübe eines Bronchodilatators (*Berotec® N 100 µg Dosier-Aerosol; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG*) verabreicht. Nach 15minütiger Wartezeit nach Berotec®-Gabe erfolgte eine abschließende lungenfunktionsanalytische Untersuchung.

Im Anschluss hieran erfolgte wiederum eine 15minütige Pause, bevor die zweite Atemkondensatprobe mit einer Dauer von 15 Minuten folgte. Die dritte Atemkondensatnahme erfolgte 60 Minuten nach der zweiten Probennahme, also zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Abschluss der Provokationstestung.

Ein potentieller Einfluss auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat durch die allgemeinen Rahmenbedingungen der Versuchsanordnung (*z.B. inhalativer Provokationstest mit forcierten Atemmanövern, etc.*) sollte durch die analoge Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung als Testsubstanz ausgeschlossen werden. Deshalb wurde hierzu analog bei einer zufälligen Stichprobe aus dem Studienkollektiv die inhalative Provokationstestung gemäß „New Jaeger APS Protocol“ mit 0,9%iger Kochsalzlösung anstatt der 3,2%igen Methacholinlösung durchgeführt. Zwischen den beiden Provokationsmessungen wurde ein zeitlicher Abstand von mindestens 7 Tagen als „Wash-Out“ Phase festgelegt.

Gemäß Empfehlung der American Thoracic Society wurde am Tag der Versuchsdurchführung der Proband dazu angehalten, weder zu rauchen, noch koffeinhaltige Getränke zu konsumieren. Zudem durfte eine Stunde vor Versuchsbeginn nicht mehr gegessen, noch Sport getrieben werden. Diese Einschränkungen wurden für die gesamte Dauer der Versuchsdurchführung aufrecht erhalten.

Ein Proband wurde von der Studie ausgeschlossen, sofern er anamnestisch positiv im Sinne einer der von der American Thoracic Society (*2000*) vorgegebenen Kontraindikationen für die Durchführung einer inhalativen Provokation mit Methacholin war, oder sofern eine nicht ausreichende Medikamentenkarenz gemäß Empfehlung der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin vorlag *(siehe hierzu Tabellen 2.2 und 2.3)*.

4.2 Anamnese und Kollektiverstellung

4.2.1 Anamnese:

Die Anamnese wurde bei jedem Probanden auf speziellen Formularen (*siehe Abbildungen 4.2 und 4.3*) erhoben, die es erlaubten, seinen individuellen Gesundheitszustand mit Hilfe eines dichotomen Antwortschemas standardisiert zu erfassen und zu dokumentieren.

Im Wesentlichen wurden die Stammdaten (*Name, Adresse, Geburtsdatum, Geschlecht*) und etwaig vorhandene Allgemeinerkrankungen erhoben. Mit besonderem Augenmerk wurde nach Lungenerkrankungen, nach operativen Thoraxeingriffen, nach aktuellen atemwegsbezogenen Beschwerden, nach aktueller Medikamenteneinnahme, nach familiären Belastungen, nach Rauchgewohnheiten, nach Atopiestatus und nach dem momentanen Gesundheitszustand gefahndet. Eine gesonderte Stressanamnese wurde nicht durchgeführt.

Die Erhebung des Atopiestatus erfolgte anhand der eingangs festgelegten Definition (*siehe Kapitel 2.3*). Die Zuordnung Raucher oder Nichtraucher erfolgte entlang der Angaben der Probanden zu ihren individuellen Rauchgewohnheiten. Als Raucher wurden die Probanden definiert, die zum Zeitpunkt der Messung regelmäßige Raucher waren oder die in der Vergangenheit regelmäßige Raucher waren. Nach der Definition für den Mikrozensus des Statistischen Bundesamtes Deutschland wird unter regelmäßigem Rauchen tägliches Rauchen verstanden, auch wenn es sich um geringe Tabakmengen handelt. Nichtraucher bzw. „Nieraucher“ waren die Probanden, die nie regelmäßige Raucher gewesen waren.

Eine Passivrauchexposition wurde nicht gesondert erfasst.

UNIVERSITÄTSKLINIKUM - RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE AACHEN

Institut für Arbeitsmedizin am Universitätsklinikum

DIREKTOR: UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. MED. THOMAS KRAUS

Anamnese-Bogen

Name, Vorname		
Geburtsdatum und -ort		
Adresse		
Größe (cm)	Gewicht (kg)	Geschlecht (w/m)

Sehr geehrte Teilnehmerin, sehr geehrter Teilnehmer,

um die von Ihnen erhaltenen Daten im Rahmen der Studie richtig auswerten und interpretieren zu können, bitten wir Sie um Beantwortung der folgenden Fragen zur allgemeinen Vorgeschichte (Anamnese).
Die Angaben unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht.

Bei Unklarheiten können Sie uns gerne fragen.

Datum/Unterschrift:

Besteht bzw. bestand bei Ihnen eine der folgenden Erkrankungen?			ja	nein	Falls Sie mit ja antworten: bitte ggf. ergänzende Angaben eintragen
1	Atemwegserkrankungen		☐	☐	
	1.1	Asthma	☐	☐	
	1.2	Tuberkulose	☐	☐	
	1.3	Bronchitis	☐	☐	
	1.4	Pneumonie	☐	☐	
	1.5	Mukoviszidose	☐	☐	
	1.6	sonstige Atemwegserkrankung	☐	☐	
2	Allergien (welche)		☐	☐	
3	Herz-Kreislauf-Erkrankung		☐	☐	
	3.1	Herzinsuffizienz	☐	☐	
	3.2	Koronare Herzkrankheit/ Angina pectoris	☐	☐	
	3.3	Herzinfarkt	☐	☐	
	3.4	Herzrhythmusstörungen	☐	☐	
	3.5	Herzschrittmacher	☐	☐	
	3.6	Herzklappenfehler/-ersatz	☐	☐	
	3.7	Hypertonie	☐	☐	
	3.8	Hypotonie, Synkopen	☐	☐	
	3.9	Mangeldurchblutung des ZNS/Apoplex	☐	☐	
4	Blutgerinnungsstörungen		☐	☐	
5	Diabetes (welcher Typ)		☐	☐	
6	Glaukom (erhöhter Augendruck)		☐	☐	
7	Hämatologische Erkrankungen (Erkrankung blutbildener Organe)		☐	☐	
8	Anfallsleiden (Epilepsie)		☐	☐	
9	Infektionskrankheiten		☐	☐	
	9.1	Hepatitis	☐	☐	
	9.2	Immunmangel-Syndrom (AIDS)	☐	☐	
	9.3	sonstige Infektionen	☐	☐	
10	Lebererkrankungen		☐	☐	
11	Magen-Darm-Erkrankungen		☐	☐	
12	Nierenerkrankungen		☐	☐	
13	Osteoporose		☐	☐	
14	Schilddrüsenerkrankungen		☐	☐	
15	Tumorerkrankungen		☐	☐	
16	Rückenbeschwerden (welcher Art)		☐	☐	

Abbildung 4.2: Anamnese Bogen, 1. Seite

Beantworten Sie bitte folgende Angaben mit ja oder nein:	ja	nein	Falls Sie mit ja antworten: bitte ggf. ergänzende Angaben eintragen
17 Röntgenbilder vom Thorax (wann)	☐	☐	
18 Unfälle im Thoraxbereich (was, wann)	☐	☐	
19 Rippenbrüche (wann, wie)	☐	☐	
20 allg. Operationen (was, wann)	☐	☐	
21 Diagnostische Untersuchungen:	☐	☐	
21.1 Bodyplethysmographie	☐	☐	
21.2 Bronchoskopie	☐	☐	
22 Haben Sie jemals eine Kur gemacht?	☐	☐	
23 Einnahme von Medikamenten:	☐	☐	
23.1 Letzte Medikation (was, wann)	☐	☐	
23.2 Schmerzmedikamente • z.B. Aspirin, etc. (wann zuletzt)	☐	☐	
23.3 Schleimlösende Medikamente	☐	☐	
23.4 Cortison	☐	☐	
23.5 Vitaminpräparate	☐	☐	
23.6 Antikonzeptiva	☐	☐	
23.7 sonstige Medikamente	☐	☐	
24 Aktuelle Beschwerden	☐	☐	
24.1 Husten (wieviel, mit Auswurf) • wie sieht der Auswurf aus?	☐	☐	
24.2 Schmerzen (wo, seit wann)	☐	☐	
24.3 Fieber (seit wann, wie hoch)	☐	☐	
24.4 Erkältungen	☐	☐	
24.5 Luftnot (bei Belastung?) • Auslöser bekannt/vorhanden?	☐	☐	
24.6 Schlafstörungen	☐	☐	
24.7 Appetitlosigkeit	☐	☐	
24.8 (Nacht-)Schweiß	☐	☐	
24.9 Unregelmäßigkeiten: Stuhlgang	☐	☐	
24.10 Gynäkologische Unregelmäßigkeiten	☐	☐	
24.11 Unregelmäßigkeiten beim Gewichtsverlauf	☐	☐	
24.12 Unwohlsein	☐	☐	
24.13 sonstige Beschwerden	☐	☐	
25 Rauchen Sie: (früher einmal?)	☐	☐	
25.1 was? (Pfeife, Zigaretten, etc.)	☐	☐	
25.2 wieviel? (Anzahl/Tag)	☐	☐	
25.3 wann?	☐	☐	
25.4 wie lange? (Jahre)	☐	☐	
26 Trinken Sie Alkohol? • regelmäßig, manchmal, selten, nie	☐	☐	
27 Treiben Sie Sport • was, wie oft, wie lang, wie intensiv?	☐	☐	
28 Familienanamnese:			
28.1 Allergien (welche)	☐	☐	
28.2 Lungenkarzinome	☐	☐	
28.3 Asthma	☐	☐	
28.4 Tuberkulose	☐	☐	
28.5 sonstige Atemwegserkrankungen	☐	☐	
28.6 Diabetes	☐	☐	
28.7 sonstiges	☐	☐	
29 Sind Sie schwanger?	☐	☐	

Beurteilen Sie folgenden Aspekt mit Hilfe einer Skala von 1 (=sehr gut) bis 5 (=sehr schlecht):

	1	2	3	4	5
30 allgemeines Wohlbefinden:	☐	☐	☐	☐	☐

Anamnese|02

Abbildung 4.3: Anamnese Bogen, 2. Seite

Der Proband hatte den Anamnesebogen selbstständig, aber unter Aufsicht auszufüllen. Unklarheiten und Auffälligkeiten wurden in einem persönlichen Gespräch erörtert und anhand einer ärztlichen Untersuchung verifiziert oder auch widerlegt. Als weiteres Maß zur Beurteilung des individuellen Gesundheitsstatus wurde eine Auskultation von Herz und Lunge vorgenommen.
Alle erhobenen Daten wurden in einer Datenbank (SPSS 12.0; *SPSS GmbH Software, München)* zusammengefasst.

4.2.2 Kollektiverstellung:

Das Probandenkollektiv setzte sich aus Freiwilligen zusammen. Die Teilnahme an der Studie war unentgeltlich.
Bei der Erstellung des Probandenkollektivs wurde eine möglichst gleichmäßige Geschlechterverteilung angestrebt. Die genaue und standardisierte Erhebung der unter 4.2.1 genannten Daten diente der Zuordnung jedes Probanden in eine der vier Kollektivgruppen bzw. zum Ausschluss von Probanden mit pathologischen Auffälligkeiten bzw. möglichen Kontraindikationen.
Somit wurde mit Hilfe der erhobenen Daten das Probandenkollektiv, bestehend aus 20 Probanden in vier gleichgroße Kollektivgruppen unterteilt:

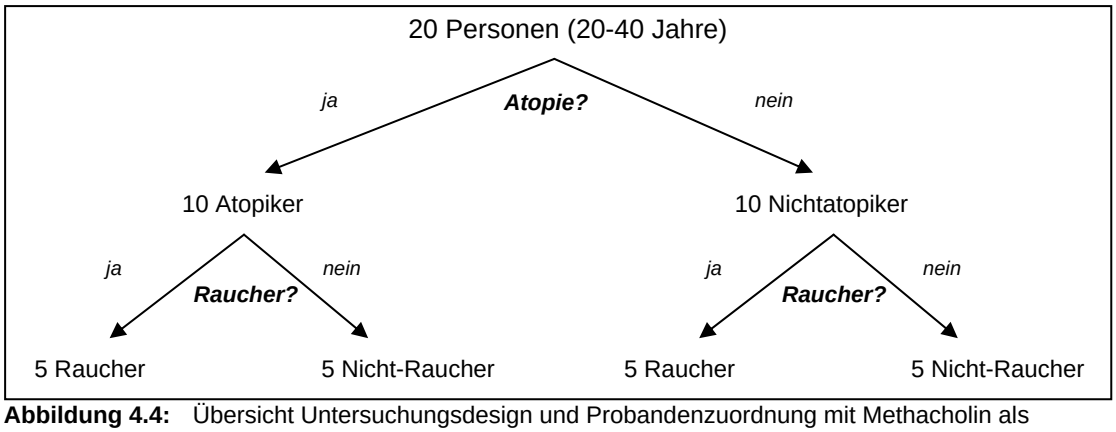


Abbildung 4.4: Übersicht Untersuchungsdesign und Probandenzuordnung mit Methacholin als Inhalationsmittel.

Wie dem hier aufgeführten Organigramm (Abbildung 4.4) zu entnehmen ist, gliederte sich das Kollektiv zur Hälfte in Raucher und zur anderen Hälfte in Nichtraucher bzw. in Nichtatopiker und Atopiker. Auf diese Weise wurden 4 Untergruppen gebildet: erstens die Gruppe der rauchenden Atopiker, zweitens die Gruppe der rauchenden Nichtatopiker, drittens die Gruppe der nichtrauchenden Atopiker und viertens die Gruppe der nichtrauchenden Nichtatopiker.
Wie eingangs beschrieben, wurde bei einem Subkollektiv zusätzlich die Provokationstestung mit 0,9% NaCl-Lösung durchgeführt. Analog der Unterteilung in die vier einzelnen Untergruppen wurden hierbei als zufällige Stichprobe 12

Probanden aus dem Gesamtkollektiv von 20 Probanden ausgewählt und mit 0,9%iger Kochsalzlösung getestet. Die Testung fand mit einem zeitlichen Mindestabstand von 7 Tagen zur Provokationstestung mit Methacholin statt. Diese sogenannte „Wash Out“ Phase wurde festgelegt um eventuell subklinische adverse Einflusse durch die Exposition von Methacholin auf die Kontrolltestung zu eliminieren. (*s. Abbildung 4.5*)

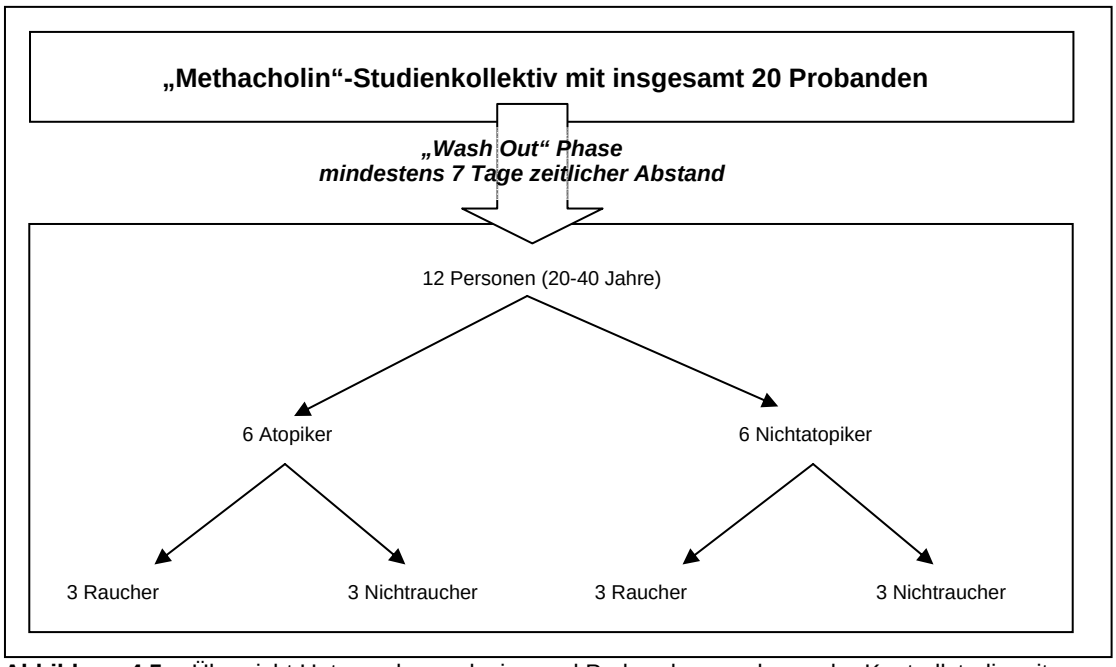


Abbildung 4.5: Übersicht Untersuchungsdesign und Probandenzuordnung der Kontrollstudie mit 0,9%iger NaCl-Lösung als Inhalationsmittel.

4.2.3 Einverständnis der Probanden und Votum der Ethikkommision:

Nach eingehender Aufklärung über die Untersuchung willigte der Proband schriftlich ein, an dieser Studie teilzunehmen.

Die beantragte Zustimmung dieser Studie durch die Ethikkommission ergab ein positives Votum (Nummer der Ethikkommission 10/06).

4.3 Gewinnung und Sammlung von Atemkondensat

Zur Gewinnung und Sammlung von Atemkondensat wurde das ECoScreen™ Gerät der Firma Jaeger/Toennies GmbH (*Viasys Healthcare, Höchberg/Bayern*) eingesetzt.

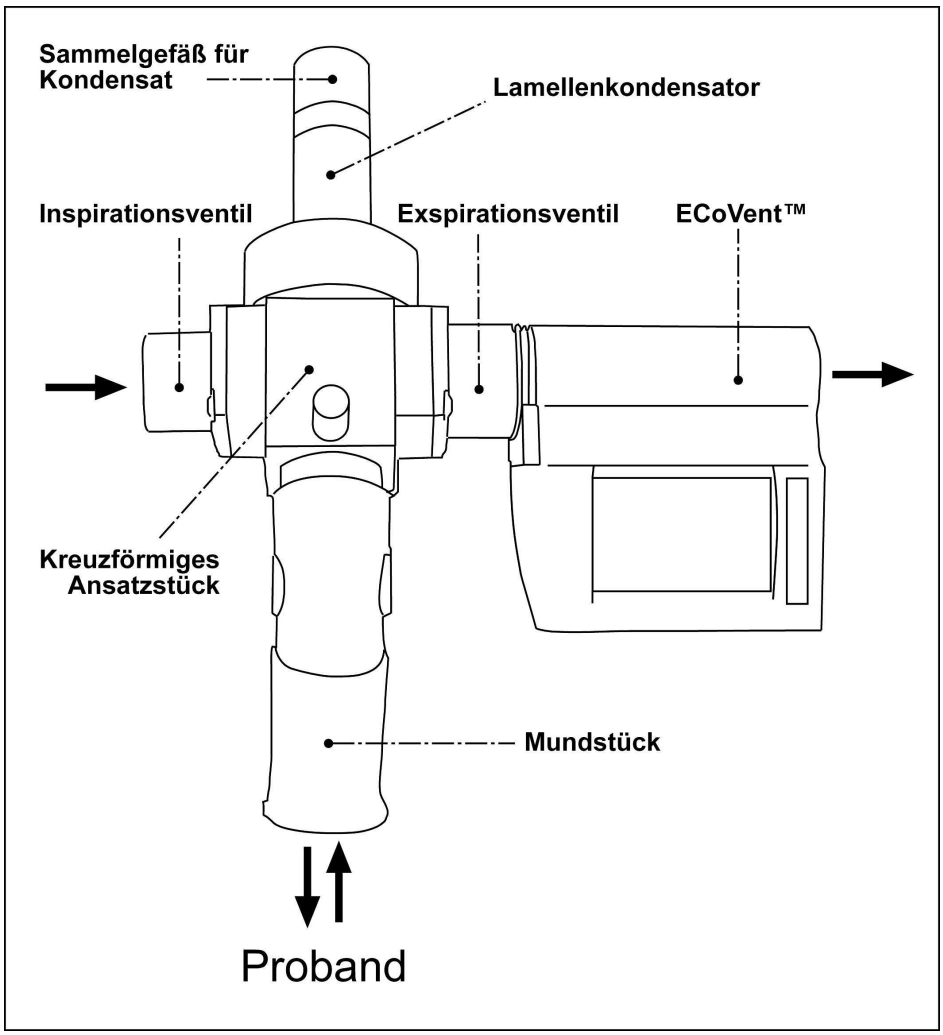


Abbildung 4.6: Detailzeichnung zum Aufbau des ECoScreen™ Gerätes im Rahmen dieser Studie

Das im Rahmen dieser Studie verwendete ECoScreen™ Gerät setzt sich, wie aus der Abbildung 4.6 zu entnehmen ist, aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Lamellenkondensator mit Kühlsystem
- Sammelgefäß für das Atemkondensat
- Inspirations- und Exspirationsventil
- Mundstück
- ECoVent™ Gerät der Firma Jaeger/Toennis GmbH (*Viasys Healthcare*)
- Kreuzförmiges Ansatzstück

Das Sammelgerät ist nach einer initialen Abkühlphase von ca. 15 Minuten betriebsbereit, da nach dieser Laufzeit die Kühlvorrichtung die erforderliche Temperatur zur Kondensation von -30℃ au fweist.

Nach entsprechender Kühlzeit nahm der Proband vor dem Mundstück des ECoScreen™ in aufrechter Sitzposition Platz. Um eine reine Mundatmung bei der

Sammlung der Atemkondensatprobe zu gewährleisten, wurde die Nase des Probanden mit einer Nasenklemme verschlossen und so die mögliche Nasenatmung unterbunden.

Der Proband wurde nun dazu angehalten für die Dauer von 15 Minuten, ruhig mit 12-20 Atemzügen pro Minute *(„Ruheatmung“)* in das am Gerät angeschlossene Mundstück zu atmen.

Zur „Atemkontrolle“ und zur Standardisierung der Atemkondensatnahme dient hierbei das am Exspirationsventil des ECoScreen™ angeschlossene ECoVent™. Beim ECoVent™ handelt es sich um ein Messgerät zur Ventilationsmessung, welches Atemzyklen aus dem rein exspiratorischen Atemstrom differenziert und per LCD-Anzeige dem Anwender zur Verfügung stellt.

Die vom ECoVent™ dokumentierten Parameter sind das kumulierte exspiratorische Volumen, die effektive Atemdauer, sowie als gleitender Mittelwert über die jeweils 5 letzten Atemzüge die Parameter Atemzugvolumen, exspiratorischer Peakfluss, Minutenvolumen und Atemfrequenz.

Dieses ermöglichte den Probanden ihre Atemfrequenz während der Probennahme zu kontrollieren und so die vorgegebene Zielatemfrequenz (*12-20 Atemzügen/Minute*) einzuhalten.

Vorteilhaft war die Dokumentation der effektiven Atmungszeit durch das ECoVent™. Unterbrechungen, wie sie bei Hustenreiz oder beim Schlucken auftreten können, wurden dabei von der vorgegebenen Sammelzeit (*hier: 15 Minuten*) ausgeklammert. Der Proband konnte also seine Probengabe bei Hustenreiz oder ähnlichem ohne Auswirkungen auf die Probengewinnung unterbrechen und anschließend unverändert fortfahren.

Bei der Atemkondensatsammlung gelangen die in- und die exspirierte Luft über unterschiedliche Wege in bzw. aus dem Gerät (siehe hierzu auch Abb.1.1):

Während bei der Inspiration die Luft ohne Umleitung fließt, wird die ausgeatmete Luft über einen Lamellenkondensator geleitet. Diese unterschiedliche Leitung der Luft ist durch einen Nichtrückatmungsventilblock gesichert.

Der Lamellenkondensator, durch den die ausgeatmete Luft strömt, besteht aus biologisch inerten, chemisch- und kälte-resistenten Aluminium, das auf -30℃ gekühlt wird. Die exspirierte Luft, die beim Verlassen des Körpers eine Temperatur von 37℃ hat, wird so auf eine Temperatur von ca. -10℃ heruntergekühlt und die nichtflüchtigen Bestandteile kondensieren entlang der teflonbeschichteten Wand des Lamellenkondensators in das Sammlungsgefäß (Abb. 4.7).

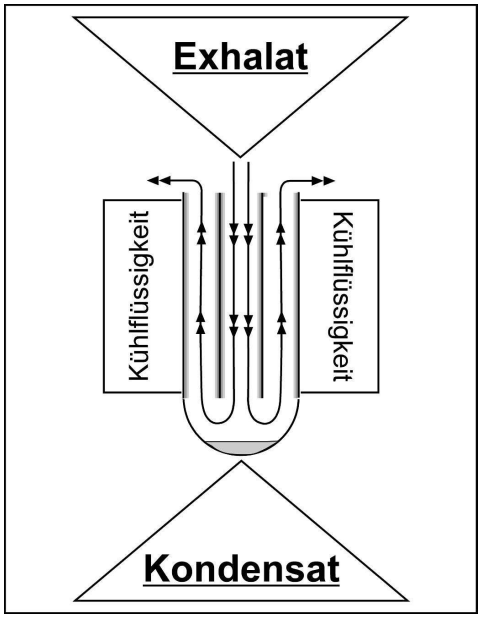


Abbildung 4.7: Schemazeichnung: Gegenstromprinzip (nach Fa. Erich Jaeger Medizintechnik GmbH, Würzburg)

In der vorgegebenen Sammelzeit von 15 Minuten effektiver Atmungsdauer wurde bei Ruheatmung des Probanden eine ausreichende Menge von etwa 1-3 ml Atemkondensat gewonnen.

Unmittelbar nach der Gewinnung der Atemkondensatproben wurde das Atemkondensat in Eppendorfgefäße zu je 0,6 ml und 1,2 ml aliquotiert. Anschließend wurden die Aliquots umgehend in einer eisgekühlten Kühlbox zum Kühlschrank transportiert und hierin bei -80℃ tiefgefroren gelage rt.

4.4 Spirometrie und Bodyplethysmographie

Bei der Spirometrie und der Bodyplethysmographie handelt es sich um Messverfahren in der Lungenfunktionsdiagnostik.

Während die Spirometrie (*inklusive Fluss-Volumen-Kurve*) lungenfunktionsanalytisch nur Basiswerte liefert, erlaubt die apparativ aufwendigere Bodyplethysmographie darüber hinaus eine erweiterte Analyse der Atemmechanik.

So können bei der *Bodyplethysmographie* bzw. *Ganzkörperplethysmographie* zusätzlich zur normalen Spirometrie der Atemwegswiderstand (*Resistance*) und die totale Lungenkapazität (TLC) inklusive der funktionellen Residualkapazität (RV) bestimmt werden.

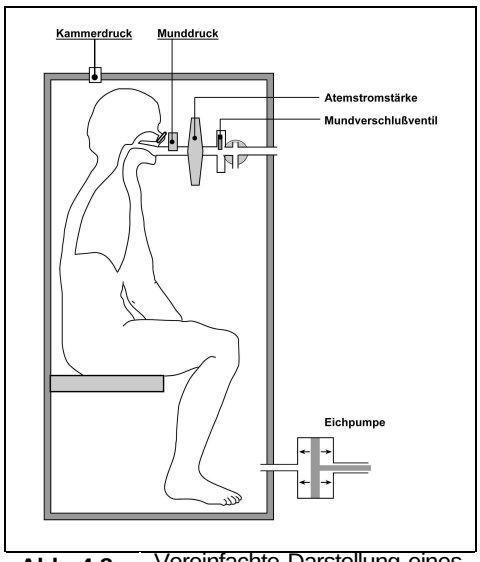


Abb. 4.8: Vereinfachte Darstellung eines Bodyplethysmographen (*nach Schmidt, Thews*)

Bei dem in dieser Studie verwendeten Bodyplethysmographen handelte es sich um das *MasterScreen® Body-System* der Firma Jaeger/Toennies GmbH (Viasys Healthcare, Höchberg/Bayern). Mit diesem Gerät sind neben der Bodyplethysmographie auch spirometrische Messungen möglich.

Dies ermöglichte den in dieser Studie durchgeführten einzeitigen Untersuchungsablauf von Bodyplethysmographie und Spirometrie.

Der *MasterScreen®* Bodyplethysmograph *(Abbildung 4.8)* besteht aus einer luftdichten Kammer mit einem Fassungsvolumen von etwa 700-1000 Liter Raumluft. Verschiedene Messfühler und Drucksensoren (*z.B. Pneumotachograph, etc.*) registrieren die einzelnen messbaren Parameter und übermitteln diese zur Aufzeichnung und Auswertung an den angeschlossenen Computerarbeitsplatz (*MasterLab Pro®; Jaeger/Toennies GmbH*).

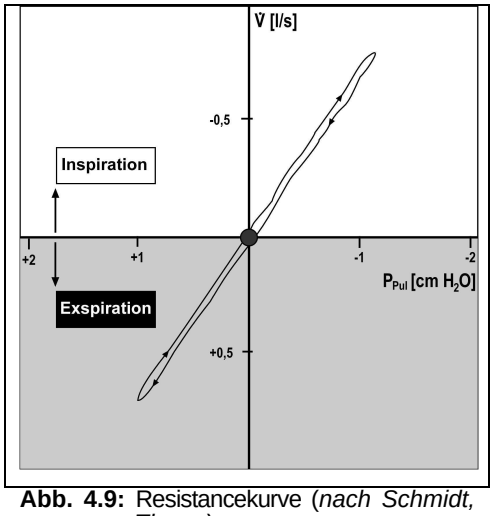


Abb. 4.9: Resistancekurve (*nach Schmidt, Thews)*

Vor der Durchführung der Bodyplethysmographie bzw. der Spirometrie muss der MasterScreen® Body entsprechend kalibriert werden (*nach American Thoracic Society, 1995*).

Der zu untersuchende Proband hatte sich in der Kabine auf einen Stuhl zu setzen. Bei noch geöffneter Tür wurde dem Probanden zunächst die Reihenfolge der Messungen erklärt und danach auf seinen korrekten Sitz innerhalb der Messkammer geachtet. Dabei war auf eine aufrechte Sitzposition des Probanden zu achten. Das Mundstück und die Sitzhöhe wurden hierfür auf die individuelle Körpergröße des Probanden abgestimmt. Um eine adäquate und valide Messung erzielen zu können, wurde der Proband angehalten, seine Nase mit einer Nasenklemme zu verschließen und so die Nasenatmung zu unterbinden.

Der Proband umfasste mit seinen Lippen das Gummimundstück und achtete darauf, dass keine Luft neben dem Mundstück entweichen konnte. Nun wurde die

Türe verschlossen und der Proband wurde aufgefordert ruhig (*Atemfrequenz: ~16 Atemzüge pro Minute*) ins Mundstück zu atmen. Hierbei wurden über den Pneumotachographen die Atemstromstärke V [l/s] und über den Drucksensor die atembedingten Druckänderungen (P_{Pul} [cm H_2O]) innerhalb der Kabine gemessen.
Am Computer wurden bei dieser Messung so genannte „Resistanceschleifen“ *(Resistancekurven, siehe Abb.4.9)* ermittelt. Die Messung erfolgte solange, bis fünf deckungsgleiche dieser Strömungswiderstandskurven zur Verfügung standen. Die Auswahl der Resistancekurven erfolgte durch den Computer; bei Bedarf war eine Korrektur durch den Untersucher möglich.

Als nächste Messung folgte die Registrierung der Verschlussdruckkurve. Hierbei wird das Verhältnis zwischen Alveolardruckschwankung und Kammerdruckschwankung nach Unterbrechung des Atemstromes durch Verschluss des Atemrohres ermittelt. In der praktischen Durchführung wurde hierzu das Mundstück vor einer Inspirationsphase des Probanden durch den Untersucher per Magnetverschluss geschlossen. Der Proband wurde dazu angehalten, auch gegen den Verschluss des Mundstückes, weiter normal zu atmen. Der Munddruck entsprach hierbei dem Alveolardruck.
Alveolardruck und Kammerdruck wurden aufgezeichnet und am Computer in einer Grafik (=*Verschlussdruckkurve*) gegeneinander aufgetragen (*Abb 4.10*).
Diese Messung wurde mehrmals wiederholt bis zwei zuverlässige, weitestgehend übereinstimmende Verschlussdruckkurven aufgezeichnet wurden.

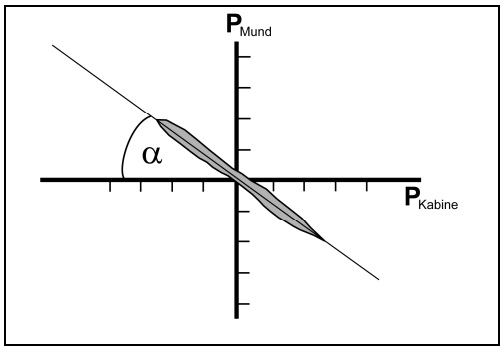


Abb. 4.10: Beispiel für eine Ganzkörperplethysmographische Verschlußdruckkurve mit Winkel α. (X-Achse = Kammerdruck, Y-Achse=Munddruck) [*modifiziert nach Ulmer (1998)*]

Mit Hilfe des in der Verschlussdruckkurve bestimmbaren α-Winkels wurde das intrathorakale Gasvolumen (*ITGV*) berechnet.
In der nächsten Phase der Untersuchung folgte nach Durchführung der Bodyplethysmographie die Spirometrie. Hierzu wurde die Kabinentür wieder geöffnet.
Bei der Spirometrie hatte sich der Proband auch weiterhin in aufrechter Haltung und mit aufgesetzter Nasenklammer vor dem Mundstück zu platzieren.
Der Proband atmete auf Anweisung wieder in Ruheatmung in das Messgerät ein und aus. Auf ein Kommando wurde der Proband dazu aufgefordert, so tief wie möglich auszuatmen und im direkten Anschluss so tief wie möglich wieder einzuatmen. Auf eine Phase der maximalen Exspiration folgte demnach eine Phase

der maximalen Inspiration. Dieses Atemmanöver wurde so lange wiederholt bis mindestens zwei akzeptable Messergebnisse vorlagen. Das Ergebnis war die jeweils individuell maximale Ausatemgrenze (ERV, exspiratorisches Reservevolumen) einer Testperson.

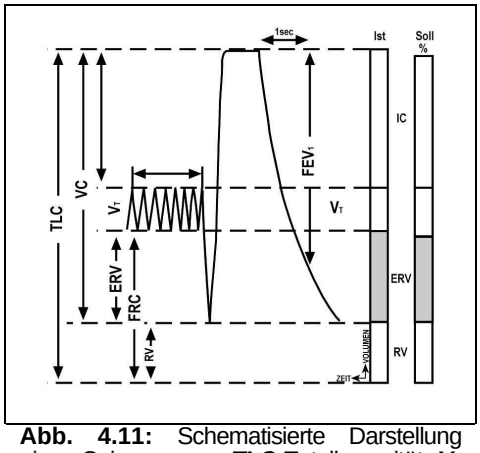


Abb. 4.11: Schematisierte Darstellung eines Spirogramms. ***TLC*** Totalkapazität, V_T Atemzug-volumen, ***IRV*** inspiratorisches Reservevolumen, ***ERV*** exspiratorisches Residualvolumen, ***FRC*** funktionelle Residualkapazität, ***RV*** Residual-volumen (*Quelle: Petro u. Konietzko 1989*)

Anschließend wurde der Proband wieder dazu aufgefordert ruhig weiter zu atmen.

Der nächste Schritt der Spirometrie war die Registrierung der Fluss-Volumenkurve.

Hierzu hatte der Proband eine möglichst tiefe Inspiration mit direkt darauf folgender möglichst schneller – d.h. stoßartiger – Exspiration auszuführen. Dieses Atemmanöver diente der Bestimmung der Vitalkapazität (VC) und der Forcierten Exspiratorischen Sekundenkapazität (FEV1). Die Messung erfolgte unter Bildschirmkontrolle solange, bis mindestens zwei deckungsgleiche Kurvenverläufe vom System registriert wurden. Als Ergebnis wurde jeweils der größte gemessene VC- oder FEV1-Wert vom Computersystem festgehalten.

Zum Abschluss der Untersuchung wurden die Messergebnisse der Bodyplethysmographie und der Spirometrie vom Computersystem zusammengefasst und den jeweiligen Referenzwerten nach ERS/EGKS [*Quanjer et al. (1993)*] gegenübergestellt.

Neben der Bildschirmausgabe erfolgte eine zusammenfassende Ausgabe in graphischer und tabellarischer Form als Ausdruck (*siehe Anhang: 9.3 und 9.4*).

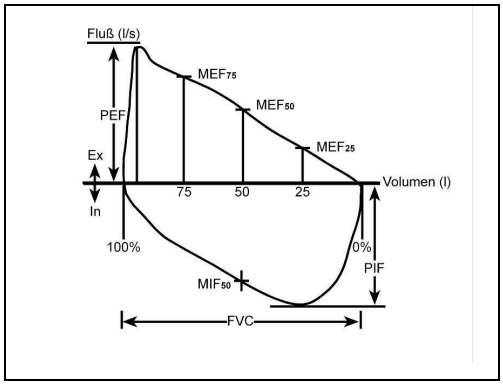


Abb. 4.12: Schematisierte Darstellung eines Fluss-Volumenkurve. X-Achse=Volumen, Y-Achse=Fluss. Unterhalb der Volumenachse ist die Inspiration, oberhalb die Exspiration dargestellt. PEF=exspiratorischer Spitzenfluss, MEF75, MEF50, MEF25=max. exspiratorischer Fluss bei 75, 50 bzw. 25% in der Lunge befindlicher Vitalkapazität. PIF= inspiratorischer Spitzenfluss, FVC= forcierte Vitalkapazität (*Quelle: Petro u. Konietzko 1989*)

Für eine weiterreichende Lektüre zum Thema Bodyplethysmographie bzw. Spiroergometrie empfehlen sich die Schriften der *ATS/ERS Task Force* [*Standardisation of lung function testing (2005)*] und WT Ulmer [*Lungenfunktionsmanual (1998)*].

4.5 Provokationstest mit Methacholin

Methacholin (Acetyl-β-Methylcholinchlorid) ist die Standardtestsubstanz, die bei der unspezifischen Provokation ihre Anwendung findet. Das Methacholin lag als kristallines Pulver (0,096 g Methacholinchlorid, Fa. Synopharm) vor und wurde kühl gelagert. Zur Applikation bei der Provokation wurde eine 3,2%-ige Methacholinlösung hergestellt, in dem das Pulver mit 3 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung (*0,9% NaCl-Lösung*) verdünnt wurde. Die angemischte Methacholinlösung unterliegt einer begrenzten Haltbarkeit, da das Zersetzungsrisiko durch basenkatalysierte Hydrolyse sehr hoch ist. Das Reaktionsprodukt dieses Verfalls ist die Essigsäure. Der pH-Wert einer angemischten Methacholinlösung ist leicht bis moderat sauer. Bei einem pH-Wert von 6 oder größer wird Methacholin rapide hydrolysiert [*Watson et al, 1998*]. Aufgrund dieser Tatsachen wurden die Methacholinlösungen am Tag der Untersuchung angemischt und maximal einen Tag bei 4℃ im Kühlschrank aufbewahrt *[American Thoracic Society (2000)].* Zur Vermeidung einer bakteriellen Verunreinigung wurden bei der Anmischung und Herstellung der Methacholinlösung immer sterile Injektionsnadeln und Kanülen verwendet. Im Gegensatz zu einigen industriell vorgemischten Methacholinlösungen, enthielt die verwendete Stammlösung keinen Anteil Phenol.

Den Probanden wurde jeweils vor Untersuchungsbeginn der genaue Testablauf eingehend erklärt. Die Probanden wurden angehalten, auch kleine Symptome wie Hustenreiz oder Brustenge während der Testung mitzuteilen, um die Testreihe ggf. pausieren oder bei Bedarf umgehend abbrechen zu können. Eine weitere Voraussetzung war, dass der Proband in der Lage war, die Atemmanöver durchführen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Atemmanöver dem Probanden nochmals erklärt und gegebenenfalls noch einmal geübt. Vor Testbeginn wurde durch eine Auskultation ein auffälliger Lungenbefund ausgeschlossen.

Die Sitzposition wurde für den Probanden so eingestellt, dass er eine aufrechte Oberkörperhaltung einnahm.

Während der Testung wurde die Nase des Probanden mit einer Nasenklemme verschlossen. Somit wird ein Entweichen des eingeatmeten Aerosols durch die Nase verhindert, um eine möglichst effiziente Wirkung des Methacholins zu erzielen.

Der Provokationstest kann nun nach dem „New Jaeger APS Protocol“ ablaufen:

Der Testablauf begann zunächst mit einer Ausgangsmessung, welche durch eine native Lungenfunktionsmessung entsprechend der oben beschriebenen Bodyplethysmographie und Spirometrie erfolgt.

Als zweiter Schritt wird durch die Inhalation einer Trägerlösung der Leerwert ermittelt. Bei dieser Leerwertermittlung diente isotone (*0,9%ige*) Kochsalzlösung als Trägerlösung. Zusätzlich hat diese erste Inhalation der isotonen Kochsalzlösung den Vorteil, dass der Proband sich mit der Inhalationstechnik am Vernebler vertraut machen und die Atemmanöver üben kann.

Der verwendete Vernebler (*APS Pro Medic Aid Side Stream Nebulizer®; Jaeger/Toennies GmbH*) verstäubt Partikel mit einer Größe von 3,2 µm (*MMD= mass median diameter*). An dem Vernebler ist ein Dosimeter angeschlossen, der nach dem „New Jaeger APS Protocol" unterschiedliche Dosen Methacholin zum Vernebeln verabreicht. Dieses 6-Stufen-Schema nach dem „New Jaeger APS Protocol" sieht folgendermaßen aus:

Tabelle 4.1*:* „New Jaeger APS Protocol" 3,2% Methacholin mit Vernebler APS Pro Medic Aid Sidestream

	Konzentration	***Dosis***	***kumulative Dosis***	***Inhalationszeit***	***Atemzüge***	***Einwirkzeit***
Basis	0,9% NaCl	-	-	-	-	-
1. Stufe	3,2% MTC	0,0256 mg	0,0256 mg	1 sec	1	2 min
2. Stufe	3,2% MTC	0,0450 mg	0,0706 mg	1 sec	1	2 min
3. Stufe	3,2% MTC	0,0900 mg	0,1606 mg	1 sec	2	2 min
4. Stufe	3,2% MTC	0,1800 mg	0,3406 mg	2 sec	3	2 min
5. Stufe	3,2% MTC	0,3600 mg	0,7006 mg	3 sec	5	2 min
6. Stufe	3,2% MTC	0,7200 mg	1,4206 mg	3 sec	8	2 min
Lyse	2 Hübe Berotec® N 100µg DA	0,2000 mg Fenoterol-hydrobromid	-	-	2	15 min

Die jeweiligen Aerosolmengen der oben aufgeführten Methacholin-Dosen sollen in normalen Ruheatemzügen eingeatmet werden. Im Anschluss an die Inhalation folgt zunächst jeweils eine Pause von zwei Minuten und daraufhin die lungenfunktionsanalytische Untersuchung.

Die folgenden Parameter wurden jeweils nach der Ruhepause von zwei Minuten durch die Bodyplethysmographie und die Spirometrie erfasst: die spezifische Resistance (sR_{tot}), der Atemwegsgesamtwiderstand (R_{tot}), das forcierte exspiratorische Sekundenvolumen (FEV_1) und das intrathorakale Gasvolumen (*ITGV*).

Gemäß Empfehlung der American Thoracic Society (*2000*) galt im Rahmen dieser Studie als Referenzwert zum Abbruch der Abfall der Sekundenkapazität (FEV_1) um 20% des Ausgangswertes.

Nach Erreichen des Testendes bzw. nach Abbruch der Testung aufgrund einer positiven Reaktion (FEV_1*=-20%)* erfolgte entsprechend des „*New Jaeger APS Protocol*“ die Inhalation eines β_2-Sympathomimetikums (*2 Hübe Berotec® N 100 µg Dosier-Aerosol; Dosierung pro Aerosolstoß: 0,1 mg Fenoterolhydrobromid*).
15 Minuten nach der Bronchospasmolyse wurden abschließend nochmals eine lungenfunktionsanalytische Untersuchung und eine Auskultation der Lungen vorgenommen.

4.6 Provokationstest mit isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl<u>aq</u>)

Um sicher zu stellen, dass ein potentieller Einfluss auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat allein durch die Inhalation von Methacholin verursacht wird, wurde analog bei einer zufälligen Stichprobe aus dem Studienkollektiv die Provokationstestung gemäß „New Jaeger APS Protocol“ mit 0,9%iger Kochsalzlösung anstatt 3,2%iger Methacholinlösung durchgeführt.
Die Kontrollgruppe stellte ein Subkollektiv von 12 Probanden aus dem gesamten Studienkollektiv von 20 Probanden dar und rekrutierte sich dabei zufällig und zu gleichen Anteilen aus den vier einzelnen Untergruppen dieser Studie.
Der Versuchsablauf war analog zur Provokationstestung mit Methacholin. Es wurde hierbei statt 3,2%iger Methacholinlösung eine 0,9%ige Kochsalzlösung nach dem 6-Stufen-Schema des „New Jaeger APS Protocols“ vernebelt und inhaliert.
Zwischen den beiden Provokationsmessungen wurde ein zeitlicher Abstand von mindestens 7 Tagen als „Wash-Out“ Phase festgelegt.
Eventuelle Einflüsse auf die Zusammensetzung des Atemkondensates durch den Provokationstest selbst bzw. durch die durchgeführten Atemmanöver sollten dadurch erkannt werden.

4.7 Probenaufbereitung und Bestimmung der Konzentration von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat

Die Probenaufbereitung der einzelnen gesammelten Atemkondensatproben und die anschließende Messung der darin enthaltenen 3-Nitrotyrosinkonzentration erfolgte standardisiert nach dem Protokoll des Labors des Instituts der Arbeitsmedizin und Sozialmedizin der RWTH Aachen *[Göen et al. (2005)]*.

Mit dem Verfahren lässt sich der Gehalt von 3-Nitrotyrosin in Atemkondensat im gesamten pg/ml-Bereich quantitativ erfassen.

Das Verfahren basiert auf einer Festphasenextraktion an Reverse-Phase-Material bei dem der Clean-up sowie eine Anreicherung um den Faktor 10 stattfindet. Die analytische Bestimmung erfolgt mittels LC-ESI-MS/MS im SRM-Modus. Als interner Standard wird 3,5-Dinitrotyrosin verwendet.

4.7.1 Geräte und Chemikalien:

4.7.1.1 *Geräte:*

- Agilent HPLC-System Serie 1100 mit Degasser G1379A, Binärer Pumpe G1312A und Probengeber G1379A
- HPLC-Säulenofen: Thermsphere TS-130 (Phenomenex)
- API3000 Triplequadrupol-Massenspektrometer (Applied Biosystems) mit Turbo-Ion-Spray-Quelle (ESI)
- Mikroflaschen aus Polypropylen (Agilent 9301-0978)
- Bördelgläser, 1,8mL (MN Art 70201HP)
- Reaktionsgefäße, 2 ml (Eppendorf)
- Bördelgläser, 5 mL (MN Art 70204)
- Pipetten
- SPE-Anlage von Baker
- N_2-Begasungsvorrichtung

4.7.1.2 *Chemikalien:*

- Ammoniumacetat, p.a. (Merck, Damstadt)
- Methanol, SupraSolv (Merck, Darmstadt)
- Nitrotyrosin (Cayman, USA, Catalog No 89540)
- Extraktionssäulen C18 POLAR RP, 100 mg (Baker)
- Zorbax SB-Phenyl, 3,5 µm Korngröße (2,1 x 100 mm) (Agilent)
- Essigsäure, 100 % (Merck)
- 3,5-Dinitro-L-Tyrosin (Aldrich)

4.7.1.3 *Lösungen:*

- Elutionslösung:

  Zur Herstellung der Elutionslösungen werden zunächst 7,71 g NH_4Ac in 1l destilliertes Wasser gelöst (100 mM NH_4Ac). Diese Lösung wird mit destilliertem Wasser um den Faktor 1 zu 50 verdünnt (2 mM NH_4Ac). Danach werden 600 mL diese 2mM NH_4Ac-Lösung mit 400 mL MeOH gemischt und anschließend der pH mit Essigsäure auf 4,35 eingestellt.

- Waschlösung:

  Zur Herstellung der Waschlösung wird die 2 mM NH_4Ac-Lösung mit 10%iger Essigsäure auf pH 4,35 eingestellt.

- Resuspensionslösung und Laufmittel A:

  Zur Herstellung dieser Lösung werden zunächst 7,71 g NH_4Ac in 1 l destilliertem Wasser gelöst (100 mM NH_4Ac). Diese Lösung wird mit destilliertem Wasser um den Faktor 1 zu 50 verdünnt (2 mM NH_4Ac). Danach werden 980 mL diese 2 mM NH_4Ac-Lösung mit 20 mL MeOH gemischt und anschließend wird der pH mit Essigsäure (ca. 3 ml) auf 3,4 eingestellt. Diese Lösung dient sowohl als Resuspensionslösung als auch als Laufmittel A für die HPLC.

- Laufmittel B:

  Zur Herstellung dieser Lösungen werden zunächst 7,71 g NH_4Ac in 1 l destilliertem Wasser gelöst (100 mM NH_4Ac). Diese Lösung wird mit destilliertem Wasser um den Faktor 1 zu 25 verdünnt (4 mM NH_4Ac). Danach werden 500 mL diese 4 mM NH_4Ac-Lösung mit 500 mL MeOH gemischt und anschließend der pH mit konz. Essigsäure (ca. 12 ml) auf 3,5 eingestellt.

- Interner Standard:

  Zur Herstellung einer Stammlösung des Internen Standards (Lsg. 1) wurden 10 mg Dinitrotyrosin in 10 ml 2mM NH_4Ac-Lösung aufgelöst (1 mg/mL). Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde zunächst Lsg. 1 mit 2mM NH_4Ac-Puffer um den Faktor 1:100 verdünnt. Die resultierende Lösung (Lsg. 2) besaß eine Konzentration von 100 ng/ml. Durch weiteres Verdünnen von 100 µl der Lsg. A in 9900 µl 2mM NH_4Ac-Puffer ergab sich die Gebrauchslösung (1000 pg/ml). Die Gebrauchslösung des Internen Standards wurde in Aliquote a 150 µl portioniert und bei -80℃ gelagert. Alle anderen Lösungen des inter nen Standards wurden ebenfalls bei -80℃ gelagert.

- Kalibrierstandards:

  Zur Herstellung der Nitrotyrosin-Stammlösung (Lsg. B) wurden 10 mg in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit 2mM NH_4Ac-Lösung bis zur Marke aufgefüllt (1 mg/mL). Danach wurden 40 µl dieser Lösung in einen 20ml Messkolben überführt und dieser mit 2mM NH_4Ac-Lösung bis zur Marke aufgefüllt (Lsg. C: 2000 ng/mL). Die nächste Zwischenlösung (Lsg. Z) diente zur Dotierung der Kalibrierstandards. Dazu wurden 20 µl der Lsg. C in einen

20 ml Messkolben überführt und dieser 2mM NH4Ac-Lösung bis zur Marke aufgefüllt (2000 pg/mL). Die Herstellung der Kalibrierstandards erfolgte mit 2mM NH_4Ac-Lösung nach folgendem Pipettierschema (*Tabelle 4.2*):

Tabelle 4.2*:* Pipettierschema für die Herstellung des Kalibrierstandards mit 2 mM NH_4A_c-Lösung.

Endkonzentration	Dotier-Lösung	Volumen der Dotierlösung	Volumen der End-Lösung
10 pg/ml NT	Z	50 µl	10 ml
15 pg/ml NT	Z	75 µl	10 ml
25 pg/ml NT	Z	125 µl	10 ml
50 pg/ml NT	Z	250 µl	10 ml
75 pg/ml NT	Z	375 µl	10 ml
100 pg/ml NT	Z	500 µl	10 ml
125 pg/ml NT	Z	625 µl	10 ml
150 pg/ml NT	Z	750 µl	10 ml
250 pg/ml NT	Z	1250 µl	10 ml
500 pg/ml NT	Z	2500 µl	10 ml

4.7.2 Probenaufbereitung:

Die Baker SPE-Anlage wurde mit 5mL Bördelgläsern und den Bakerbond SPE C_{18}-Säulen bestückt. Vor der Probenextraktion wurden SPE-Säulen zunächst viermal mit je 1 ml der Elutionslösung und anschließend mit 1 mL der Waschlösung konditioniert. Dabei durfte das Festphasenmaterial nicht trocken laufen.

Anschließend wurden 500 µL Atemkondensat bzw. Standardlösung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und mit 50 µL 5%ige Essigsäure angesäuert. Dazu wurden 100 µL der Gebrauchslösung des Internen Standards (Lsg. G) gegeben.

Diese Probenmischungen wurden mit dem Vortex-Schüttler durchmischt und mit Hilfe von Pasteurpipetten auf die Säulen aufgeben. Nach Durchlauf der Probenlösung wurde mit 1ml Waschlösung gewaschen. Nach kurzem Vollvakuum (Entfernung der Waschlösung) wurden die 5ml Bördelgläser gegen 1,8ml Bördelgläser ausgetauscht. Das Eluieren erfolgte mit 1,4 ml Elutionslösung. Durch das Anlegen des Vollvakuums an die SPE-Station (1 min) wurde die Elution abgeschlossen. Danach wurden die Eluate im N_2-Strom unter leichtem Erwärmen (bis ca. 50℃) bis zur Trockene eingeengt und die Rückstände in 50 µl Resuspensionslösung aufgenommen. Die so gewonnenen Analysenlösungen wurden in High-Recovery-Mikroflaschen aus Polypropylen überführt. Die

Mikroflaschen wurden mit Schnappverschlüssen verschlossen. Eventuell vorliegende Luftblasen, die im Spitzboden der Mikroflasche eingeschlossen waren, wurden durch leichtes Klopfen entfernt und die Probengefäße in den Autosampler des LC-MS/MS-Systems gestellt.

4.7.3 Instrumentelle Arbeitsbedingungen:

Programm: NT-PhenylHexyl

HPLC-Säule : BETASIL Phenyl-Hexyl, 3 µm Korngröße (2,1 x 100 mm) zzgl. entsprechender Vorsäule (Thermo Electron), thermostatisiert bei 30℃ (HPLC-Säulenofen)

Mobile Phase:

Als mobile Phase wurde bei der HPLC mit den Laufmitteln A und B folgendes Gradientenprogramm verwendet (*Tabelle 4.3*):

Tabelle 4.3*:* Gradientenprogramm der HPLC mit den Laufmitteln A und B.

Zeit (min)	Fluss (µl/min)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
0,00	280	100,0	0,0
1,00	280	100,0	0,0
1,50	280	90,0	10,0
2,00	280	90,0	10,0
2,50	280	80,0	20,0
4,50	280	80,0	20,0
6,00	280	100,0	0,0
12,00	280	100,0	0,0

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektor : API 3000 Triple-Quadropol-Massenspektrometer
Ionisationsquelle : ESI, Turboion-Spray

Auswertemaske: NT-PhHex.qmf

Tabelle 4.4*:* Auswertemaske

Analyt	SRM	SRM	Retensionszeit
	Quantifier	Qualifier	(min.)
3-Nitrotyrosin	227,0 / 180,9	227,0 / 90,0	7,2
3,5-Dinitrotyrosin	272,0 / 225,9		4,2

4.7.4 Präzision:

4.7.4.1 *Präzision in der Serie:*

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurden für die Analyten zwei Konzentrationen hergestellt: Je Konzentration wurden 10 Proben parallel aufgearbeitet und analysiert. Die Untersuchungen ergaben folgende relative Standardabweichungen (RSD):

Tabelle 4.5*:* Relative Standardabweichung der Nitrotyrosinkonzentration bei 15 pg/ml und bei 250 pg/ml.

Analyt	15 pg/ml	250 pg/ml
3-Nitrotyrosin	20,7 %	5,0 %

4.7.4.2 *Wiederfindung:*

Zur Ermittlung der aufarbeitungsbedingten Verluste wurden Kalibrierstandards in Doppelbestimmung gemäß der Vorschrift aufgearbeitet. Aus der ermittelten Kalibrierkurve wurde die Steigung berechnet.

Für die 100%-Bezugswerte wurden Kalibrierstandards gemäß dem theoretischen Anreicherungsfaktor von 10 direkt in Resuspensionslösung hergestellt und in der gleichen Serie wie die aufgearbeiteten Proben analysiert. Auch hier wurde aus der ermittelten Kalibrierkurve die Steigung berechnet.

Der direkte Vergleich beider Steigungen ergab eine Wiederfindung von 85,0%.

4.7.4.1 *Nachweisgrenze:*

Die Nachweisgrenze für 3-Nitrotyrosin wurde nach DIN 32645 mit 2,5 pg/ml bestimmt. Auf der Grundlage einer relativen Ergebnisunsicherheit von 33 % resultierte daraus eine sichere Bestimmungsgrenze von 8,5 pg/ml.

4.8 Statistische Methoden: Erfassung und Analyse der gemessenen Nitrotyrosinwerte und der gesammelten Probandendaten

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte für die Provokationstestung mit Kochsalzlösung und für die Provokationstestung mit Methacholin unabhängig voneinander, aber analog unter Anwendung derselben Methode.
Somit ergab sich für die Auswertung der Untersuchung ein Modell mit zwei Einflussvariablen mit jeweils zwei Ausprägungen.
Die erste interessierende Einflussvariable war der Atopiestatus („*Atopie*“) der teilnehmenden Probanden und differenziert zwischen einer positiven und einer negativen Anamnese gemäß der in dieser Studie verwendeten Definition von Atopie.
Die zweite interessierende Einflussvariable wurde als „Raucher“ bezeichnet. Für das Probandenkollektiv bedeutet dies die Unterscheidung in Raucher und Nichtraucher gemäß der in dieser Studie verwendeten Definition des Begriffes „Raucher“.
Entsprechend des Studienaufbaus gliederte sich die Experimentalgruppe bei Betrachtung von nur einer dieser Variablen in zwei Gruppen von je 50% des Gesamtkollektivs oder unter gleichzeitiger Betrachtung beider Variablen in vier gleichmäßig verteilte Untergruppen mit einem Gesamtanteil von je 25% des Gesamtkollektivs.

Die Nitrotyrosinkonzentration (in pg/ml) wurde zu jeweils drei Zeitpunkten (vor [=*Zeitpunkt T0*], 15 Minuten nach [=*Zeitpunkt T1*] und 90 Minuten nach [=*Zeitpunkt T2*] Provokationstestung mit Methacholin bzw. Kochsalzlösung) gemessen.
Die gemessenen Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden entsprechend als NTYR0, NTYR1 bzw. NTYR2 bezeichnet.

Außerdem wurde zusätzlich für die weitere Analyse der ermittelten Messergebnisse für Methacholin als Agens, die von jedem Probanden inhalierte kumulative Dosis Methacholin als eine weitere Zielgröße der Untersuchung erfasst.

4.8.1 Datenverarbeitung:

Die erhobenen Daten wurden nach Erfassung und Kontrolle in einer Datenbank unter Anwendung der Software SPSS 12.0 (*SPSS GmbH Software, München*) gesammelt und sortiert. In diesem Programm erfolgte die Pseudonymisierung der

personenbezogenen Daten nach ID-Nummern (*MTC01-MTC20, NACL01-NACL12*) und die Zuordnung zu einer der vier definierten Untergruppen.
Über die Exportfunktion von SPSS 12.0 wurden die Daten in *Microsoft® Excel® 2003* importiert. Die ergänzenden Tabellen und Grafiken wurden mit der Tabellenkalkulation *Microsoft® Excel® 2003* erstellt und berechnet.
Zur analytischen Auswertung der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm SAS Version 9.1 des SAS Institute Inc. herangezogen, in das die im Excelformat exportierten Daten zur weiteren statistischen Auswertung transferiert wurden.

4.8.2 Deskriptive Statistik:

Alle erhobenen Messwerte (*NTYR0, NTYR1, NTYR2*) wurden zunächst deskriptiv ausgewertet. Für das Gesamtkollektiv, für die beiden Einflussvariablen Raucher/Nichtraucher bzw. Atopiker/Nichtatopiker und für jede der vier Untergruppen wurde separat für jeden Messwert sowohl der Mittelwert samt einfacher Standardabweichung, als auch der Median mit den zwei Quartilen (Q_{25}; Q_{75}) und den Extremwerten bestimmt.
Die Mittelwerte samt einfacher Standardabweichung wurden ermittelt, da bei der statistischen Analyse parametrische Testverfahren verwendet wurden. Zur Charakterisierung der Daten müssen deshalb jeweils Mittelwert und Standardabweichung mit angegeben werden.
Die Berechnung der Medianwerte diente einer weiteren Beschreibung der Verteilung der Messwerte. Medianwerte sind im Vergleich zum Mittelwert robuster gegenüber extremen Messwerten. Vor allem bei einer kleinen Anzahl Messwerte kann der Mittelwert durch Ausreißer weit abseits der Masse aller Werte zum Liegen kommen. Ein Medianwert liegt dagegen konstruktionsbedingt stets in der Mitte der Messwerte.

Für die grafische Darstellung im Rahmen dieser Studie wurden die Mittelwerte samt einfacher Standardabweichung dargestellt. Der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte wurden in Form von Boxplots dargestellt. Die Whisker der Boxplots reichen vom Minimum bis zum Maximum der dargestellten Daten.

Für die Provokationstestung mit Methacholin wurde als zusätzliche Analyse im Sinne einer weiteren Standardisierung der Ergebnisse für jeden Probanden die Differenz der ermittelten 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat untereinander zu den jeweiligen Zeitpunkten T0, T1 und T2 ermittelt, und mit der jeweils individuell unterschiedlichen kumulativen Dosis Methacholin verglichen.

Dazu wurde der Quotient aus der Differenz der Messwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten ($\Delta T0\text{-}T1$; $\Delta T0\text{-}T2$; $\Delta T1\text{-}T2$) mit der jeweils individuell aufgenommenen kumulativen Dosis Methacholin gebildet.
Diese Normalisierung der Messwerte auf die kumulierte Dosis Methacholin sollte einer weiteren Standardisierung der Testergebnisse dienen.

Für die weitere statistische Analyse wurde das Statistikprogramm SAS Version 9.1 des SAS Institute Inc. herangezogen:
Zum Vergleich der Nitrotyrosinkonzentration (*bzw. kumulativen Methacholindosis*) zu den verschiedenen Zeitpunkten und zwischen den verschiedenen Gruppen (*Raucher/Nieraucher, Atopiker/Nichtatopiker*) wurde ein varianzanalytisches Modell mit Messwiederholung (*repeated measures ANOVA*) angepasst.

An dieser Stelle sei für eine weitergehende Beschreibung dieser Methode auf die Schrift „Applications of Multivariate Analysis of Variance to Repeated Measures Experiments" von J.W. Cole und J.E. Grizzle, J. E. (*1966*) verwiesen.

Aufgrund des explorativen Studienansatzes wurde keine Adjustierung des Signifikanzniveaus vorgenommen. D.h. alle Tests wurden mit einem Signifikanzniveau von 5% beurteilt, das beinhaltet, dass ein p-Wert ≤ 0.05 als statistisch signifikantes Ergebnis gewertet wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Probandenkollektiv:

20 Probanden wurden in die Studie aufgenommen. Davon kam jeder Proband zur Auswertung, d.h. es musste niemand von der Studie ausgeschlossen werden.

Das Probandenkollektiv (*n=20*) bestand zu 40% (♀=*8*) aus weiblichen und zu 60% (♂=*12*) aus männlichen Teilnehmern. Der Altersmedian lag bei 25 Lebensjahren, wobei zum Zeitpunkt der Messung der älteste Proband 40 Jahre und der jüngste Proband 22 Jahre alt waren.

Größe und Gewicht zeigten die typischen geschlechtsspezifischen Unterschiede, jedoch keine Auffälligkeiten.

Die Auswertung der Medikamentenanamnese ergab keine Einnahme von Medikamenten, die gemäß Vorgaben der American Thoracic Society und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin Einfluss auf eine Provokationstestung mit Methacholin hätten (*Tabelle 2.3*). Zwei Probanden der Studie (*beide Raucher/Nichtatopiker*) gaben den regelmäßigen Konsum von Vitamin C Präparaten an.

Die Anamnese bezüglich etwaiger Vorerkrankungen ergab bei keinem der Probanden eine zum Versuchszeitpunkt vorhandene oder zeitnah ausgeheilte Krankheit. Mit Bezug auf Atemwegserkrankungen hatten 2 Probanden in der Vergangenheit bereits einmal eine Bronchitis. Bei beiden Probanden lag diese Erkrankung allerdings länger als 3 Jahre zurück.

60% der männlichen Probanden und 40% der weiblichen Probanden waren bei dieser Studie definitionsgemäß Atopiker (♀=*4;* ♂=*6*). Dabei standen Atopien mit saisonalem Auftreten den Atopien mit nicht-saisonalem Auftreten im Verhältnis 1:1 gegenüber. Bei den rauchenden Atopikern hatten 80% eine Atopie mit saisonalem Auftreten und entsprechend 20% eine nicht-saisonale Atopie. Bei den nichtrauchenden Atopikern hatten 80% eine nicht-saisonale Atopie und 20% eine saisonale Atopie.

80% der Raucher waren männlich und 20% weiblich. Unter den Rauchern befanden sich 7 aktive und 3 ehemalige Raucher. Die Zeitspanne zwischen Rauchstopp der ehemaligen Raucher und Studienteilnahme betrug zwischen 7 Wochen und 2 Jahren. Alle Raucher waren Zigarettenraucher, wobei für mindestens 3 und maximal 12 Jahre geraucht wurde (Mittelwert: 8 Jahre). Der regelmäßige Konsum lag bei durchschnittlich 6,9 Zigaretten pro Tag.

Im Folgenden gliederte sich das Gesamtkollektiv wie folgt:

Tabelle 5.1: Übersicht über die geschlechterspezifische Zusammensetzung des Probandenkollektivs und der einzelnen Untergruppen bei der Provokation mit Methacholin als Inhalationsmittel.

	weiblich	männlich	gesamt (n)
Raucher/Atopiker	1 (5%)	4 (20%)	5 (25%)
Raucher/Nichtatopiker	1 (5%)	4 (20%)	5 (25%)
Nichtraucher/Atopiker	3 (15%)	2 (10%)	5 (25%)
Nichtraucher/Nichtatopiker	3 (15%)	2 (10%)	5 (25%)
gesamt (n)	8 (40%)	12 (60%)	20 (100%)

Von den 20 Probanden des Gesamtkollektivs wurde bei 12 Probanden die Provokation mit 0,9% Kochsalzlösung durchgeführt. 41,7% dieser Probanden waren weiblich (♀=*5*) und 58,3% (♂=*7*) männlich. Der Altersmedian lag bei 25 Lebensjahren mit einem Maximum von 40 Jahren und einem Minimum von 23 Jahren. Informationen zur genauen Zusammensetzung des Kollektivs können der Tabelle 5.2 entnommen werden:

Tabelle 5.2: Übersicht über die geschlechterspezifische Zusammensetzung des Probandenkollektivs und der einzelnen Untergruppen bei der Provokation mit 0,9%iger NaCl-Lösung als Inhalationsmittel.

	weiblich	männlich	gesamt (n)
Raucher/Atopiker	1 (8,3%)	2 (16,7%)	3 (25%)
Raucher/Nichtatopiker	0 (0%)	3 (25%)	3 (25%)
Nichtraucher/Atopiker	2 (16,7%)	1 (8,3%)	3 (25%)
Nichtraucher/Nichtatopiker	2 (16,7%)	1 (8,3%)	3 (25%)
gesamt (n)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12 (100%)

Bei der inhalativen Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung wurde der Testablauf gemäß „New Jaeger APS Protocol“ von jedem Probanden komplett durchlaufen.

Die körperliche Untersuchung vor und nach Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung ergab keine Auffälligkeiten.

Bei der Provokationstestung mit 3,2% Methacholin gemäß „New Jaeger APS Protocol“ führte in sechs Fällen eine Abnahme der FEV1 um 20% zur frühzeitigen Beendigung der Provokationstestung. Dabei wurde in vier Fällen die Provokationstestung nach der Inhalation der 4. Stufe und in zwei Fällen nach Inhalation der 5. Stufe beendet. Alle übrigen Probanden haben das Protokoll wie vorgesehen nach sechs Dosen der Testsubstanz beendet. Die körperliche Untersuchung vor Provokationstest mit Methacholin war bei allen Probanden unauffällig, nach Provokationstestung wurde bei zwei Probanden eine Giemen und Brummen diagnostiziert.

5.2 Inhalative Provokation mit NaCl:

5.2.1 *Mittelwerte:*

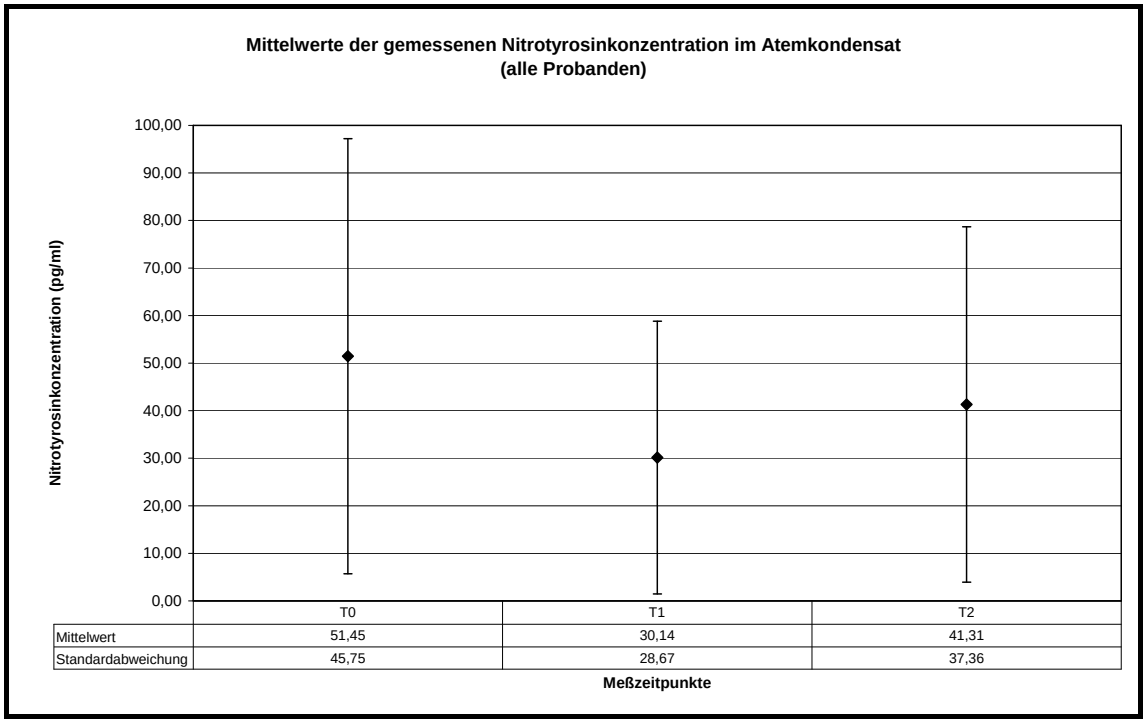


Abbildung 5.1: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Betrachtet werden hierbei **alle Probanden** der Kontrollstudie (n=12). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

Die Abbildung 5.1 stellt die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosinkonzentration aller Probanden (*n=12*) bei inhalativer Provokation mit 0,9% Kochsalzlösung zu den drei Zeitpunkten T0, T1 und T2 graphisch dar. Alle Angaben sind in pg/ml. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sich die mittlere Nitrotyrosinkonzentration um 21,31 pg/ml von T0 zu T1 verringerte und im Vergleich von T1 zu T2 wieder um 11,17 pg/ml anstieg. Die Differenz zwischen den Zeitpunkten T0 und T2 betrug -10,14 pg/ml.
(Keine signifikante Änderung.)

Die Abbildungen 5.2.1 - 5.2.4 zeigen in vier Graphen die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosin-konzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Berücksichtigung des Atopiestatus bzw. der Rauchgewohnheiten.

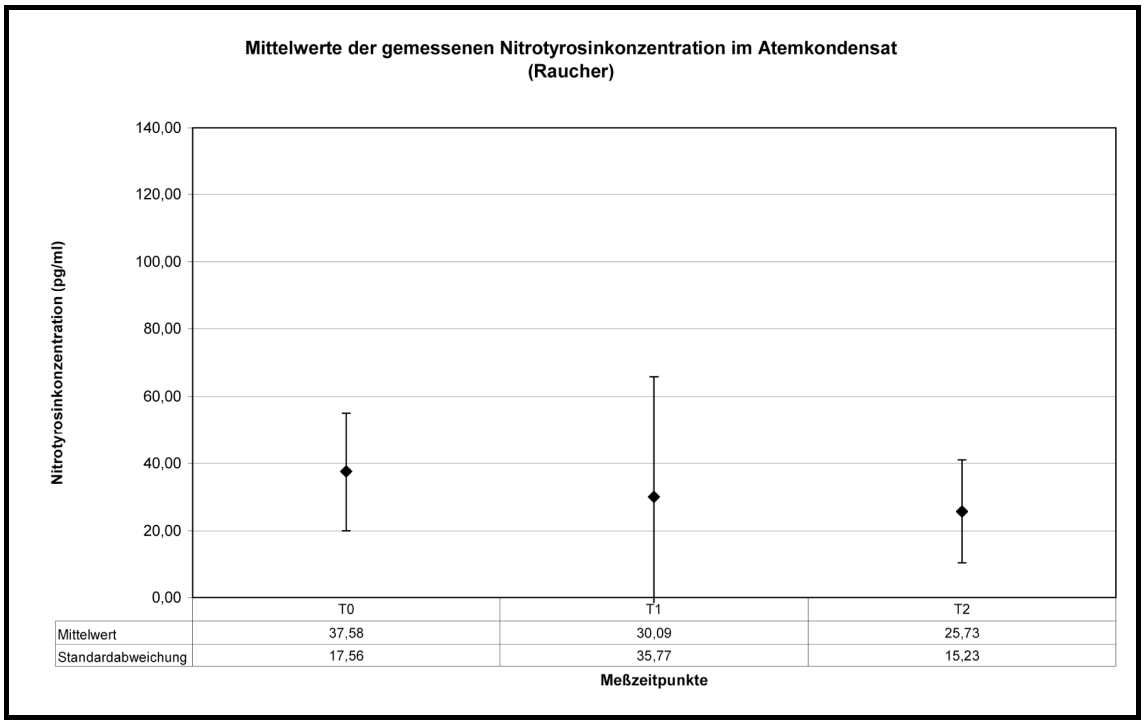


Abbildung 5.2.1: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Raucher** (n=6) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

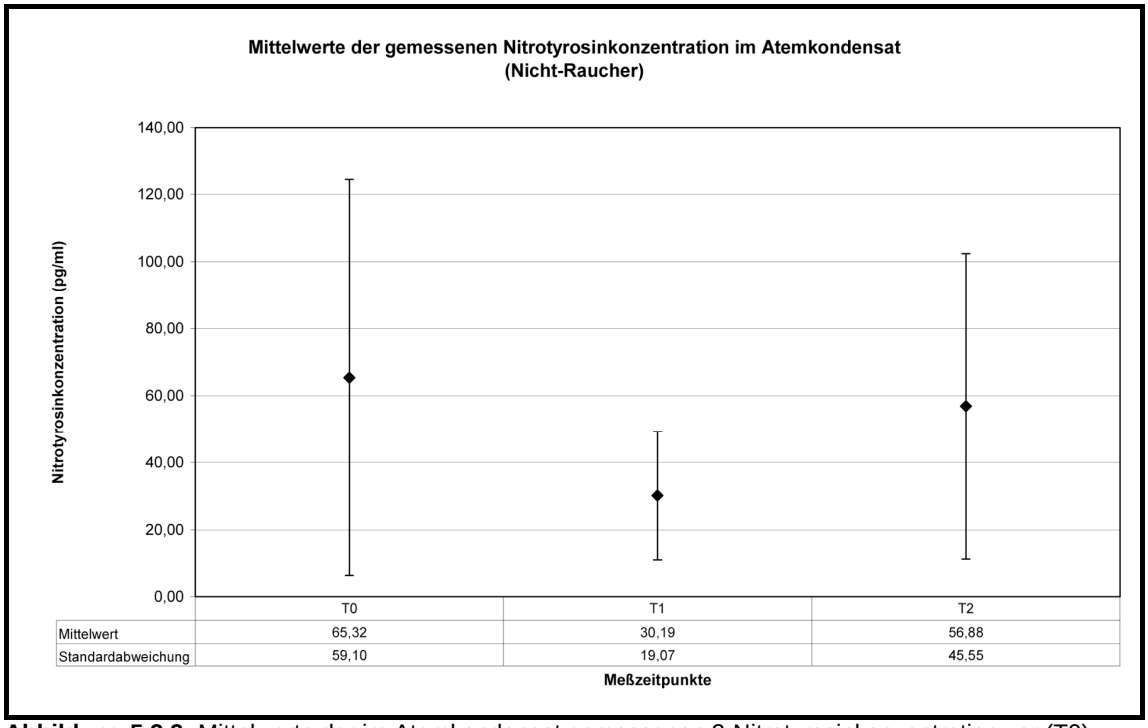


Abbildung 5.2.2: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtraucher** (n=6) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

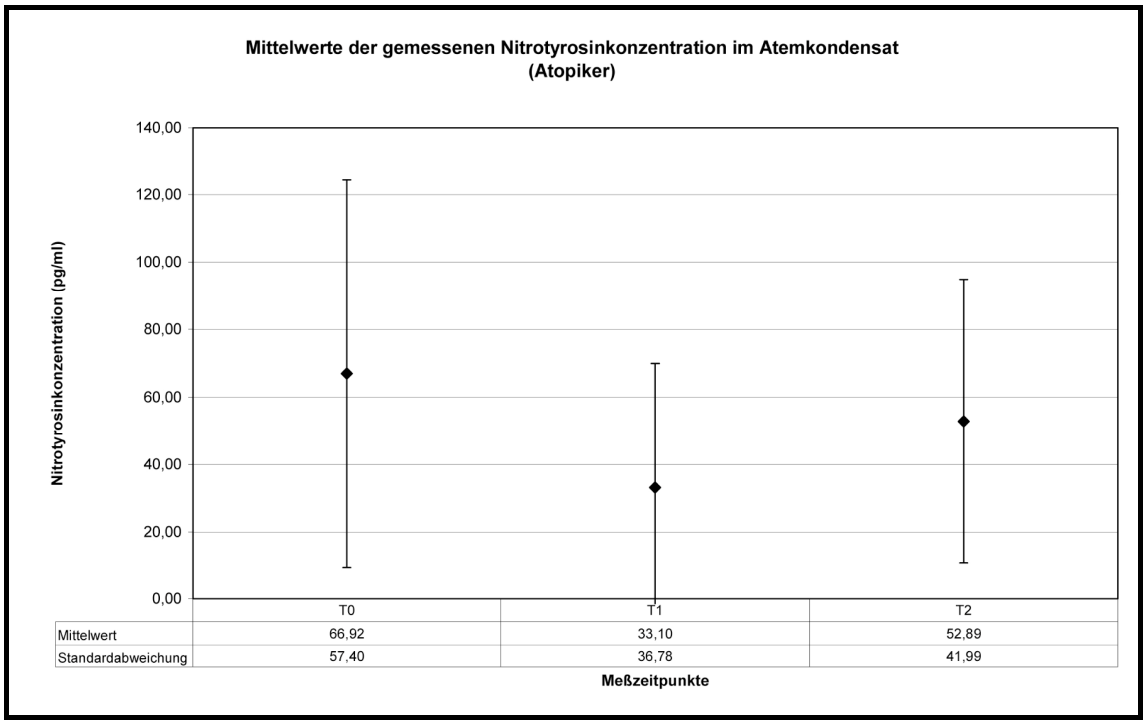


Abbildung 5.2.3: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker** (n=6) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

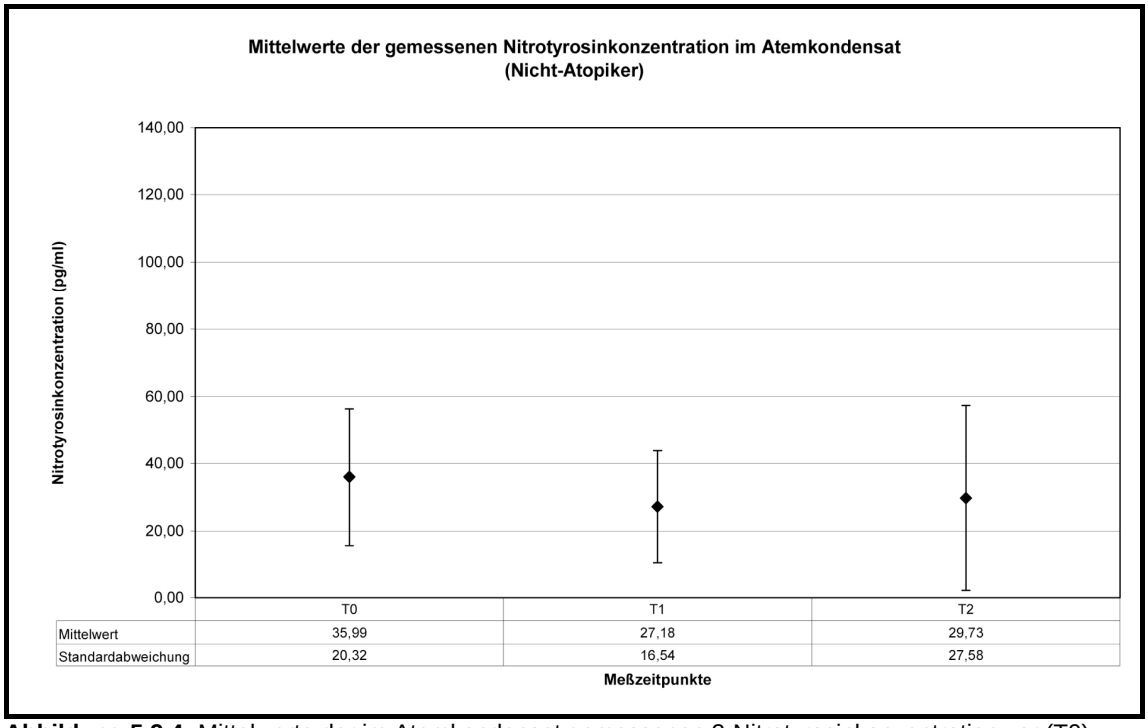


Abbildung 5.2.4: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker** (n=6) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

1.) **Raucher *(Abb. 5.2.1)*:** In der Probandengruppe der Raucher sank die errechnete mittlere Nitrotyrosinkonzentration vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 7,49 pg/ml und im Vergleich von T1 zu T2 um 4,36 pg/ml. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug -11,85 pg/ml.
(Keine signifikante Änderung.)

2.) **Nichtraucher *(Abb. 5.2.2)*:** Bei Betrachtung der Nichtraucher sank der Mittelwert im Vergleich von T0 zu T1 um 35,13 pg/ml. Die errechnete mittlere Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T0 um 8,44 pg/ml niedriger, im Vergleich zum Zeitpunkt T1 um 26,69 pg/ml höher. *(Keine signifikante Änderung.)*

3.) **Atopiker *(Abb. 5.2.3)***: Der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration bei den Atopikern sank nach Provokation mit 0,9% Kochsalzlösung um 33,82 pg/ml (∆T0-T1). Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T0 ebenfalls eine um 14,03 pg/ml niedrigere mittlere Nitrotyrosinkonzentration gemessen. Im Vergleich Zeitpunkt T1 zu T2 lag die errechnete mittlere Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 19,79 pg/ml höher. *(Keine signifikante Änderung.)*

4.) **Nichtatopiker *(Abb. 5.2.4)***: Die Mittelwerte der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um -8,81 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um +2,55 pg/ml. Im Vergleich von T0 zu T2 war die errechnete mittlere Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 6,26 pg/ml niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

Die Abbildungen 5.3.1 - 5.3.4 zeigen in vier Graphen die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosinkonzentrationen (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Aufspaltung des Probandenkollektivs in die vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher:

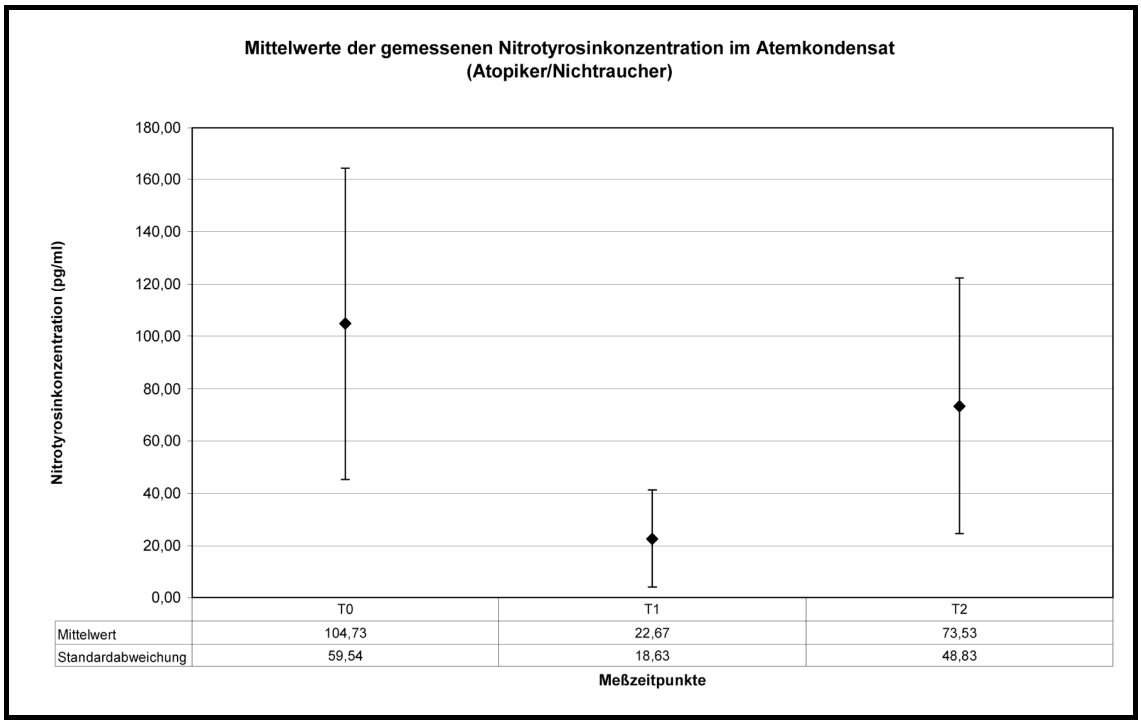


Abbildung 5.3.1: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für **Atopiker/Nichtraucher** (n=3). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

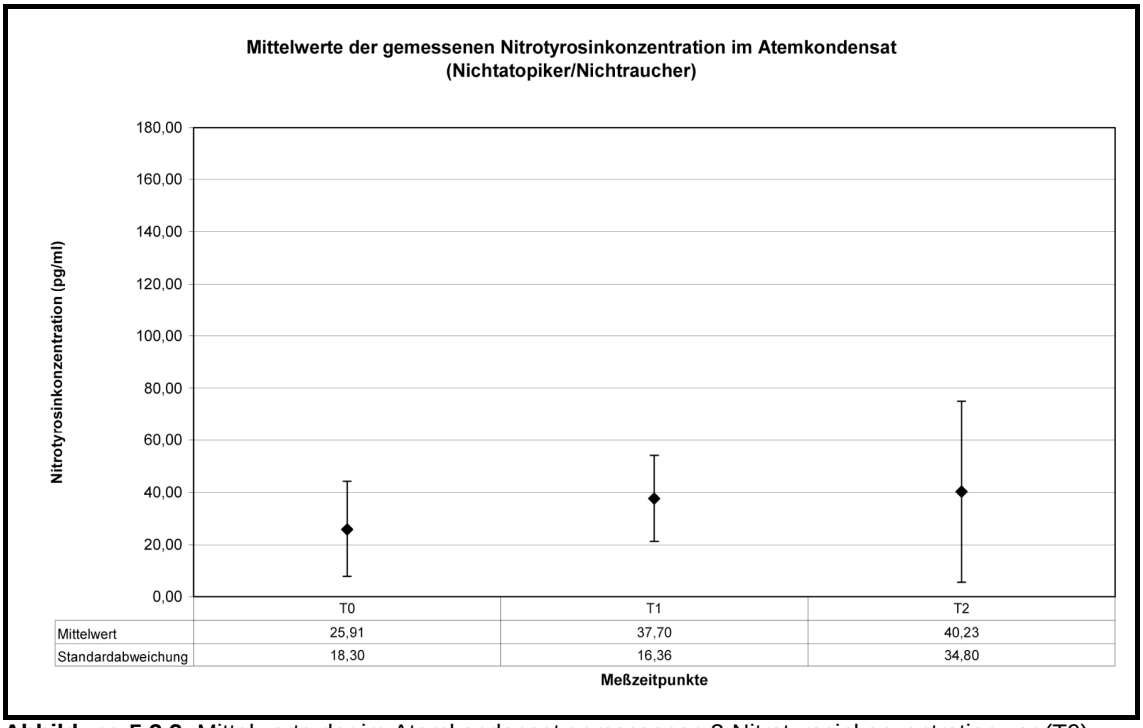


Abbildung 5.3.2: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=3). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

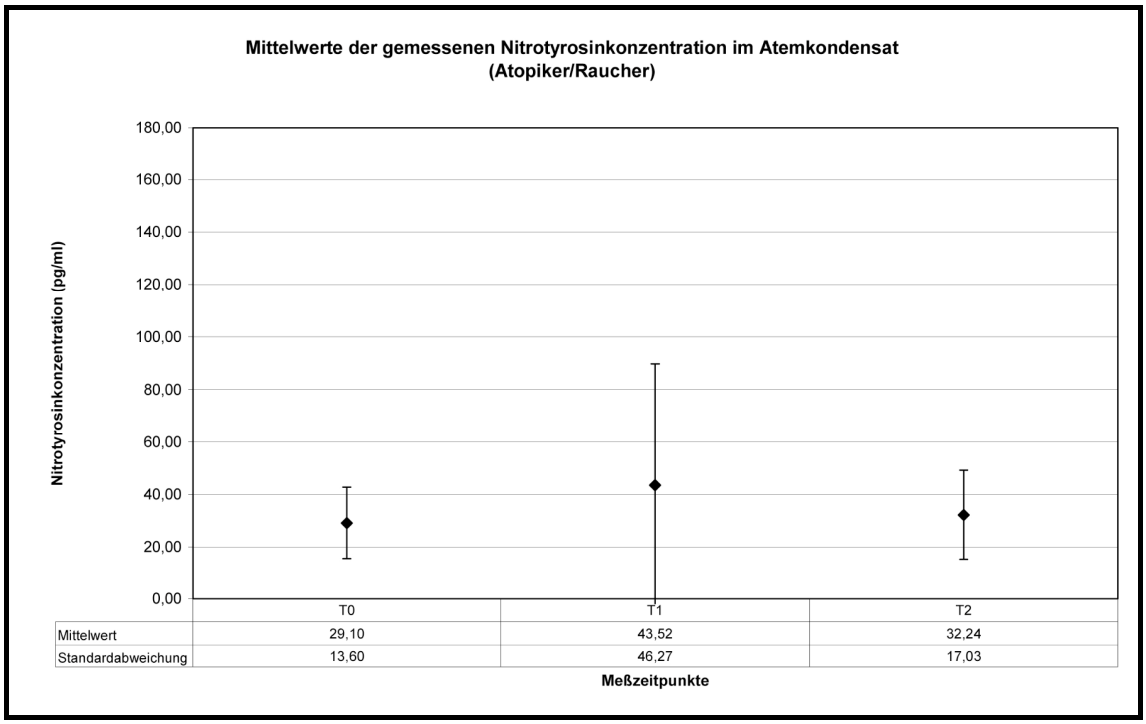


Abbildung 5.3.3: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für **Atopiker/Raucher** (n=3). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

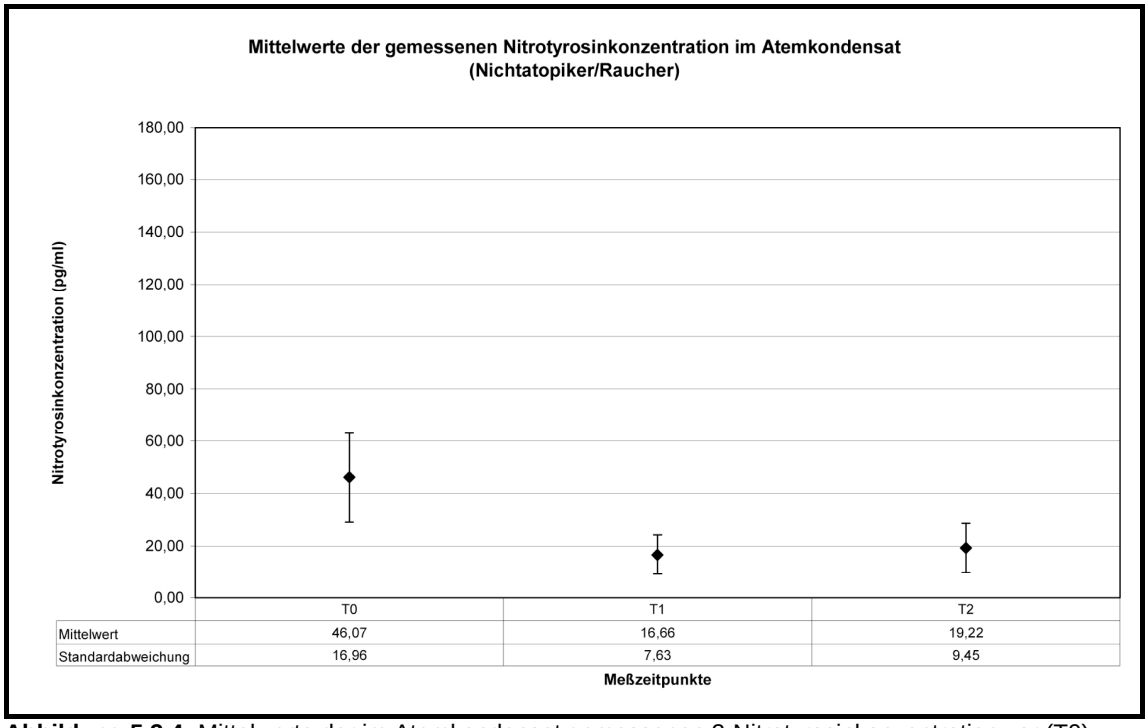


Abbildung 5.3.4: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Auswertung erfolgte für **Nichtatopiker/Raucher** (n=3). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

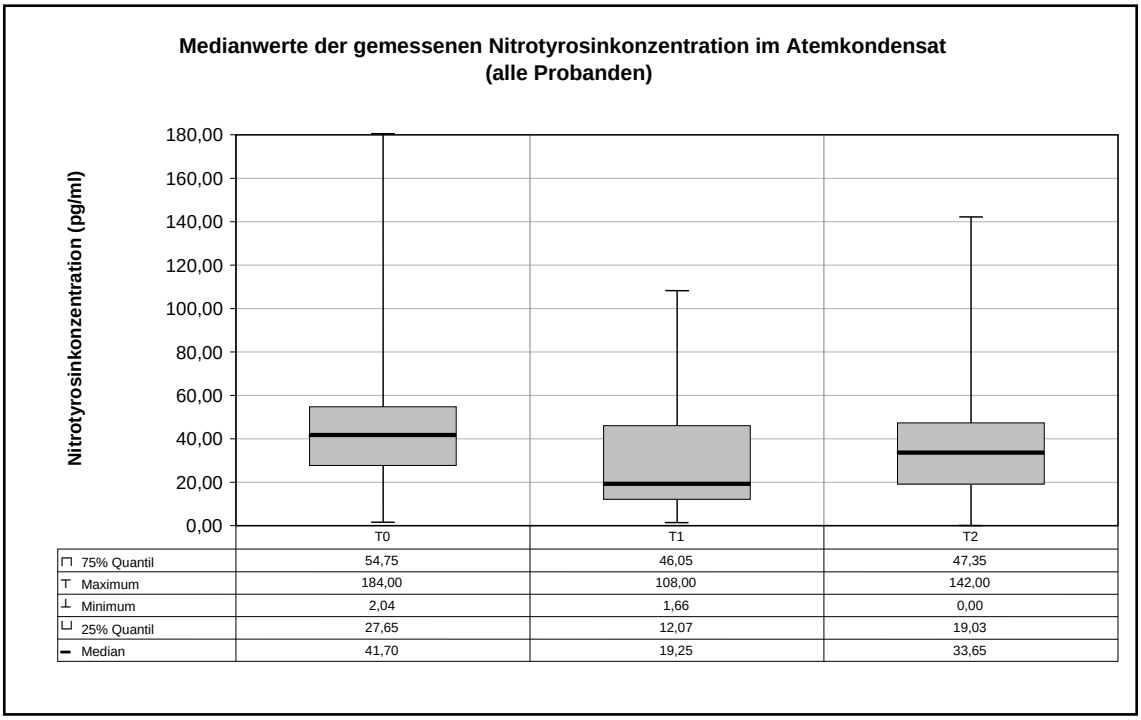
1.) **Atopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.3.1)*:** In der Probandengruppe der nichtrauchenden Atopiker lag der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 82,06 pg/ml niedriger. Im Vergleich von T1 zu T2 war der Wert zum Zeitpunkt T2 um 50,86 pg/ml höher. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug -31,2 pg/ml. *(Keine signifikante Änderung.)*

2.) **Nichtatopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.3.2)*:** Bei Betrachtung der Gruppe der Nichtatopiker/Nichtraucher lag der errechnete Mittelwert im Vergleich von T0 zu T1 um 11,79 pg/ml höher. Der errechnete Mittelwert zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T1 um 2,53 pg/ml und im Vergleich zu T0 um 14,32 pg/ml höher. *(Keine signifikante Änderung.)*

3.) **Atopiker/Raucher *(Abb. 5.3.3)***: Der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration bei den rauchenden Atopiker war nach Provokation mit 0,9% Kochsalzlösung um 14,42 pg/ml ($\Delta T0\text{-}T1$) größer. Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T0 ebenfalls eine um 3,43 pg/ml höhere mittlere Nitrotyrosinkonzentration ermittelt. Im Vergleich Zeitpunkt T1 zu T2 lag der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 11,28 pg/ml niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

4.) **Nichtatopiker/Raucher *(Abb. 5.3.4)***: Die Mittelwerte der gemessenen Nitrotyrosin-konzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um -29,41 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um +2,56 pg/ml. Im Vergleich Zeitpunkt T0 zu T2 war der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 26,85 pg/ml niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

5.2.2 *Medianwerte:*

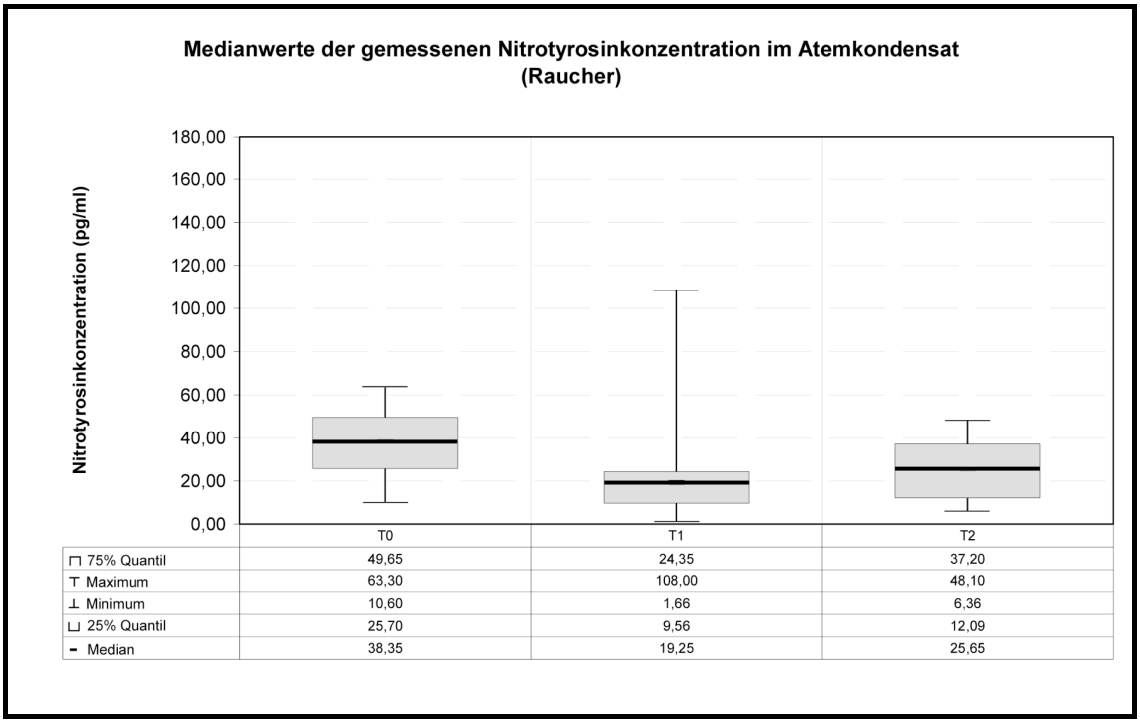


	T0	T1	T2
75% Quantil	54,75	46,05	47,35
Maximum	184,00	108,00	142,00
Minimum	2,04	1,66	0,00
25% Quantil	27,65	12,07	19,03
Median	41,70	19,25	33,65

Abbildung 5.4: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet werden hierbei **alle Probanden** der Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung (n=12).

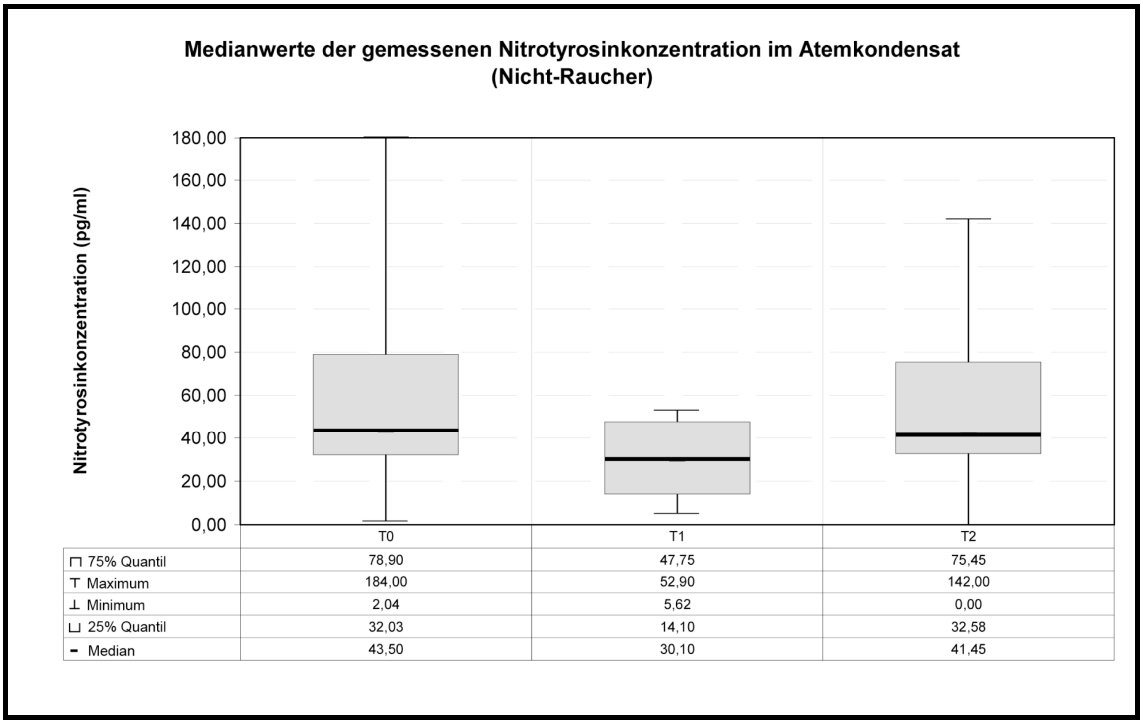
Die Abbildung 5.4 zeigt Boxplots der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration (*pg/ml*) bei Provokation mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2. Dargestellt werden die Mediane, die Quartile Q_{25} und Q_{75}, sowie Minimum und Maximum. Betrachtet wurden hierbei die Messwerte aller Probanden der Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung (*n=12*). Im Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten zeigte sich eine Erniedrigung der Nitrotyrosin-konzentration um 22,45 pg/ml zwischen T0 und T1 und eine Erhöhung der Konzentration um 14,4 pg/ml zwischen T1 und T2. Die Konzentration von Nitrotyrosin war im Median zum Zeitpunkt T2 um 8,05 pg/ml niedriger als zum Zeitpunkt T0. Die minimal und maximal gemessenen Konzentrationen zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten können der Abbildung entnommen werden.

Die Abbildungen 5.5.1 – 5.5.4 zeigen in vier Graphen die Medianwerte (*in Form von Boxplots*) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosinkonzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Berücksichtigung des Atopiestatus bzw. der Rauchgewohnheiten:



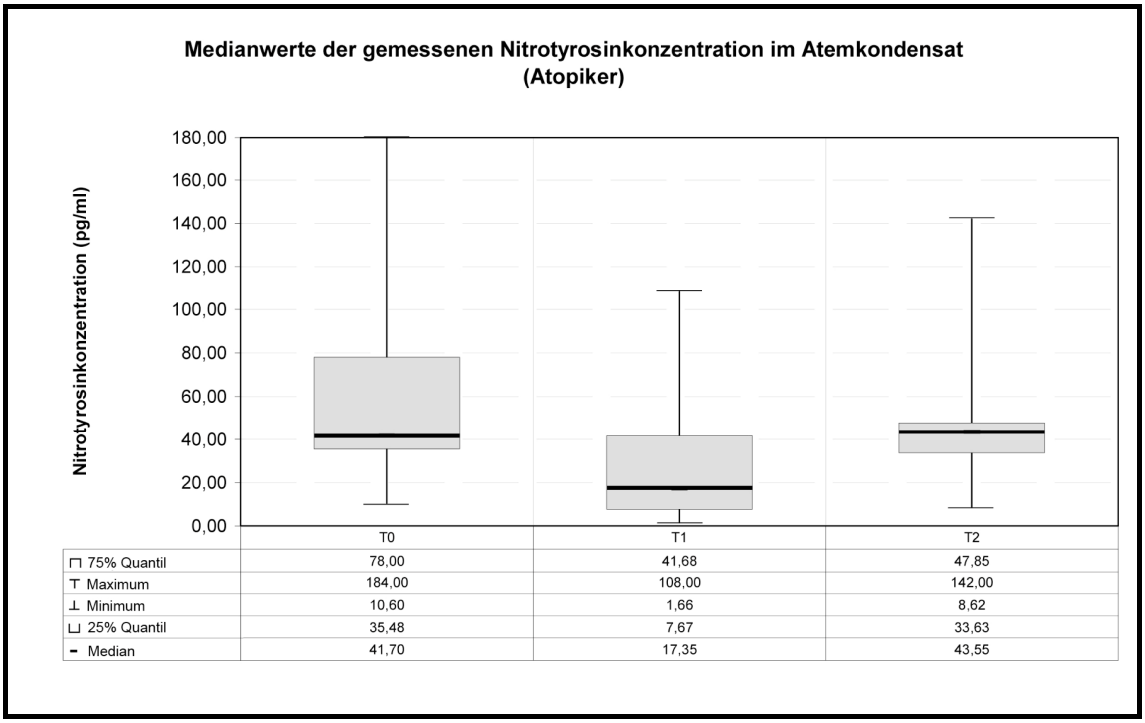
	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	49,65	24,35	37,20
⊤ Maximum	63,30	108,00	48,10
⊥ Minimum	10,60	1,66	6,36
⊔ 25% Quantil	25,70	9,56	12,09
- Median	38,35	19,25	25,65

Abbildung 5.5.1: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Raucher** (n=6).



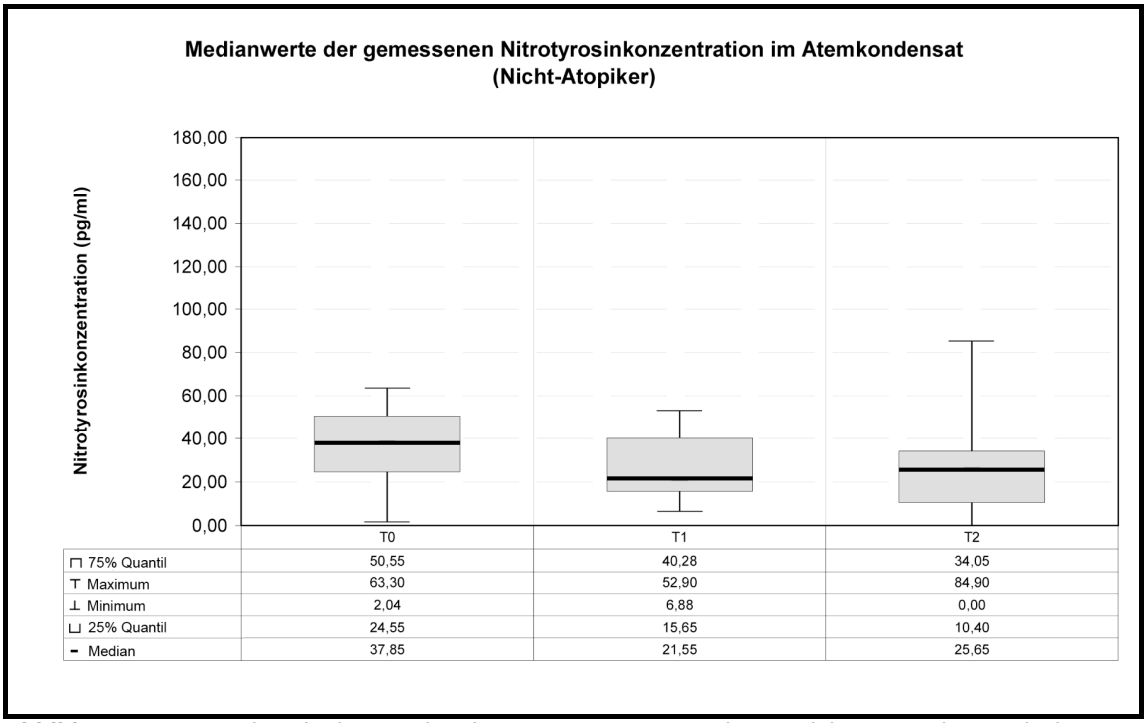
	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	78,90	47,75	75,45
⊤ Maximum	184,00	52,90	142,00
⊥ Minimum	2,04	5,62	0,00
⊔ 25% Quantil	32,03	14,10	32,58
- Median	43,50	30,10	41,45

Abbildung 5.5.2: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtraucher** (n=6).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	78,00	41,68	47,85
⊤ Maximum	184,00	108,00	142,00
⊥ Minimum	10,60	1,66	8,62
⊔ 25% Quantil	35,48	7,67	33,63
- Median	41,70	17,35	43,55

Abbildung 5.5.3: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Atopiker** (n=6).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	50,55	40,28	34,05
⊤ Maximum	63,30	52,90	84,90
⊥ Minimum	2,04	6,88	0,00
⊔ 25% Quantil	24,55	15,65	10,40
- Median	37,85	21,55	25,65

Abbildung 5.5.4: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtatopiker** (n=6).

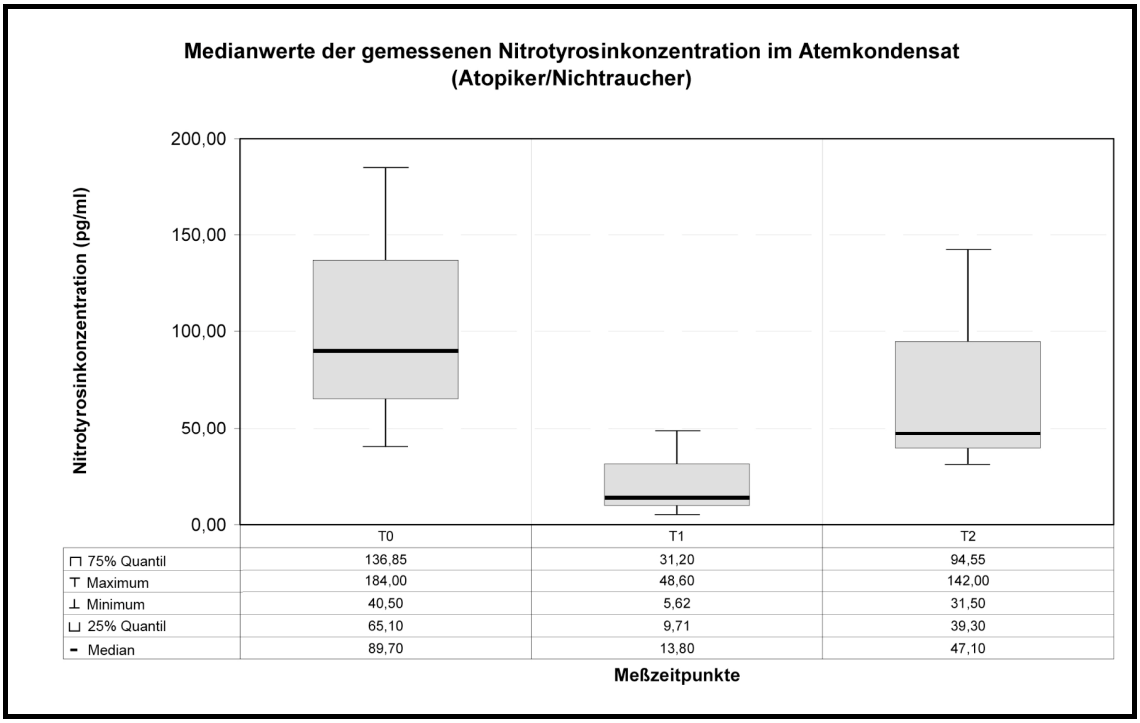
1.) **Raucher *(Abb. 5.5.1)*:** Der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration sank nach Provokation mit 0,9%iger Kochsalzlösung um 19,1 pg/ml (*ΔT0-T1*). Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T1 ein Anstieg der Nitrotyrosinkonzentration um 6,4 pg/ml errechnet. Im Vergleich Zeitpunkt T0 zu T2 lag der Median der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration um 12,7 pg/ml niedriger.

2.) **Nichtraucher *(Abb. 5.5.2)*:** Die Medianwerte der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um -13,4 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um +11,35 pg/ml. Im Vergleich Zeitpunkt T0 zu T2 lag der Median der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 2,05 pg/ml niedriger.

3.) **Atopiker *(Abb. 5.5.3)***: In der Probandengruppe der Atopiker lag der Median der gemessenen Nitrotyrosinkonzentrationen vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 24,35 pg/ml niedriger und im Vergleich von T1 zu T2 um 26,2 pg/ml höher. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug +1,85 pg/ml.

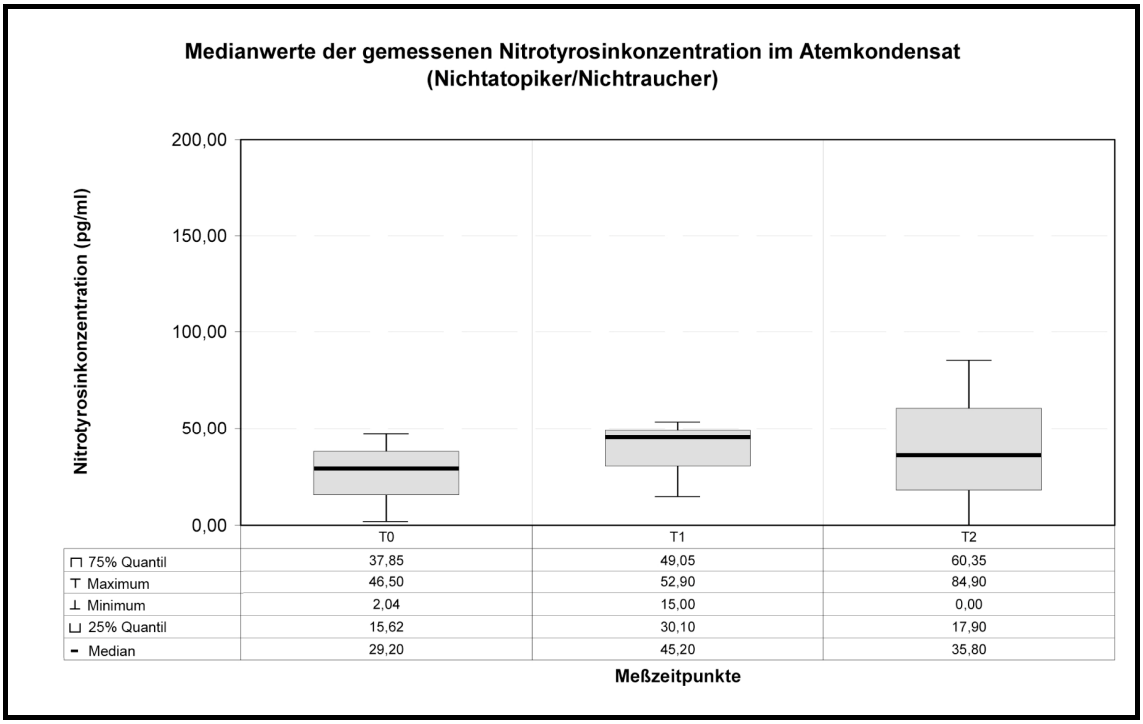
4.) **Nichtatopiker *(Abb. 5.5.4)***: Bei Betrachtung der Nichtatopiker lag die Nitrotyrosinkonzentration im Vergleich von T0 zu T1 um 16,3 pg/ml niedriger. Die gemessene Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T0 um 12,2 pg/ml niedriger und im Vergleich zum Zeitpunkt T1 um 4,1 pg/ml höher.

Die Abbildungen 5.6.1 – 5.6.4 zeigen in vier Graphen die Medianwerte (*in Form von Boxplots*) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosinkonzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Aufspaltung des Probandenkollektivs in die vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher:



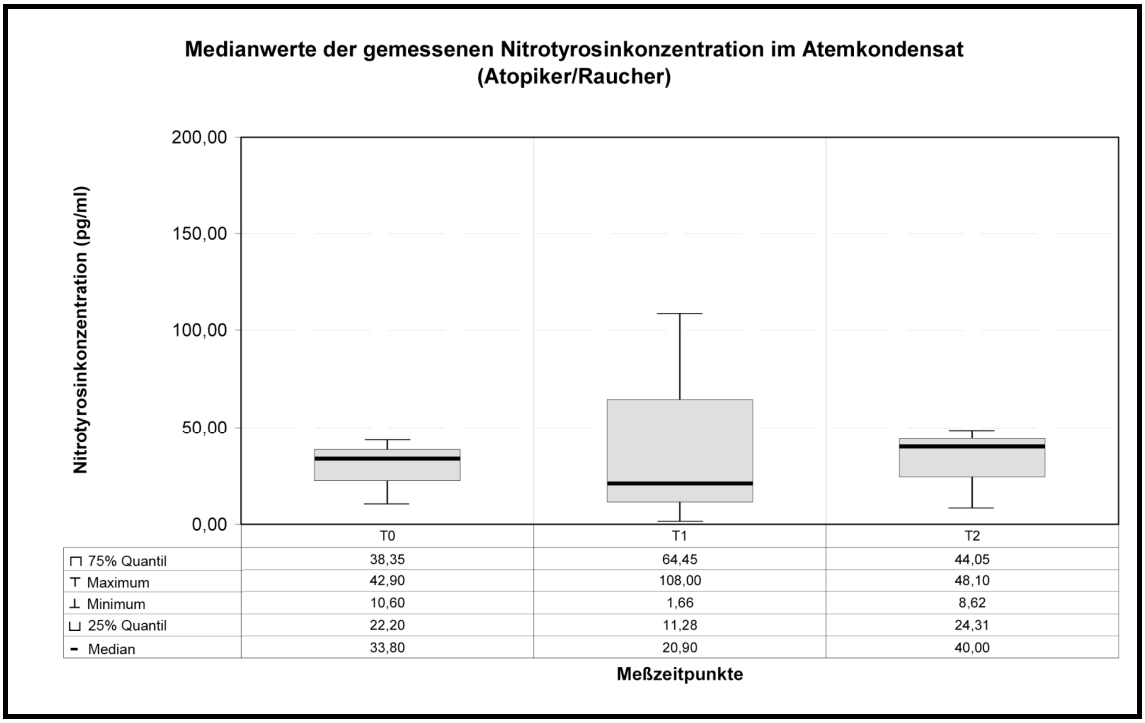
	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	136,85	31,20	94,55
⊤ Maximum	184,00	48,60	142,00
⊥ Minimum	40,50	5,62	31,50
⊔ 25% Quantil	65,10	9,71	39,30
⁃ Median	89,70	13,80	47,10

Abbildung 5.6.1: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Atopiker/Nichtraucher** (n=3).



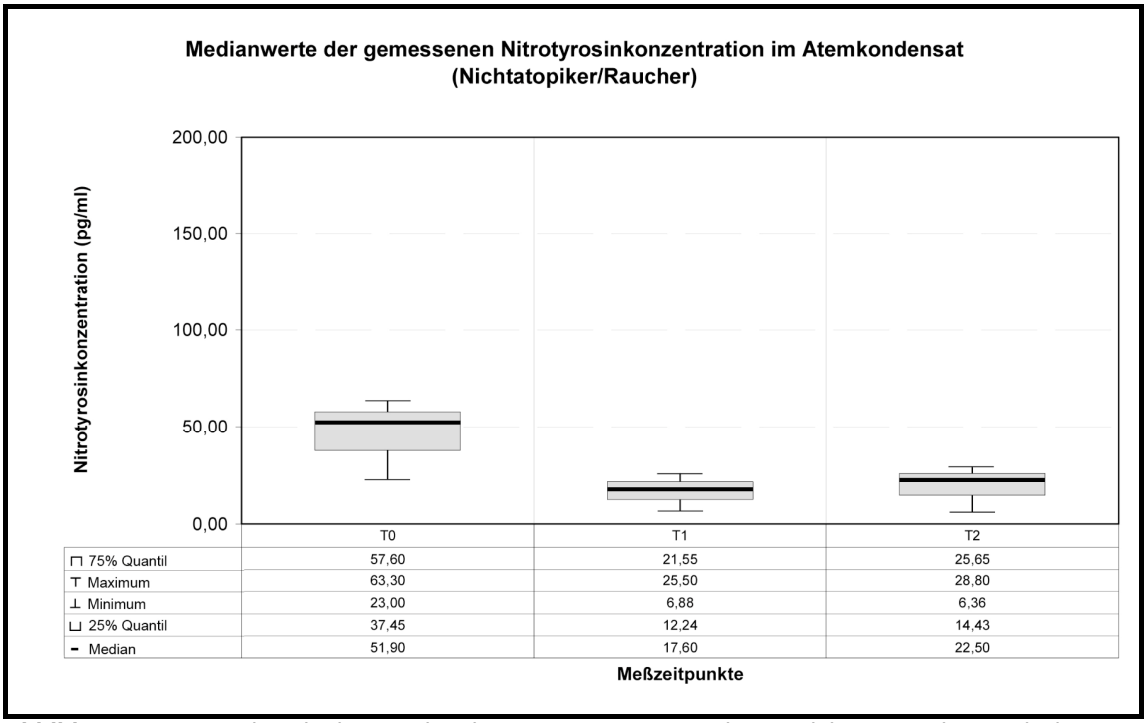
	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	37,85	49,05	60,35
⊤ Maximum	46,50	52,90	84,90
⊥ Minimum	2,04	15,00	0,00
⊔ 25% Quantil	15,62	30,10	17,90
⁃ Median	29,20	45,20	35,80

Abbildung 5.6.2: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=3).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	38,35	64,45	44,05
⊤ Maximum	42,90	108,00	48,10
⊥ Minimum	10,60	1,66	8,62
⊔ 25% Quantil	22,20	11,28	24,31
- Median	33,80	20,90	40,00

Abbildung 5.6.3: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Atopiker/Raucher** (n=3).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	57,60	21,55	25,65
⊤ Maximum	63,30	25,50	28,80
⊥ Minimum	23,00	6,88	6,36
⊔ 25% Quantil	37,45	12,24	14,43
- Median	51,90	17,60	22,50

Abbildung 5.6.4: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtatopiker/Raucher** (n=3).

1.) **Atopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.6.1)*:** In der Probandengruppe der nichtrauchenden Atopiker lag der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 75,90 pg/ml niedriger. Im Vergleich von T1 zu T2 lag der Wert um 33,3 pg/ml höher. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug -42,6 pg/ml.

2.) **Nichtatopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.6.2)*:** Bei Betrachtung der Gruppe der Nichtatopiker/Nichtraucher lag der errechnete Medianwert im Vergleich von T0 zu T1 um 16,0 pg/ml niedriger. Der errechnete Medianwert zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T1 um 9,4 pg/ml niedriger und im Vergleich zu T0 um 6,6 pg/ml höher.

3.) **Atopiker/Raucher *(Abb. 5.6.3)***: Der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosin-konzentration bei den rauchenden Atopikern lag nach Provokation mit 0,9% Kochsalzlösung um 12,9 pg/ml höher ($\Delta T0\text{-}T1$). Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T0 ein um 6,2 pg/ml höherer Medianwert ermittelt. Im Vergleich Zeitpunkt T1 zu T2 lag der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration um 19,1 pg/ml höher.

4.) **Nichtatopiker/Raucher *(Abb. 5.6.4)***: Die Medianwerte der gemessenen Nitrotyrosin-konzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um -34,3 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um +4,9 pg/ml. Im Vergleich T0 zu T2 lag der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 29,4 pg/ml niedriger.

3.2.3 Signifikanztests (p-Werte):

Die formulierte Nullhypothese für die inhalative Provokation mit 0,9% Kochsalzlösung war:

„0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl) ist eine inerte Lösung. Eine inhalative Atemwegsprovokation mit physiologischer Kochsalzlösung hat keinerlei Einfluss auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat.“

Die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat nach inhalativer Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung weist im Gesamtvergleich und bei einem Signifikanzniveau von 0,05 zwischen T0 zu T1 zu T2 keine signifikanten Unterschiede auf.
(*p-Wert=0,3759*).

3.2.4 Zusammenfassung:

Sowohl bei der Gesamtbetrachtung der Nitrotyrosinkonzentration über alle Zeitpunkte, als auch unter Aufschlüsselung der Ergebnisse in die einzelnen Untergruppen lässt sich statistisch betrachtet nach inhalativer Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung kein signifikanter Unterschied der Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat nachweisen.

5.3 Inhalative Provokation mit Methacholin:

5.3.1 Mittelwerte:

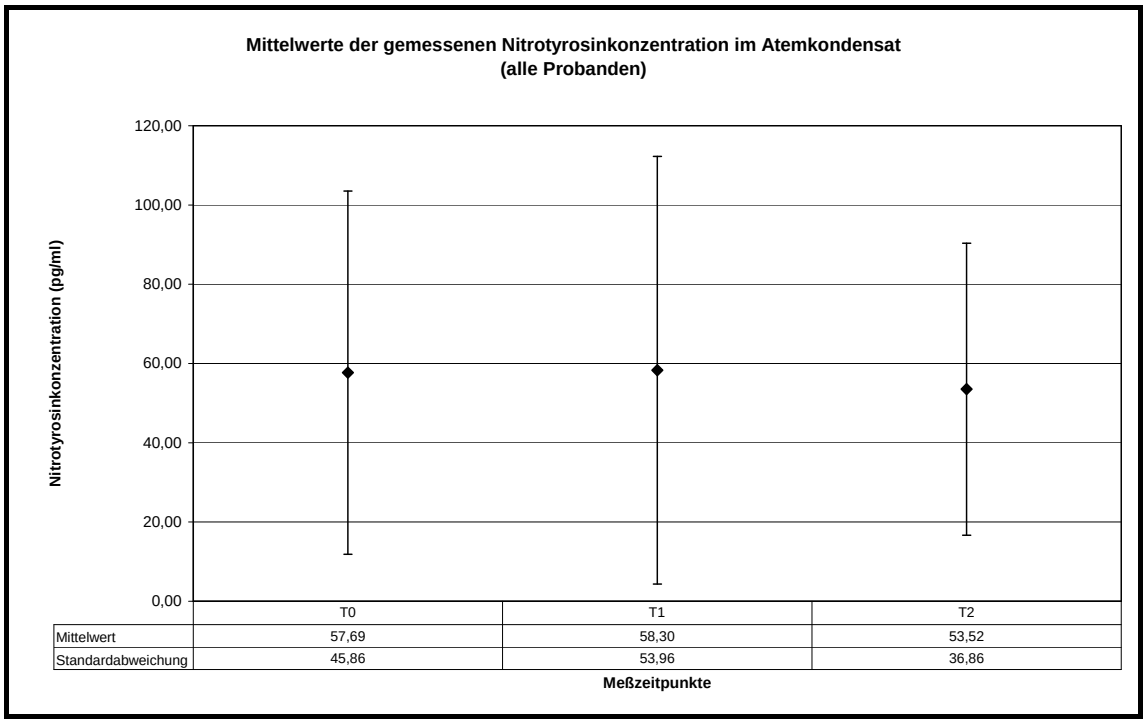


Abbildung 5.7: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Betrachtet werden hierbei **alle Probanden** der Studie (n=20). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

In der Abbildung 5.7 werden die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (*pg/ml*) bei Provokation mit Methacholin zu den jeweiligen Zeitpunkten T0, T1 und T2 graphisch dargestellt. Betrachtet werden hierbei die Messwerte aller Probanden (*n=20*). Im Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten zeigte sich ein Konzentrationsanstieg von 0,61 pg/ml zwischen T0 und T1 und ein Absinken von 4,78 pg/ml zwischen T1 und T2. Im Vergleich zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 war die Konzentration 90 Minuten nach Abschluss der Provokationstestung um 4,17 pg/ml niedriger.
(Keine signifikante Änderung.)

Die Abbildungen 5.8.1 – 5.8.4 zeigen vier Graphen mit den Mittelwerten (samt einfacher Standardabweichung) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosin-konzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit Methacholin zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Berücksichtigung des Atopiestatus bzw. der Rauchgewohnheiten.

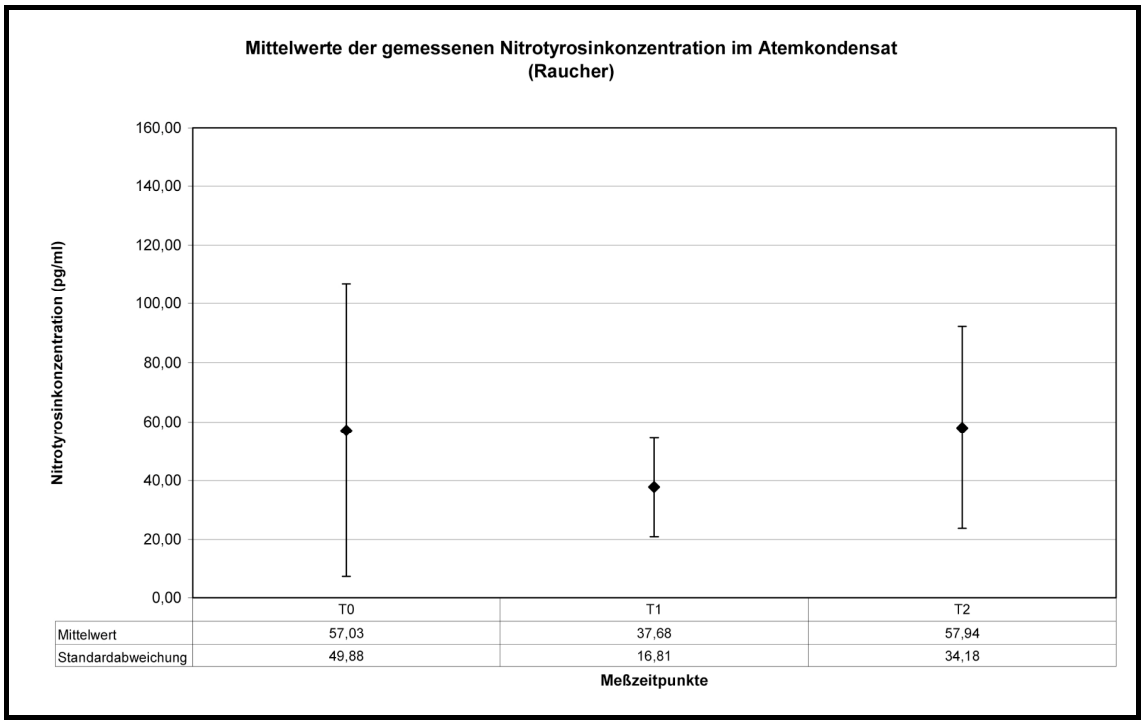


Abbildung 5.8.1: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Raucher** (n=10) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

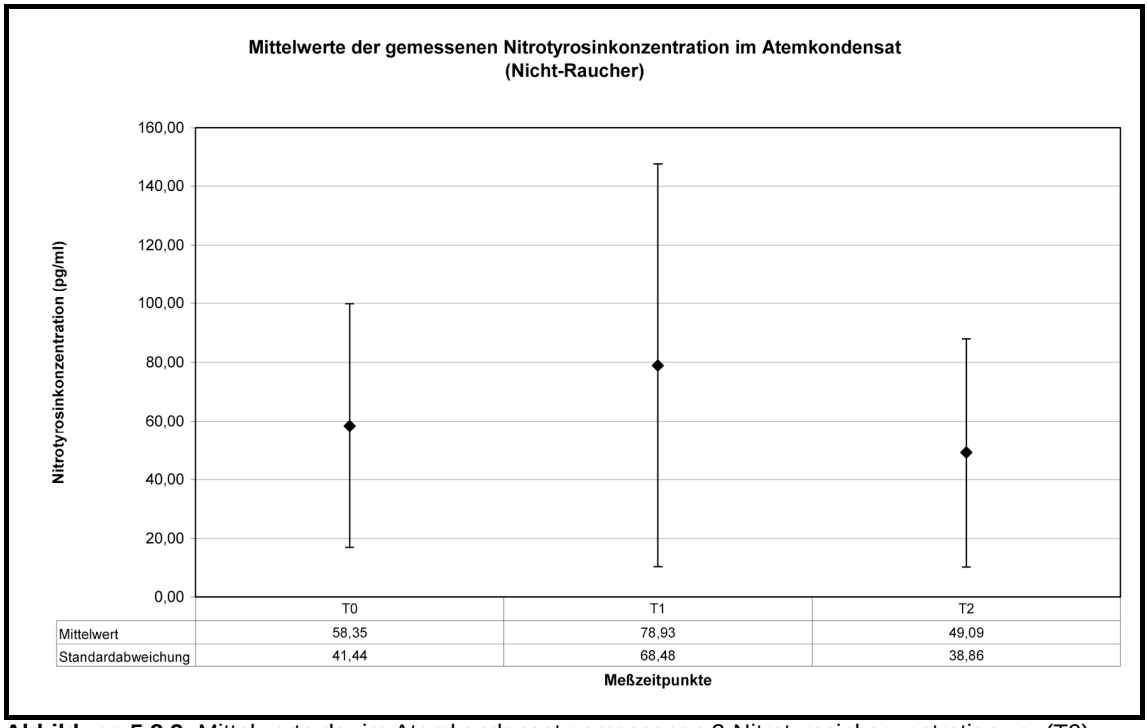


Abbildung 5.8.2: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtraucher** (n=10) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

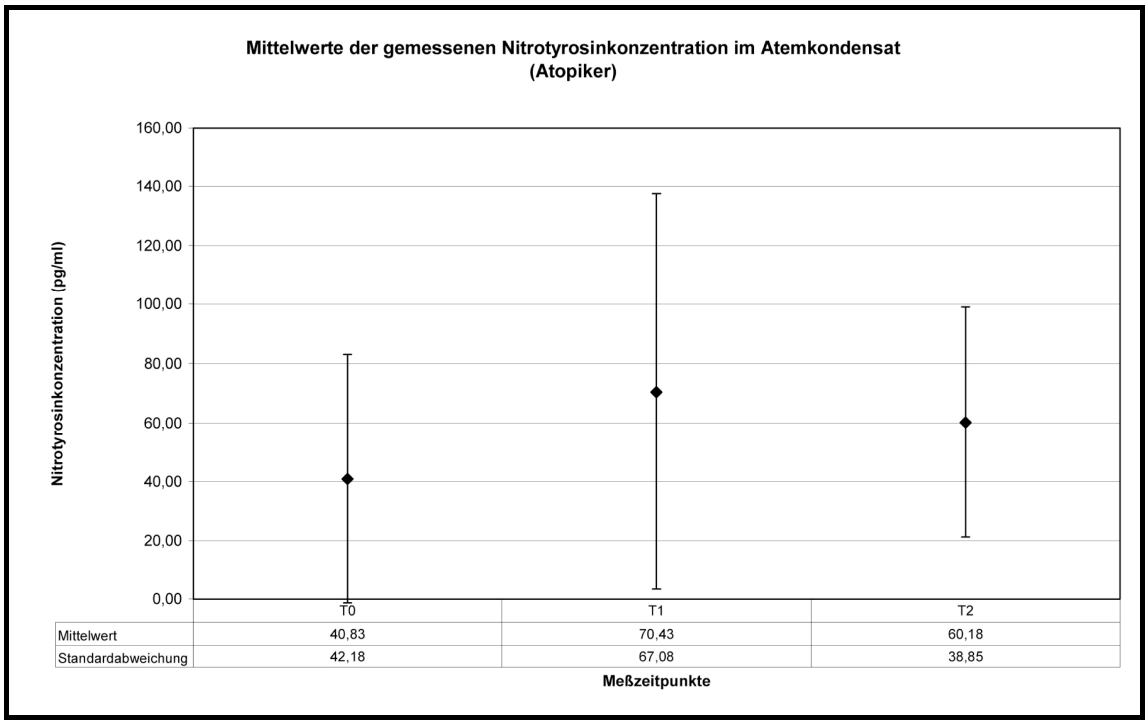


Abbildung 5.8.3: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker** (n=10) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

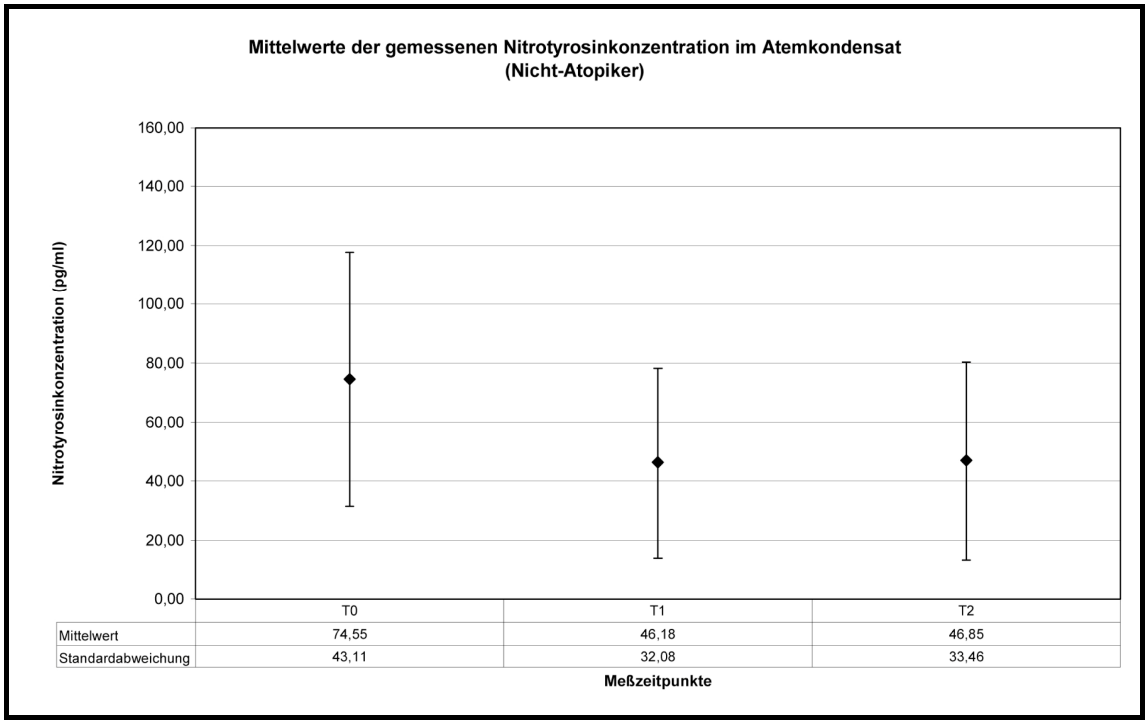


Abbildung 5.8.4: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker** (n=10) Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

1.) **Raucher *(Abb. 5.8.1)*:** Die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat lag bei der Gruppe der Raucher im Vergleich von Zeitpunkt T0 zum Zeitpunkt T1 um 19,37 pg/ml niedriger. Die Konzentration zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zum Zeitpunkt T0 und zum Zeitpunkt T1 größer (∆*T0-T2: +0,92 pg/ml;* ∆*T1-T2: +20,28 pg/ml*). *(Keine signifikante Änderung.)*

2.) **Nichtraucher *(Abb. 5.8.2)*:** Der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration bei den Nichtrauchern war nach Provokation mit Methacholin mit 78,93 pg/ml um 20,58 pg/ml größer (∆*T0-T1*). Im Vergleich Zeitpunkt T1 zu T2 lag die Nitrotyrosinkonzentration mit 49,09 pg/ml um 29,84 pg/ml niedriger. Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zum Zeitpunkt T0 eine um 9,26 pg/ml niedrigere Nitrotyrosinkonzentration gemessen. *(Keine signifikante Änderung.)*

3.) **Atopiker *(Abb. 5.8.3)***: Bei Betrachtung der Atopiker war die Nitrotyrosinkonzentration im Vergleich von T0 zu T1 um 29,6 pg/ml höher. Die gemessene Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T1 um 10,25 pg/ml niedriger, im Vergleich zum Zeitpunkt T0 um 19,35 pg/ml höher. *(Keine signifikante Änderung.)*

4.) **Nichtatopiker *(Abb. 5.8.4)***: Der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration lag nach Provokation mit Methacholin um 31,37 pg/ml niedriger (∆*T0-T1*). Im Vergleich von Zeitpunkt T1 zu T2 war die gemessene Nitrotyrosinkonzentration um 3,65 pg/ml höher. Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T0 eine um 27,7 pg/ml niedrigere Nitrotyrosinkonzentration gemessen. *(Keine signifikante Änderung.)*

Die Abbildungen 5.9.1 – 5.9.4 zeigen in vier Graphen die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosin-konzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit Methacholin zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Aufspaltung des Probandenkollektivs in die vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher:

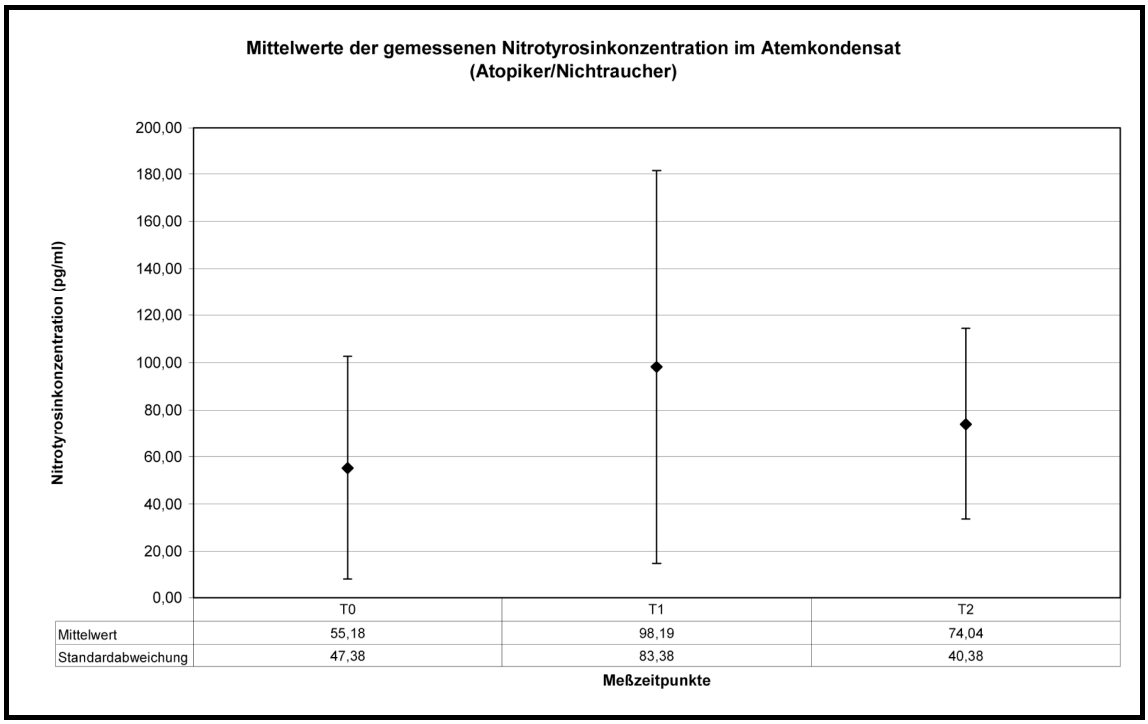


Abbildung 5.9.1: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für **Atopiker/Nichtraucher** (n=5).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

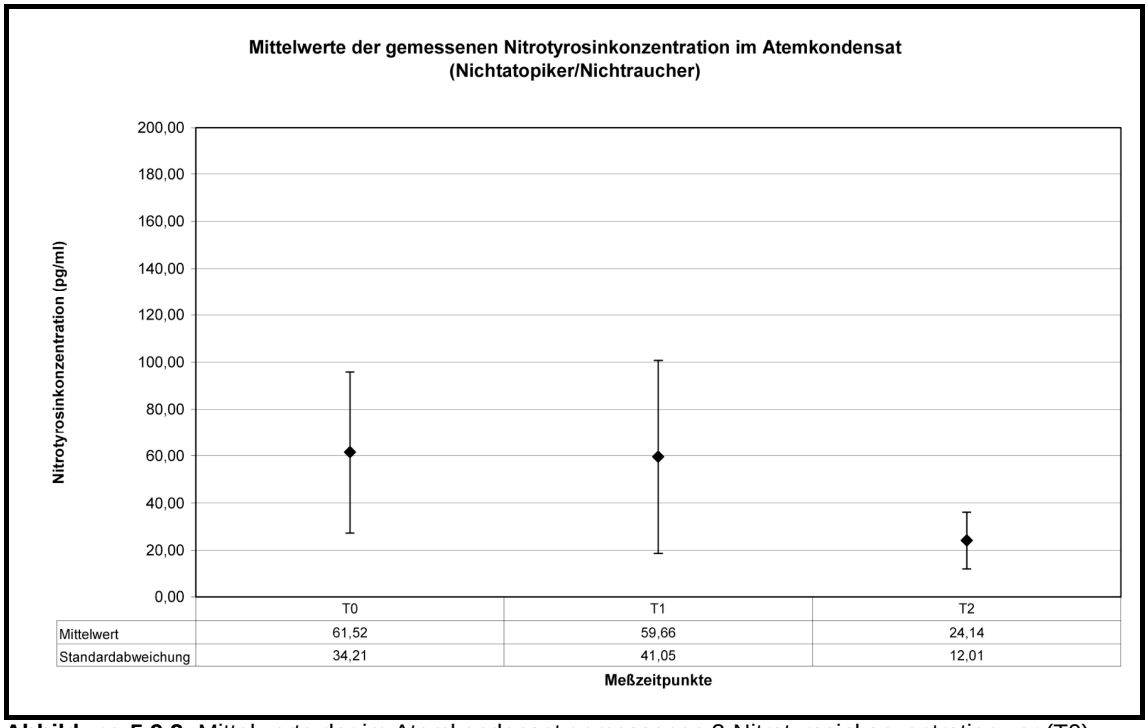


Abbildung 5.9.2: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=5).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

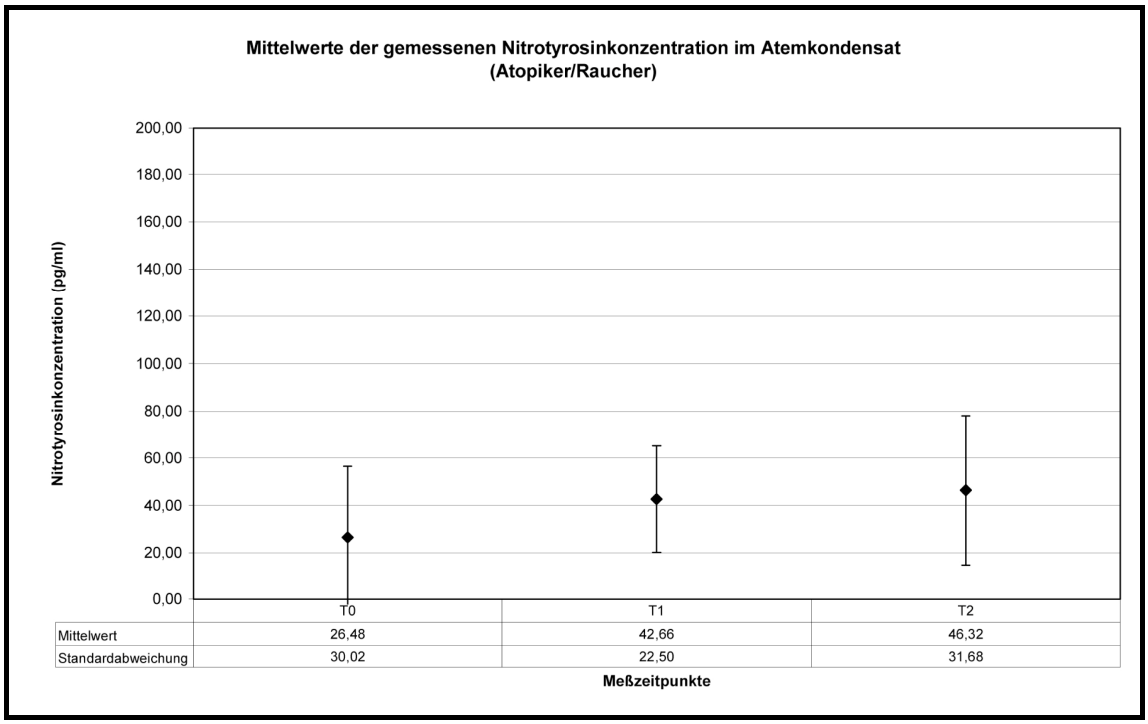


Abbildung 5.9.3: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Die Auswertung erfolgte für **Atopiker/Raucher** (n=5). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

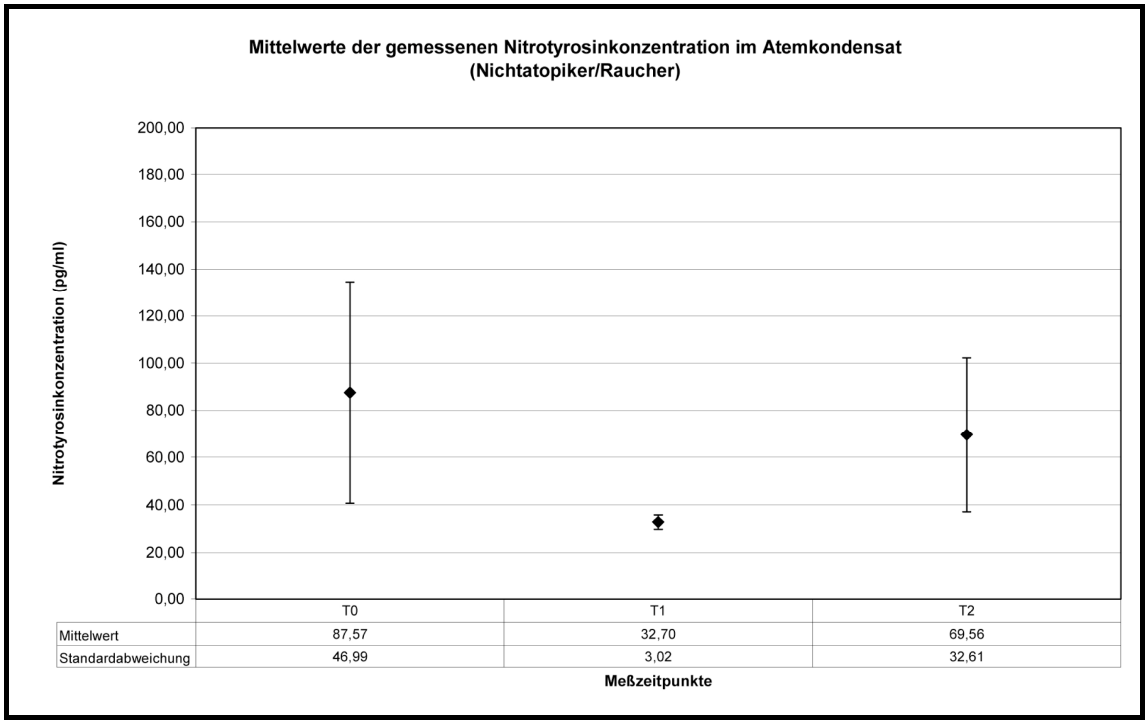


Abbildung 5.9.4: Mittelwerte der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Die Auswertung erfolgte für **Nichtatopiker/Raucher** (n=5). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

1.) **Atopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.9.1)*:** In der Probandengruppe der nichtrauchenden Atopiker lag der Mittelwert vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 43,01 pg/ml höher. Im Vergleich von T1 zu T2 war der Wert um 24,15 pg/ml niedriger. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug +18,86 pg/ml. *(Keine signifikante Änderung.)*

2.) **Nichtatopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.9.2)*:** Bei Betrachtung der Gruppe der Nichtatopiker/Nichtraucher war der errechnete Mittelwert im Vergleich von T0 zu T1 um 1,86 pg/ml niedriger. Der Mittelwert zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T1 um 35,52 pg/ml und im Vergleich zu T0 um 37,38 pg/ml niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

3.) **Atopiker/Raucher *(Abb. 5.9.3)***: Der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration bei den rauchenden Atopiker lag nach Provokation mit Methacholin um 16,18 pg/ml höher (∆T0-T1). Zum Zeitpunkt T2 war der Mittelwert im Vergleich zu T0 um 19,84 pg/ml größer. Im Vergleich Zeitpunkt T1 zu T2 lag der Mittelwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 um 3,66 pg/ml höher. *(Keine signifikante Änderung.)*

4.) **Nichtatopiker/Raucher *(Abb. 5.9.4)***: Die Mittelwerte der gemessenen Nitrotyrosin-konzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um -54,87 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um +36,86 pg/ml. Im Vergleich Zeitpunkt T0 zu T2 war der Mittelwert zum Zeitpunkt T2 um 18,01 pg/ml niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

5.3.2 Medianwerte:

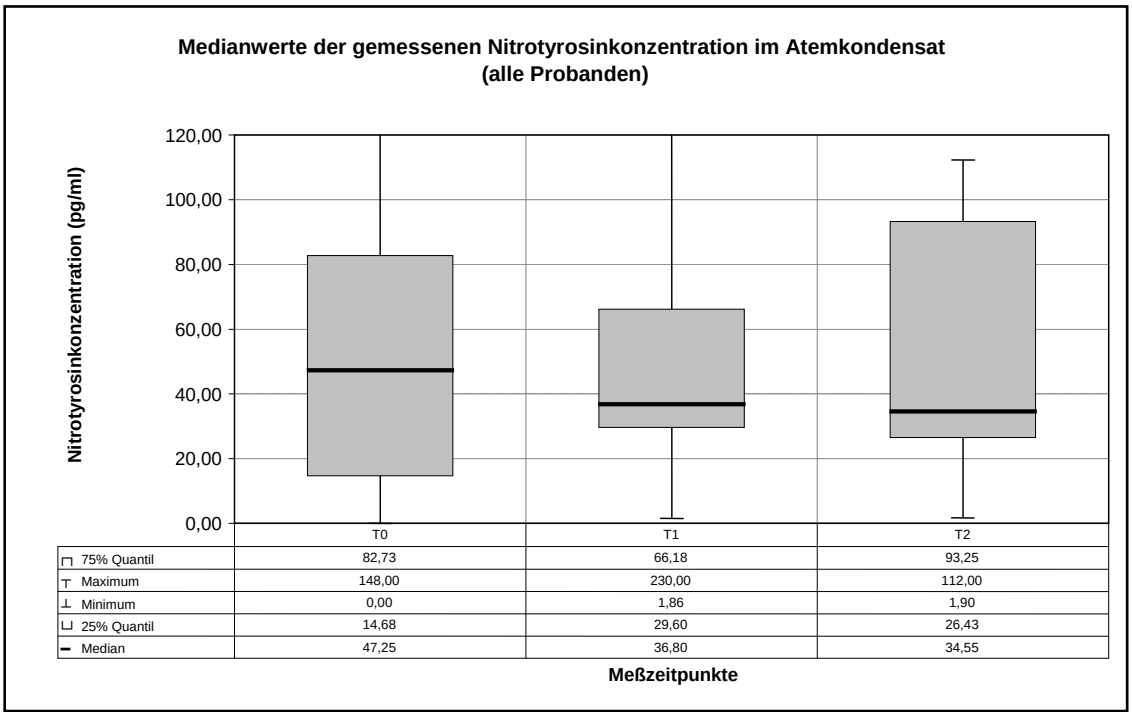
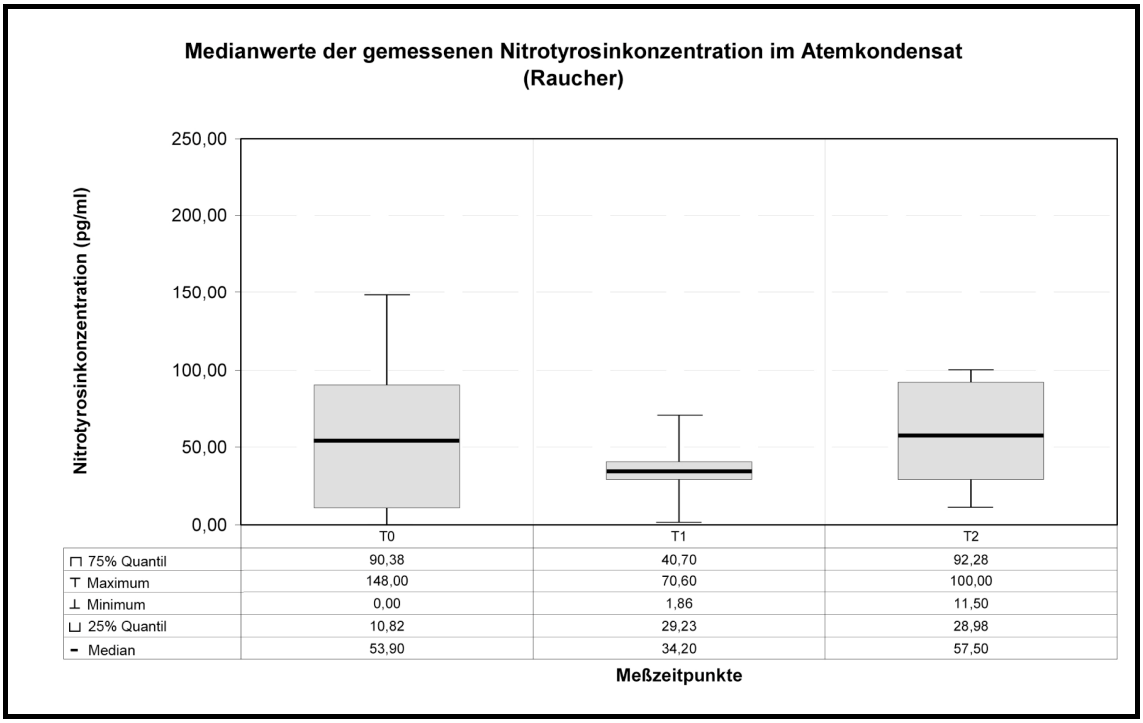


Abbildung 5.10: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Grafische Darstellung der Medianwerte, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum aller Probanden (n=20).

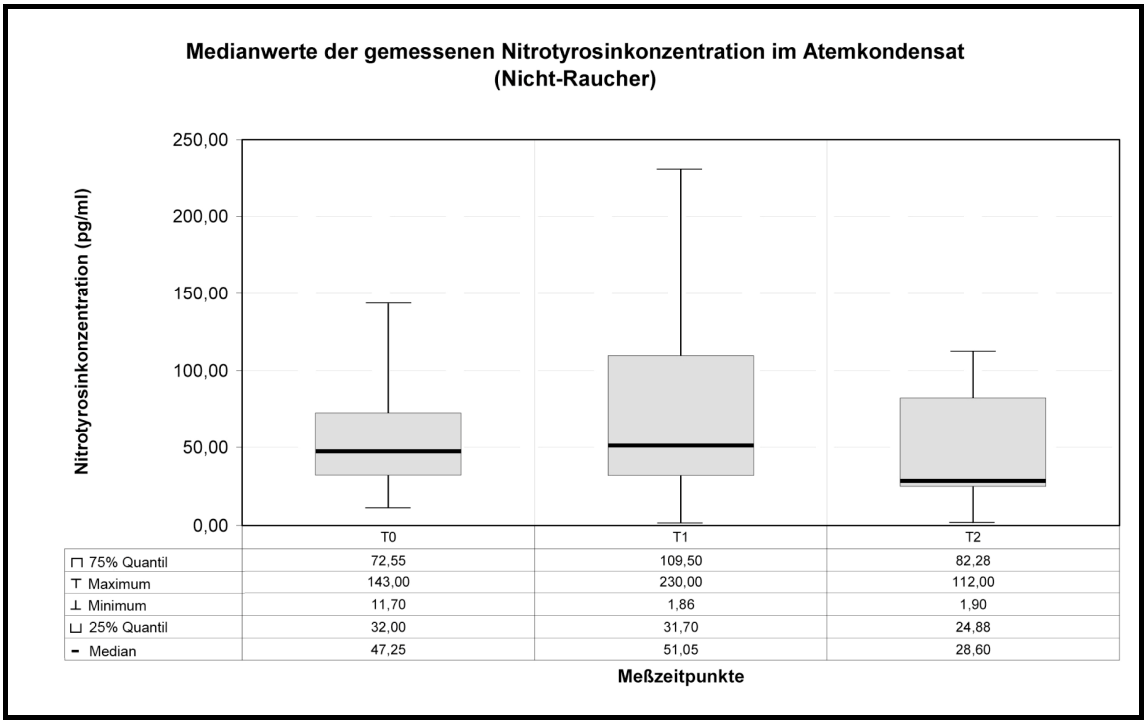
Die Abbildung 5.10 zeigt Boxplots der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration (*pg/ml*) bei Provokation mit Methacholin zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2. Dargestellt werden die Mediane, die Quartile Q_{25} und Q_{75}, sowie Minimum und Maximum. Betrachtet wurden hierbei die Messwerte aller Probanden (*n=20*). Im Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten zeigte sich eine Erniedrigung der Nitrotyrosinkonzentration um 10,45 pg/ml zwischen T0 und T1 und ein weiteres Absinken der Konzentration um 2,25 pg/ml zwischen T1 und T2. Die Konzentration von Nitrotyrosin war im Median zum Zeitpunkt T2 um 12,77 pg/ml niedriger als zum Zeitpunkt T0. Die minimal und maximal gemessenen Konzentrationen zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten können der Abbildung entnommen werden.

Die Abbildungen 5.11.1 – 5.11.4 zeigen in vier Graphen die Medianwerte (in Form von Boxplots) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosinkonzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit Methacholin zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Berücksichtigung des Atopiestatus bzw. der Rauchgewohnheiten:



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	90,38	40,70	92,28
⊤ Maximum	148,00	70,60	100,00
⊥ Minimum	0,00	1,86	11,50
⊔ 25% Quantil	10,82	29,23	28,98
⁃ Median	53,90	34,20	57,50

Abbildung 5.11.1: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Raucher** (n=10).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	72,55	109,50	82,28
⊤ Maximum	143,00	230,00	112,00
⊥ Minimum	11,70	1,86	1,90
⊔ 25% Quantil	32,00	31,70	24,88
⁃ Median	47,25	51,05	28,60

Abbildung 5.11.2: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtraucher** (n=10).

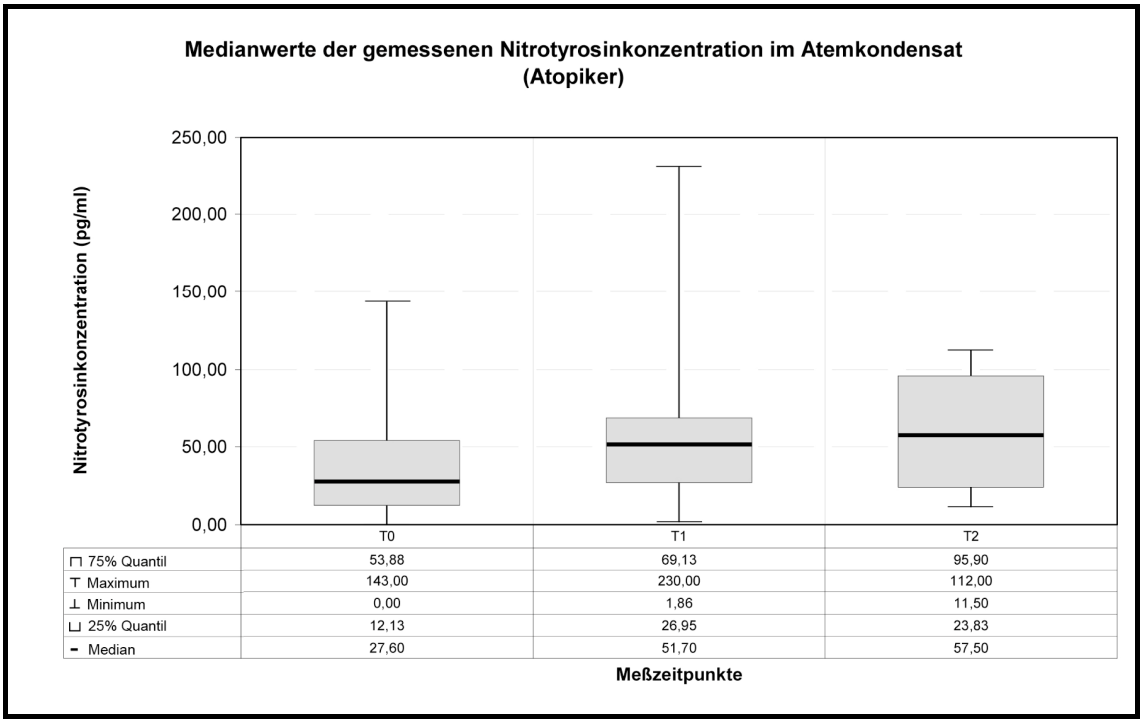


Abbildung 5.11.3: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Atopiker** (n=10).

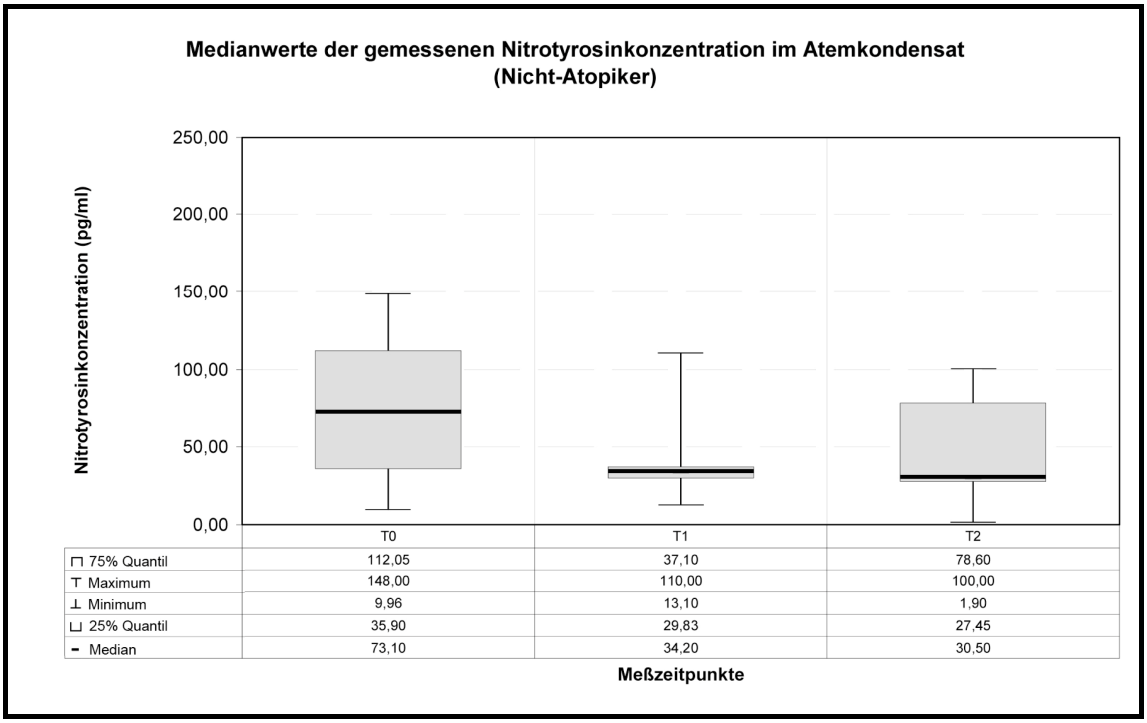


Abbildung 5.11.4: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtatopiker** (n=10).

1.) **Raucher *(Abb. 5.11.1)*:** Der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration lag nach Provokation mit Methacholin um 19,7 pg/ml niedriger (∆*T0-T1*). Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T1 eine um 23,3 pg/ml höhere Nitrotyrosinkonzentration gemessen. Im Vergleich Zeitpunkt T0 zu T2 lag der Median der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration um 3,6 pg/ml höher.

2.) **Nichtraucher *(Abb. 5.11.2)*:** Die Medianwerte der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um +3,8 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um -22,45 pg/ml. Im Vergleich T0 zu T2 lag der Median der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration bei T2 um 18,65 pg/ml niedriger.

3.) **Atopiker *(Abb. 5.11.3):*** In der Probandengruppe der Atopiker stieg die gemessene Nitrotyrosinkonzentration vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 24,1 pg/ml und im Vergleich von T1 zu T2 um 5,8 pg/ml. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug +29,9 pg/ml.

4.) **Nichtatopiker *(Abb. 5.11.4):*** Bei Betrachtung der Nichtatopiker lag die Nitrotyrosinkonzentration im Vergleich von T0 zu T1 um 38,9 pg/ml niedriger. Die gemessene Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zum Zeitpunkt T0 um 42,5 pg/ml und im Vergleich zum Zeitpunkt T1 um 3,7 pg/ml geringer.

Die Abbildungen 5.12.1 – 5.12.4 zeigen in vier Graphen die Medianwerte (*in Form von Boxplots*) der im Atemkondensat gemessenen Nitrotyrosinkonzentration (*in pg/ml*) bei inhalativer Provokation mit Methacholin zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 unter Aufspaltung der Ergebnisse in die vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher.

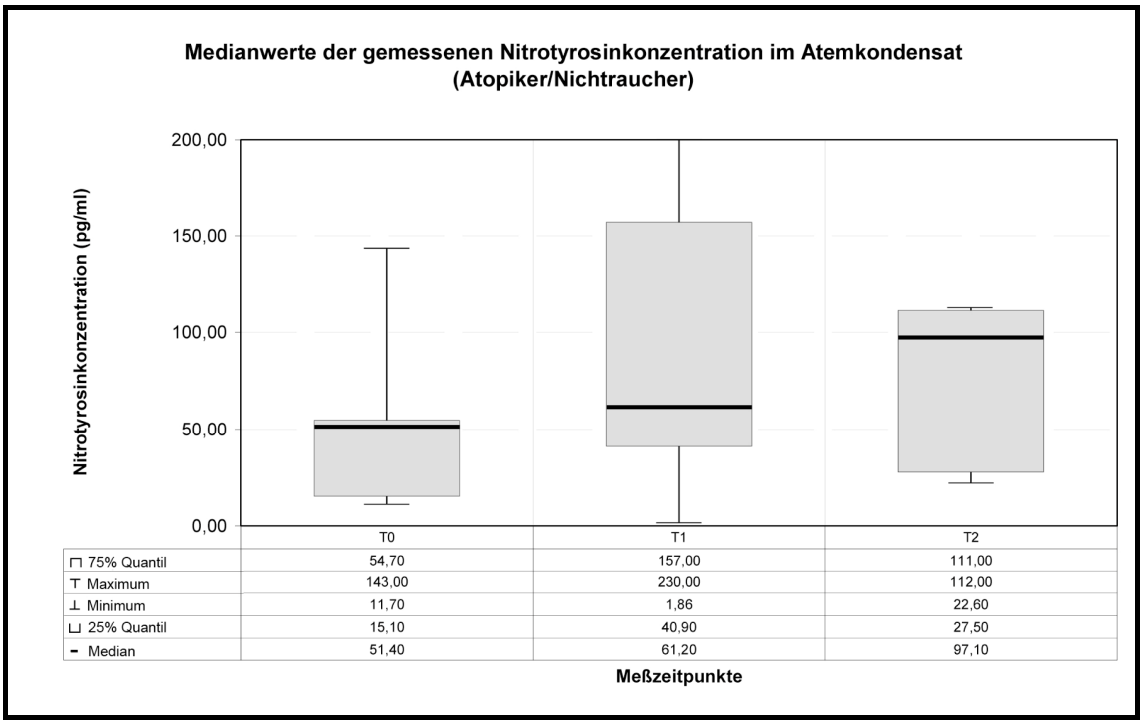


Abbildung 5.12.1: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Atopiker/Nichtraucher** (n=5).

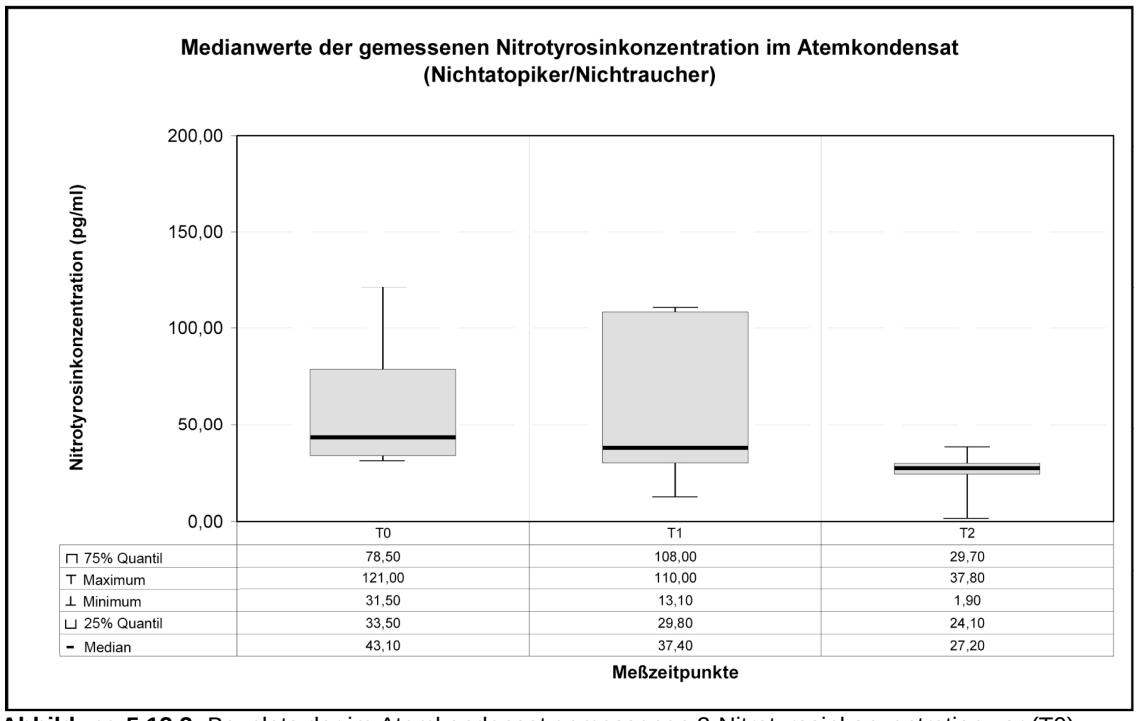
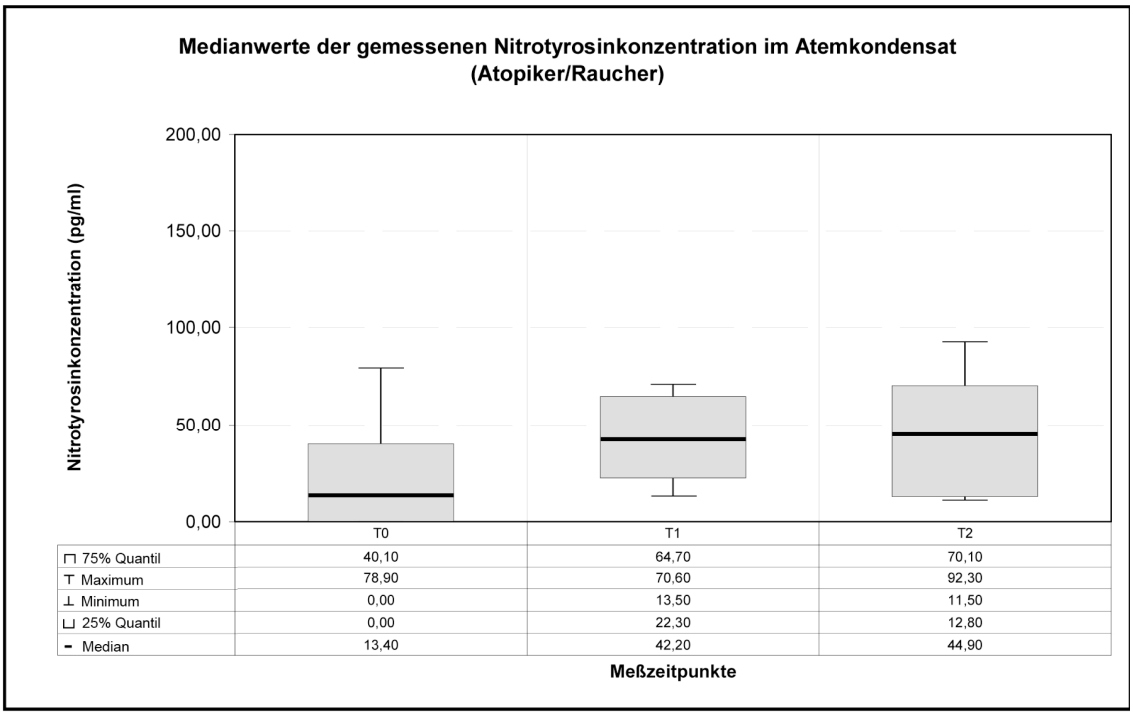
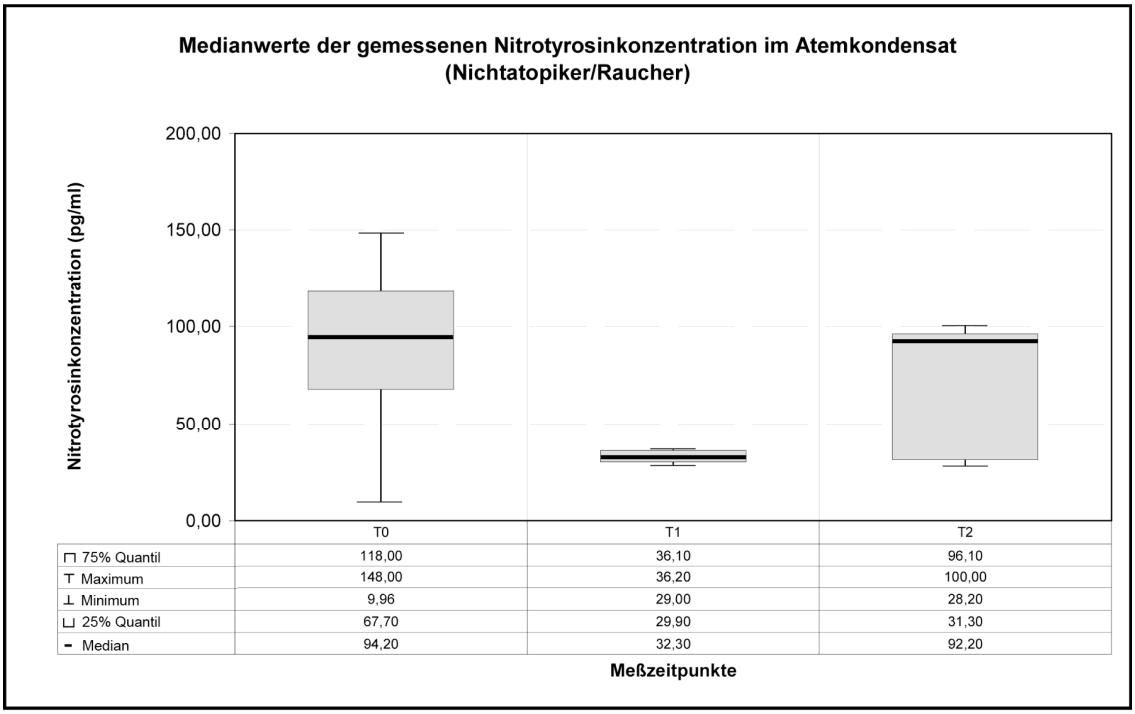


Abbildung 5.12.2: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=5).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	40,10	64,70	70,10
⊤ Maximum	78,90	70,60	92,30
⊥ Minimum	0,00	13,50	11,50
⊔ 25% Quantil	0,00	22,30	12,80
⁃ Median	13,40	42,20	44,90

Abbildung 5.12.3: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Atopiker/Raucher** (n=5).



	T0	T1	T2
⊓ 75% Quantil	118,00	36,10	96,10
⊤ Maximum	148,00	36,20	100,00
⊥ Minimum	9,96	29,00	28,20
⊔ 25% Quantil	67,70	29,90	31,30
⁃ Median	94,20	32,30	92,20

Abbildung 5.12.4: Boxplots der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration vor (T0), 15 Minuten (T1) und 90 Minuten (T2) nach Provokationstestung mit Methacholin. Darstellung der Mediane, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum. Betrachtet wird hierbei die Gruppe der **Nichtatopiker/Raucher** (n=5).

1.) **Atopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.12.1)*:** In der Probandengruppe der nichtrauchenden Atopiker lag der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration vom Zeitpunkt T0 zu T1 um 9,8 pg/ml höher. Im Vergleich von T1 zu T2 war der Wert um 35,9 pg/ml größer. Die Differenz zwischen Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 betrug +45,7 pg/ml.

2.) **Nichtatopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.12.2)*:** Bei Betrachtung der Gruppe der Nichtatopiker/Nichtraucher lag der errechnete Medianwert im Vergleich von T0 zu T1 um 5,7 pg/ml niedriger. Der errechnete Medianwert zum Zeitpunkt T2 war im Vergleich zu T1 um 10,2 pg/ml und im Vergleich zu T0 um 15,9 pg/ml kleiner.

3.) **Atopiker/Raucher *(Abb. 5.12.3)***: Der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration bei den rauchenden Atopikern lag nach Provokation mit Methacholin um 28,8 pg/ml niedriger ($\Delta T0\text{-}T1$). Zum Zeitpunkt T2 wurde im Vergleich zu T0 ein um 31,5 pg/ml größerer Medianwert ermittelt. Im Vergleich Zeitpunkt T1 zu T2 war der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration um 2,7 pg/ml höher.

4.) **Nichtatopiker/Raucher *(Abb. 5.12.4)***: Die Medianwerte der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration änderten sich im Vergleich von T0 zu T1 um -61,9 pg/ml und im Vergleich T1 zu T2 um +59,9 pg/ml. Zwischen T0 und T2 lag der Medianwert der gemessenen Nitrotyrosinkonzentration um 2 pg/ml niedriger.

5.3.3 Signifikanztests (p-Werte):

Bei der statistischen Auswertung der Messergebnisse auf die eingangs formulierten Hypothesen ergab sich bei einem Signifikanzniveau von 5% kein statistisch signifikantes Ergebnis, d.h. alle ermittelten p-Werte waren ≥ 0,05.

Die formulierten Hypothesen für die inhalative Provokation mit Methacholin waren:

1. „Die Nitrotyrosinkonzentration unmittelbar nach dem Methacholintest ist höher als vor der Provokation“

Die durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab für die Innerhalb-Subjekteffekte bei Berücksichtigung der Messwerte aller Probanden (*n=20*) einen p-Wert von 0,8924. Bei der Ermittlung der Kontrastvariablen (*Kontrast Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T1*) ergab sich ein p-Wert von 0,7017.

2. *„Die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat 90 Minuten nach dem Methacholintest ist höher als vorher und höher als unmittelbar nach dem Provokationstest.“*

Der univariate Hypothesentest ergab für die Innerhalb-Subjekteffekte unter Berücksichtigung aller Probanden einen p-Wert von 0,8924. Bei der Analyse der Kontrastvariabeln für Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T1 ergab sich ein p-Wert von 0,9042 und für Zeitpunkt T1 zu Zeitpunkt T2 ein p-Wert von 0,6854.

3. *„Die unter 1. und 2. beschriebenen Effekte sind bei Rauchern stärker ausgeprägt als bei Nichtrauchern.“*

Die Varianzanalyse mit wiederholten Messungen ergab für die Innerhalb-Subjekteffekte bei alleiniger Berücksichtigung der Messwerte der Raucher einen p-Wert von 0,1609. Die Varianzanalyse der Kontrastvariabeln ergab bei Kontrast von Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T1 einen p-Wert von 0,1672, bei Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 einen p-Wert von 0,5743 und bei Zeitpunkt T1 zu Zeitpunkt T2 einen p-Wert von 0,2431.

4. *„Die unter 1. und 2. beschriebenen Effekte sind bei Atopikern stärker ausgeprägt als bei Nichtatopikern.“*

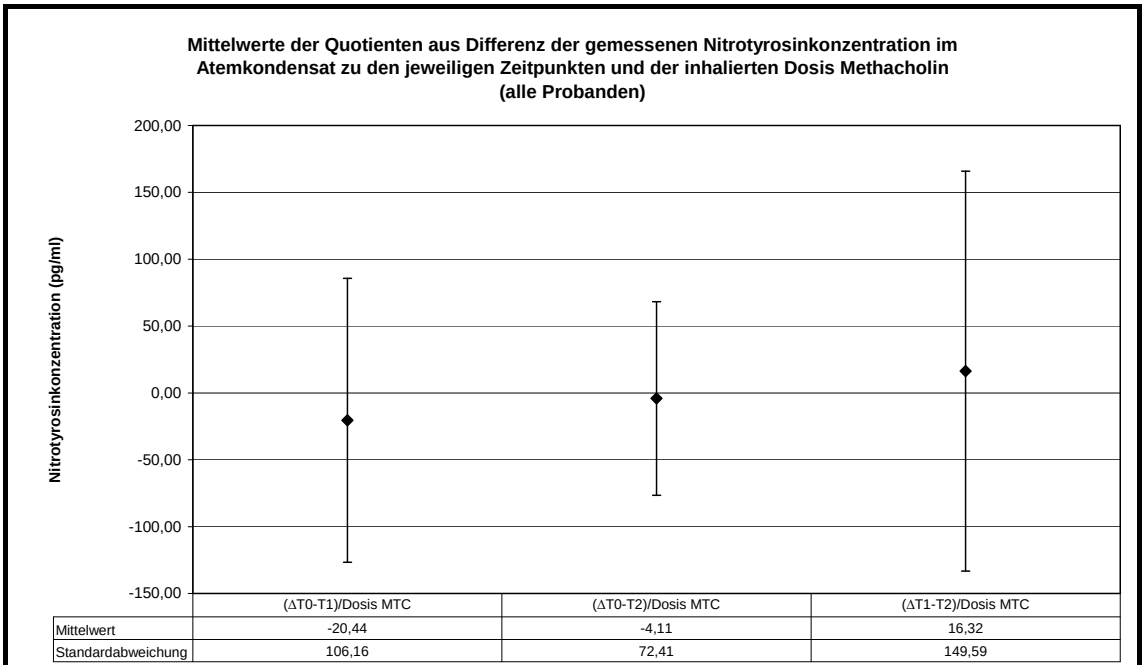
Die Varianzanalyse mit wiederholten Messungen ergab für die Innerhalb-Subjekteffekte bei alleiniger Berücksichtigung der Messwerte der Atopiker einen p-Wert von 0,2192. Die Varianzanalyse der Kontrastvariabeln ergab bei Kontrast von Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T1 einen p-Wert von 0,0861, bei Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T2 einen p-Wert von 0,1404 und bei Zeitpunkt T1 zu Zeitpunkt T2 einen p-Wert von 0,8736.

5. *„Die unter 1. und 2. beschriebenen Effekte haben bei rauchenden Atopikern die stärkste Ausprägung und sind somit stärker als bei nichtrauchenden Atopikern, bei rauchenden Nichtatopikern und nichtrauchenden Nichtatopikern.“*

Bei Auswertung der Messergebnisse aufgeschlüsselt in die definierten vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher ergab die Varianzanalyse für Innerhalb-Subjekteffekte einen p-Wert von 0,2435. Bei der Analyse der Kontrastvariabeln für Kontrast von Zeitpunkt T0 zu Zeitpunkt T1 ergab sich ein p-Wert von 0,1060, für Kontrast von Zeitpunkt T0 zu T2 ein p-Wert von 0,5066 und für Kontrast von Zeitpunkt T1 zu T2 ein p-Wert von 0,3190.

5.3.4 Ergebnisse bei der Inhalativen Provokation mit Methacholin unter Berücksichtigung der individuell von den Probanden inhalierten kumulativen Dosis Methacholin:

5.3.4.1 Mittelwerte:



	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
Mittelwert	-20,44	-4,11	16,32
Standardabweichung	106,16	72,41	149,59

Abbildung 5.13: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin. Betrachtet werden hierbei **alle Probanden** der Studie (n=20). Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

In der Abbildung 5.13 werden die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (*pg/ml*) zwischen den Zeitpunkten T0, T1, T2 und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin graphisch dargestellt. Betrachtet werden hierbei die Messwerte aller Probanden (*n=20*).

Im direkten Vergleich zeigte sich ein Anstieg von 16,33 zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und ein Anstieg von 36,76 zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC]. Im Vergleich der Quotienten [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] zu [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug die Differenz der beiden Mittelwerte +20,43. *(Keine signifikante Änderung.)*

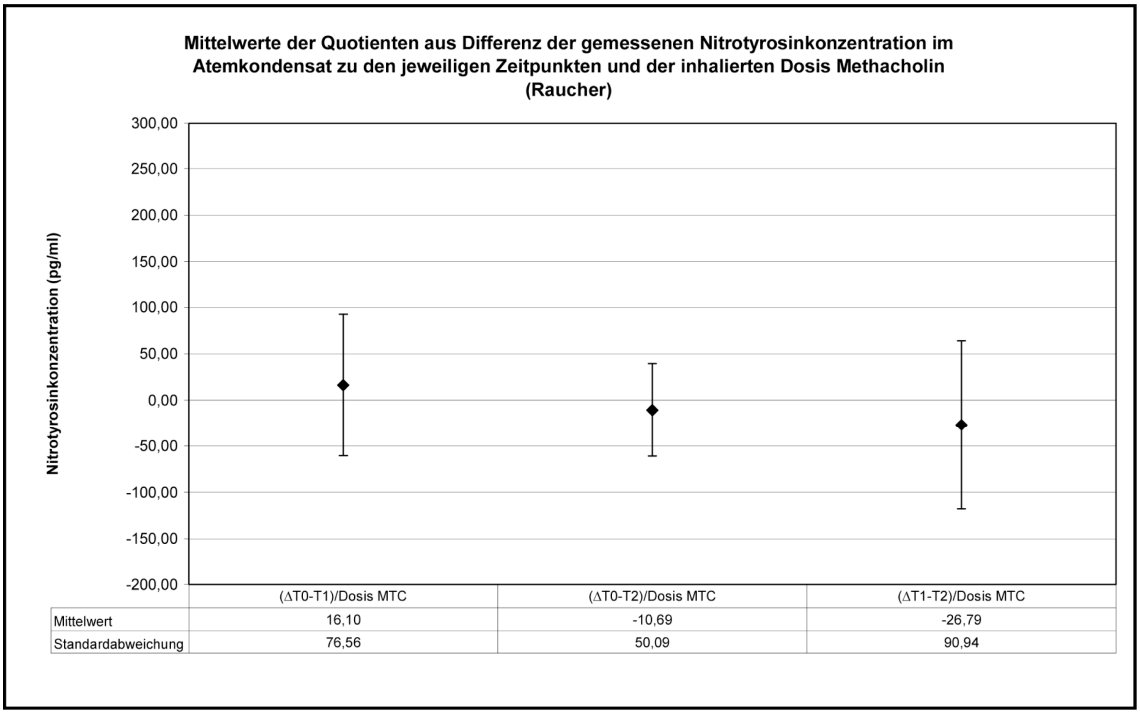


Abbildung 5.14.1: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Raucher** (n=10).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

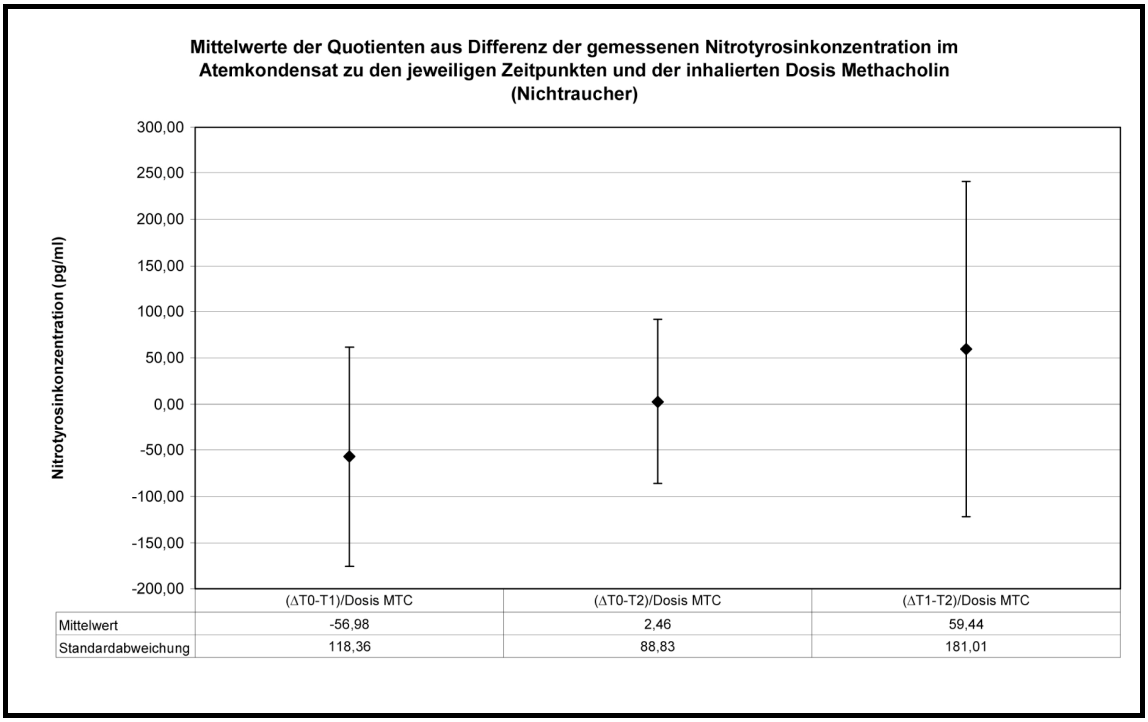


Abbildung 5.14.2: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtraucher** (n=10).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

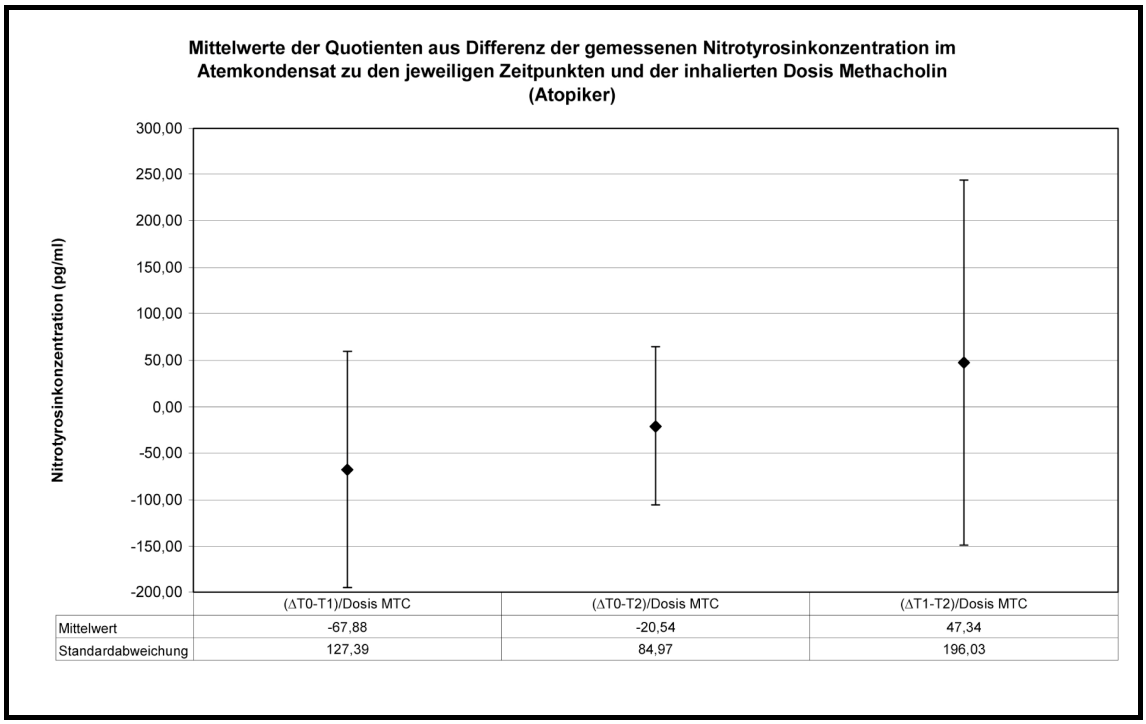


Abbildung 5.14.3: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker** (n=10).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

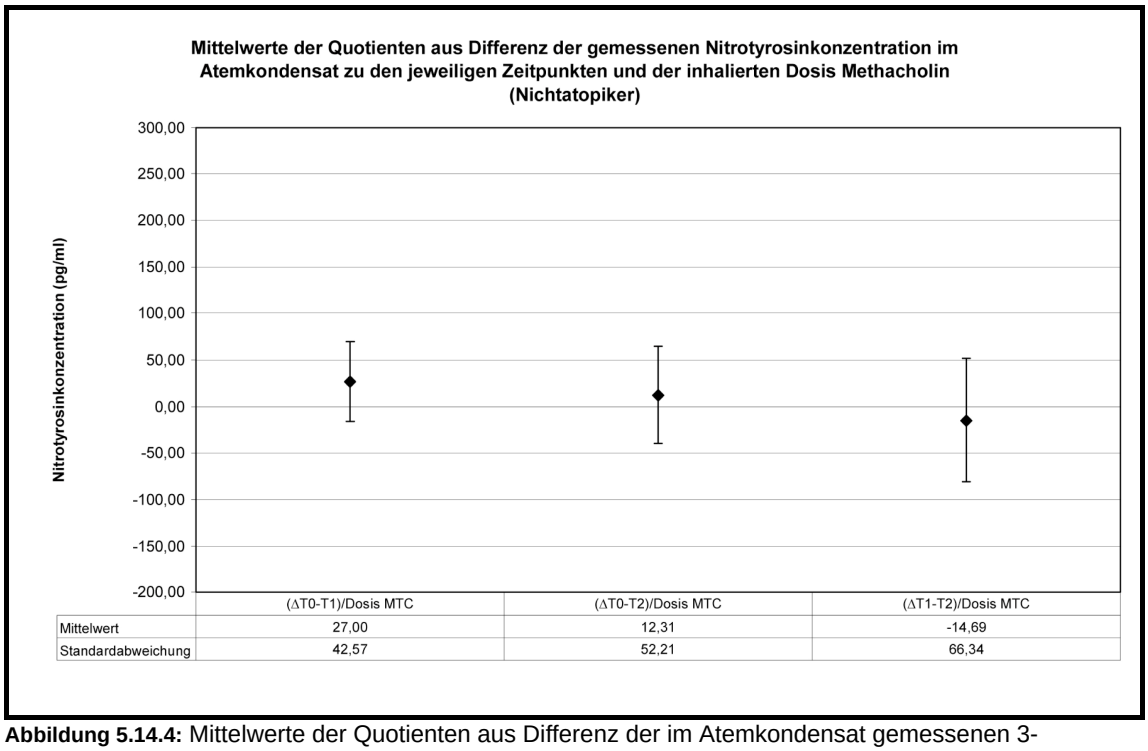


Abbildung 5.14.4: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker** (n=10).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

Die Abbildungen 5.14.1 – 5.14.4 zeigen vier Graphen mit den Mittelwerten (samt einfacher Standardabweichung) der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (pg/ml) zwischen den Zeitpunkten T0, T1, T2 und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin unter Berücksichtigung des Atopiestatus bzw. der Rauchgewohnheiten.

1.) **Raucher *(Abb. 5.14.1)*:** Der errechnete Mittelwert lag bei der Gruppe der Raucher für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] im Vergleich zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um 26,79 niedriger. Der Mittelwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um 42,89 kleiner. [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] hatten eine Differenz von -16,1.
(Keine signifikante Änderung.)

2.) **Nichtraucher *(Abb. 5.14.2)*:** Die Differenz der Mittelwerte [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] betrug +59,44. Zwischen [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war der Unterschied +56,98 groß. Der Mittelwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um 116,42 größer. *(Keine signifikante Änderung.)*

3.) **Atopiker *(Abb. 5.14.3)***: Bei der Betrachtung der Atopiker lag der errechnete Mittelwert im Vergleich von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um 47,34 höher. Der errechnete Mittelwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um +67,88 und im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um +115,22 größer. *(Keine signifikante Änderung.)*

4.) **Nichtatopiker *(Abb. 5.14.4)***: Der Mittelwert für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um 14,69 größer. Im Vergleich von Zeitpunkt [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] lag der Mittelwert um 41,69 höher. Der Mittelwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um +27,00 größer. *(Keine signifikante Änderung.)*

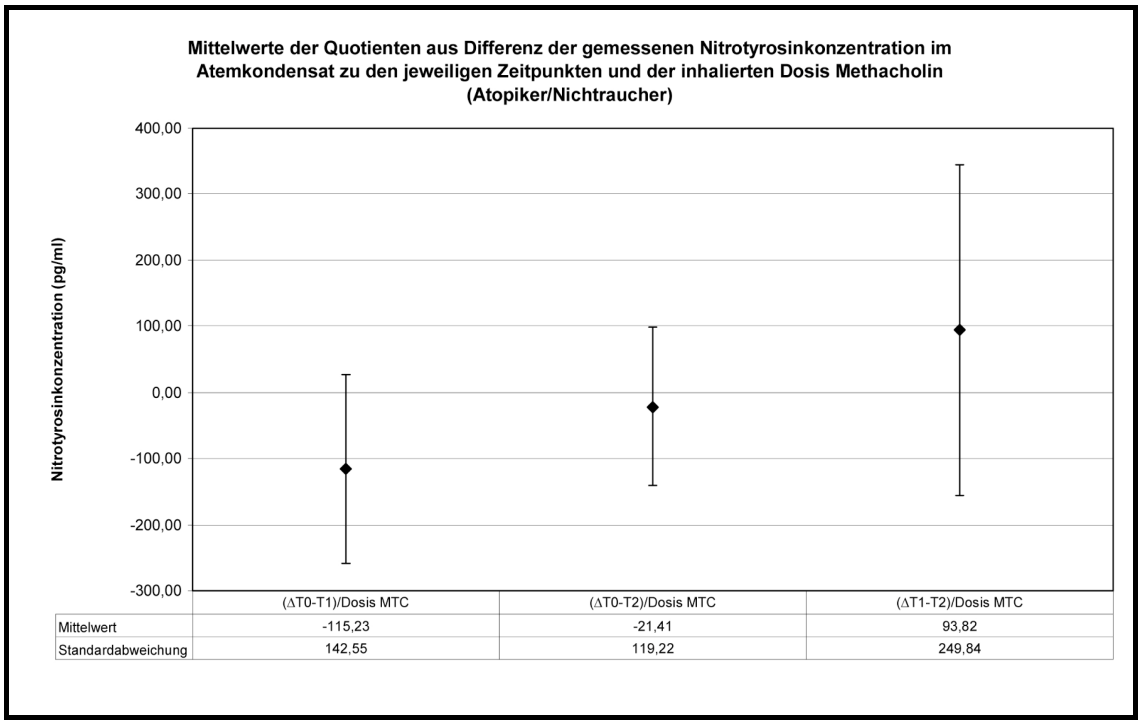


Abbildung 5.15.1: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker/Nichtraucher** (n=5).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

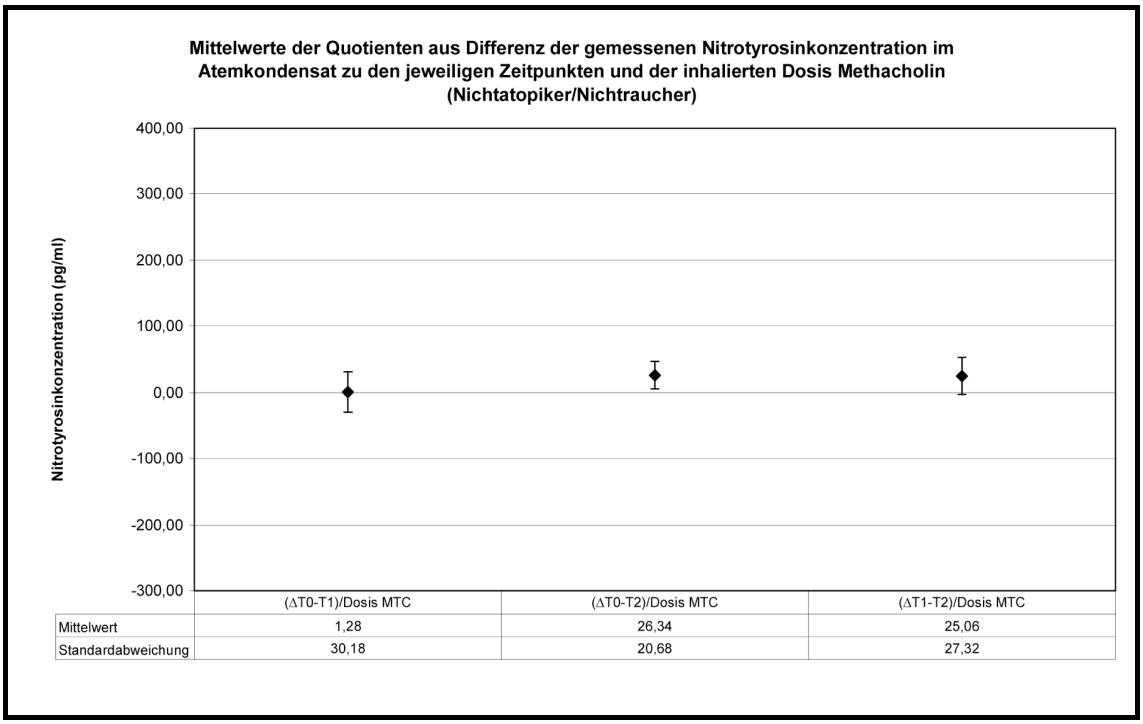


Abbildung 5.15.2: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=5).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

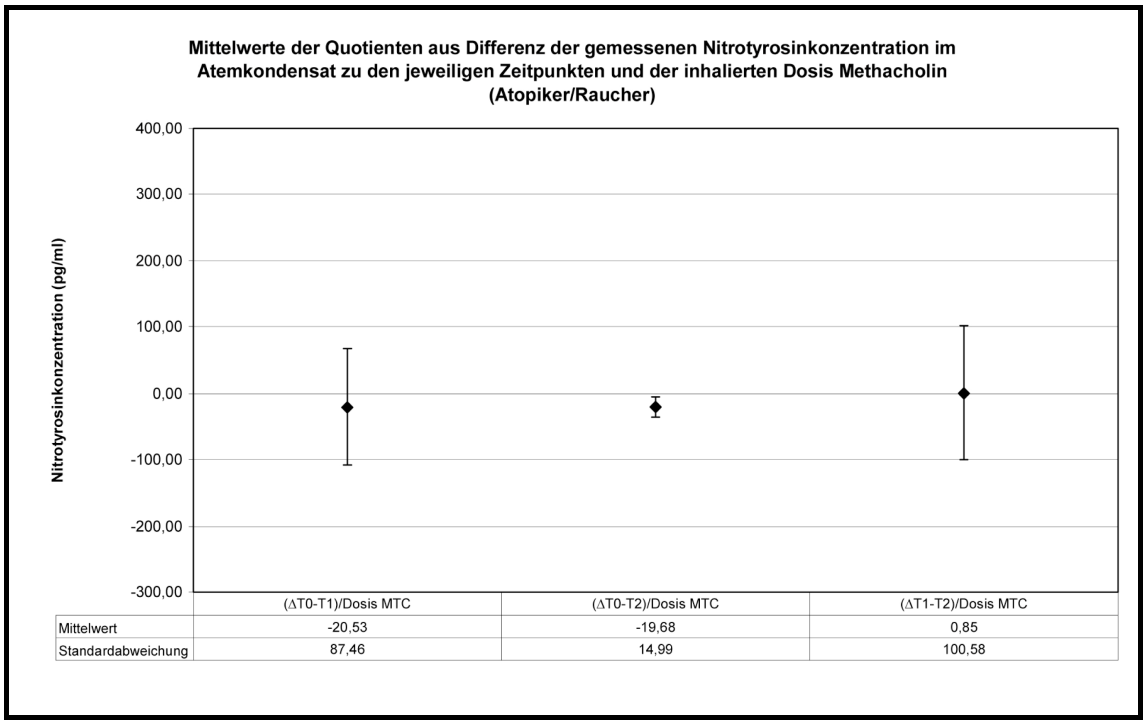


Abbildung 5.15.3: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker/Raucher** (n=5).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

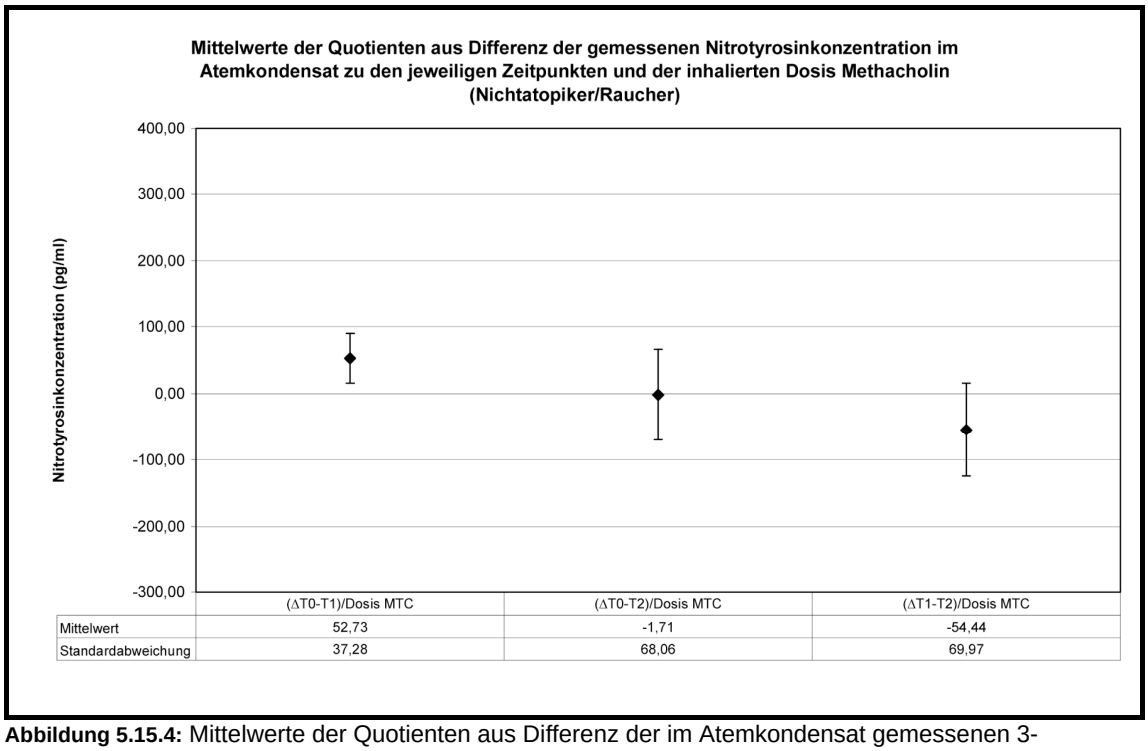


Abbildung 5.15.4: Mittelwerte der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=5).
Neben den Mittelwerten (♦) wird die einfache Standardabweichung grafisch dargestellt.

Die Abbildungen 5.15.1 – 5.15.2 zeigen in vier Graphen die Mittelwerte (samt einfacher Standardabweichung) der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (*pg/ml*) zwischen den Zeitpunkten T0, T1, T2 und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin (*mg*) unter Aufspaltung des Probandenkollektivs in die vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher:

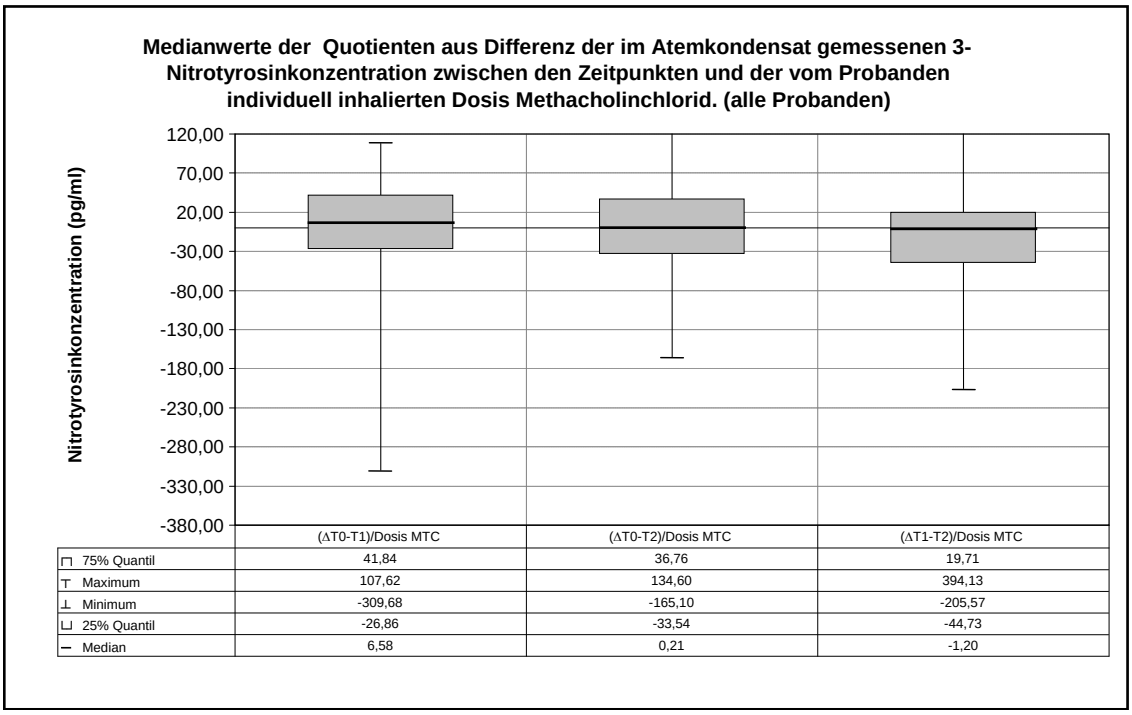
1.) **Atopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.15.1)*:** In der Probandengruppe der nichtrauchenden Atopiker hatten die Mittelwerte für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] eine Differenz von +93,82. Im Vergleich von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] lag der Wert um +209,05 höher. Die Differenz zwischen [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug +115,23. *(Keine signifikante Änderung.)*

2.) **Nichtatopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.15.1)*:** Bei der Betrachtung der Nichtatopiker/Nichtraucher war der errechnete Mittelwert im Vergleich von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um 25,06 größer. Der Mittelwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um +23,78 höher und im Vergleich zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um -1,28 niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

3.) **Atopiker/Raucher *(Abb. 5.15.1)***: Der Mittelwert der Quotienten bei den rauchenden Atopiker lag im Vergleich von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um 0,85 höher. Bei [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war der Mittelwert im Vergleich zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um +20,53 und im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um +21,38 größer. *(Keine signifikante Änderung.)*

4.) **Nichtatopiker/Raucher *(Abb. 5.15.1)***: Die Differenz der Mittelwerte [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] betrug -54,44. Zwischen [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug die Differenz -52,73. Der Mittelwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um 107,17 niedriger. *(Keine signifikante Änderung.)*

5.3.4.2 Medianwerte:

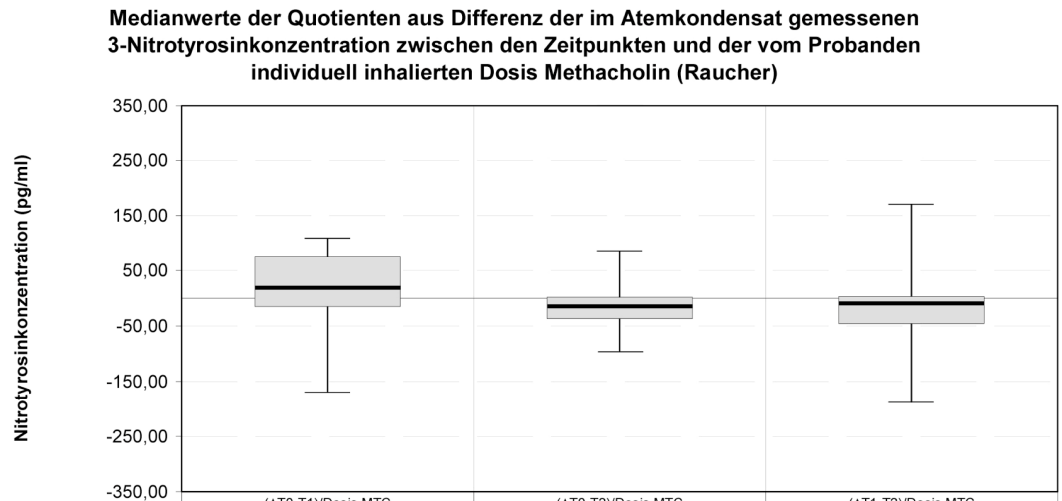


	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	41,84	36,76	19,71
⊤ Maximum	107,62	134,60	394,13
⊥ Minimum	-309,68	-165,10	-205,57
⊔ 25% Quantil	-26,86	-33,54	-44,73
─ Median	6,58	0,21	-1,20

Abbildung 5.16: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin. Betrachtet werden hierbei **alle Probanden** der Studie (n=20). Grafische Darstellung der Medianwerte, 25%- und 75%-Quantile, Minimum, Maximum.

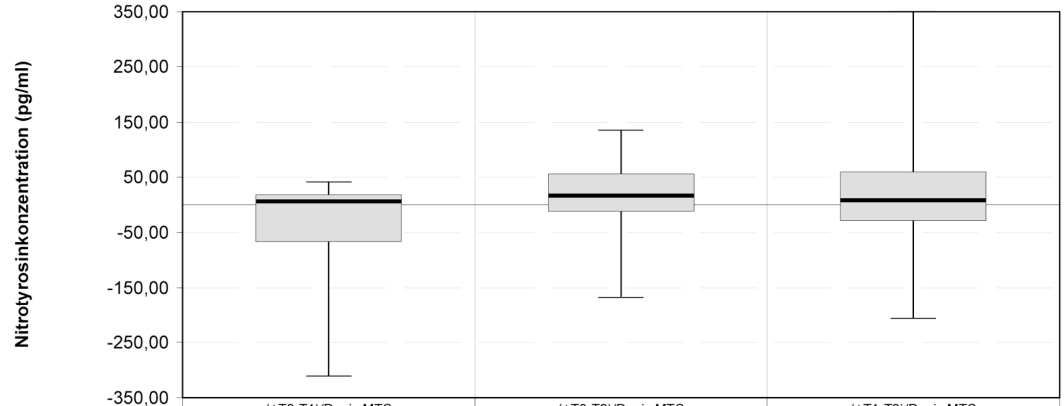
Die Abbildung 5.16 zeigt Boxplots der errechneten Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (*pg/ml*) zwischen den Zeitpunkten T0, T1, T2 und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin. Dargestellt werden die Medianwerte, die Quartile Q_{25} und Q_{75}, sowie Minimum und Maximum. Betrachtet werden hierbei die Messwerte aller Probanden (*n=20*). Im Vergleich zwischen den einzelnen Quotienten zeigte sich eine Differenz des Medianwertes von -6,37 zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC]. Zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug die Differenz -7,78 und zwischen [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug die Differenz -1,41. Die minimal und maximal errechneten Werte für die drei unterschiedlichen Quotienten können der Abbildung entnommen werden.

Die Abbildungen 5.17.1 – 5.17.4 zeigen in vier Graphen die Medianwerte (*in Form von Boxplots*) der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (pg/ml) zwischen den Zeitpunkten T0, T1, T2 und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin unter Berücksichtigung des Atopiestatus bzw. der Rauchgewohnheiten:



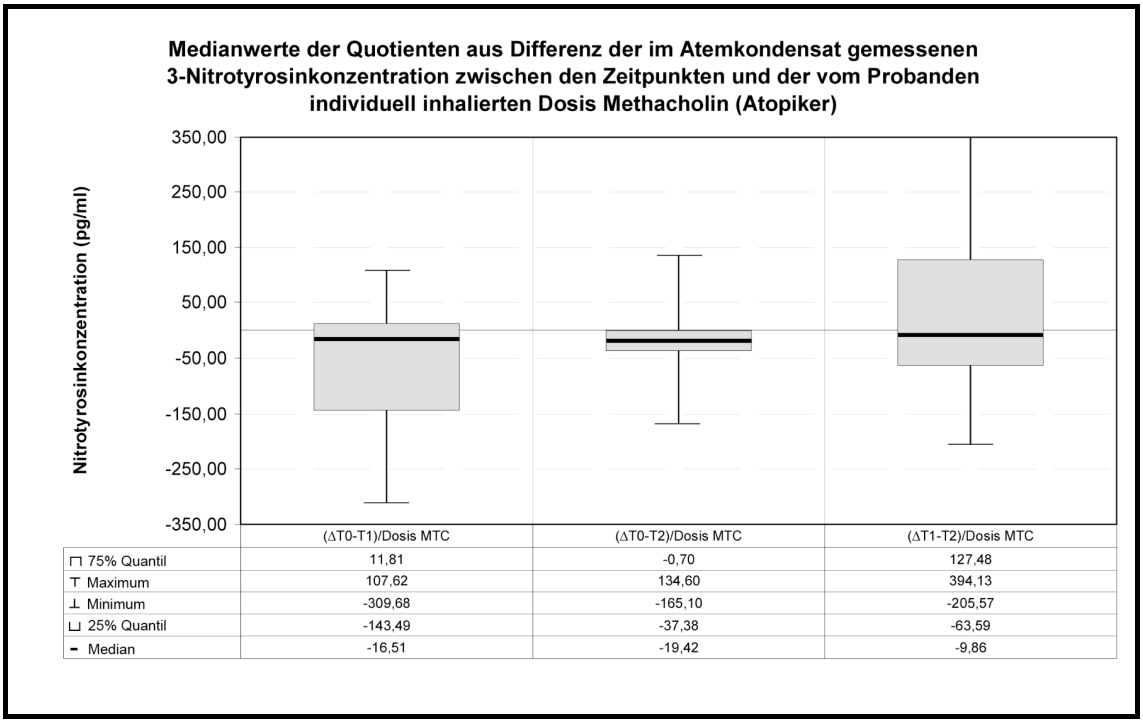
	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	75,51	0,98	2,52
⊤ Maximum	107,62	84,37	169,50
⊥ Minimum	-167,74	-94,72	-187,39
⊔ 25% Quantil	-15,29	-37,38	-46,43
▬ Median	18,22	-14,61	-9,86

Abbildung 5.17.1: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Raucher** (n=10).



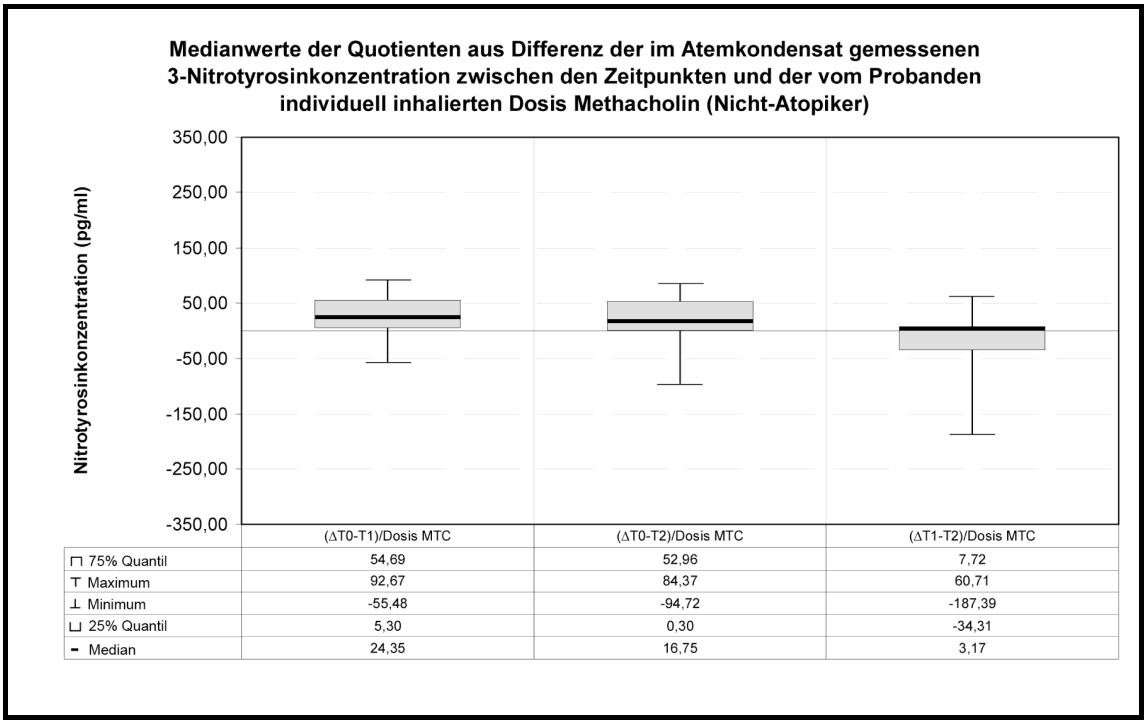
	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	17,78	55,39	59,32
⊤ Maximum	40,47	134,60	394,13
⊥ Minimum	-309,68	-165,10	-205,57
⊔ 25% Quantil	-66,90	-11,98	-28,88
▬ Median	6,58	16,75	7,54

Abbildung 5.17.2: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtraucher** (n=10).



	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	11,81	-0,70	127,48
⊤ Maximum	107,62	134,60	394,13
⊥ Minimum	-309,68	-165,10	-205,57
⊔ 25% Quantil	-143,49	-37,38	-63,59
- Median	-16,51	-19,42	-9,86

Abbildung 5.17.3: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker** (n=10).



	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	54,69	52,96	7,72
⊤ Maximum	92,67	84,37	60,71
⊥ Minimum	-55,48	-94,72	-187,39
⊔ 25% Quantil	5,30	0,30	-34,31
- Median	24,35	16,75	3,17

Abbildung 5.17.4: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker** (n=10).

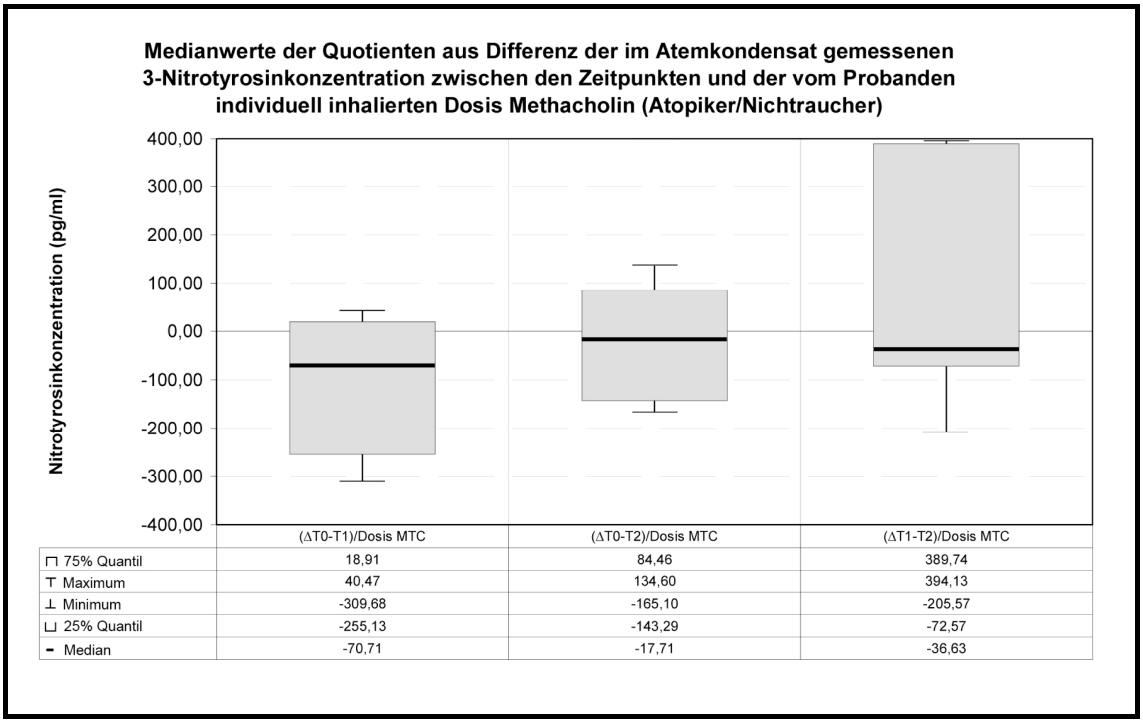
1.) **Raucher *(Abb. 5.17.1)*:** Die Differenz zwischen den Medianwerten für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] betrug -32,83. Die Differenz zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug -28,08. Im Vergleich Medianwert für [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] zu Medianwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug der Unterschied +4,75.

2.) **Nichtraucher *(Abb. 5.17.2)*:** Die Medianwerte für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] waren +0,96 größer als für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und -9,21 kleiner als für [(ΔT0-T2)/Dosis MTC]. Die Differenz zwischen den Quotienten [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] betrug +10,17.

3.) **Atopiker *(Abb. 5.17.3)***: Der Unterschied zwischen den Quotienten [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] war -2,91. Zwischen den Quotienten [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug der Unterschied +6,65. Die Differenz zwischen den Medianwerten für [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug +9,56.

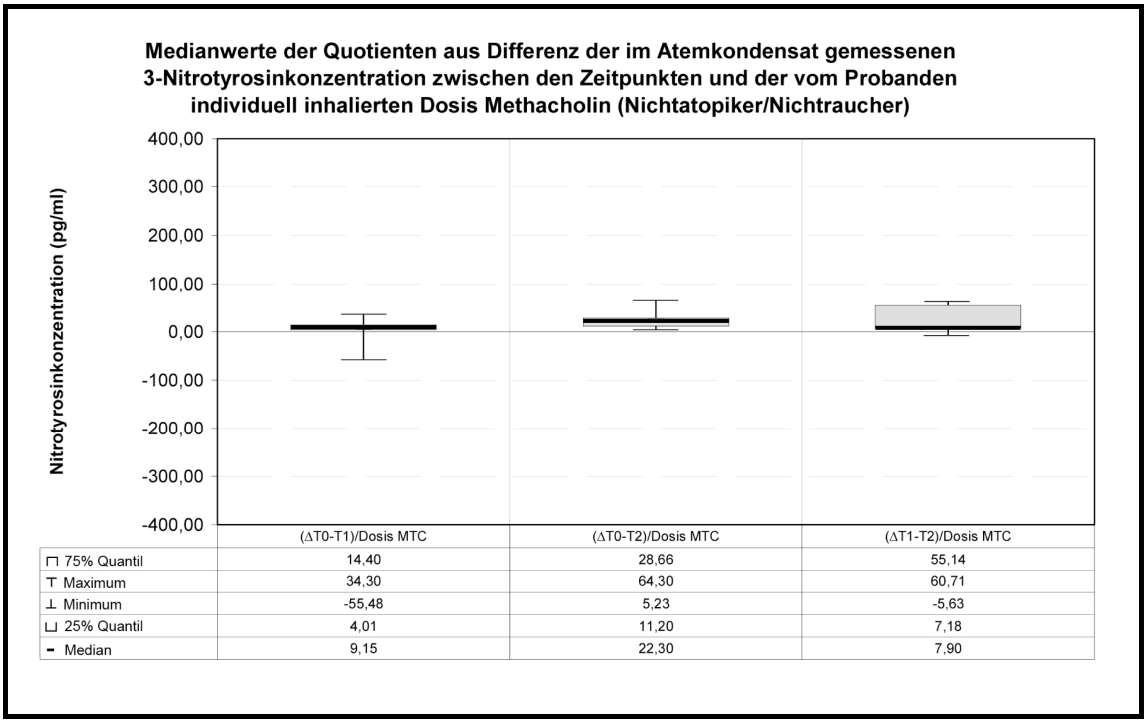
4.) **Nichtatopiker *(Abb. 5.17.4)***: Der errechnete Medianwert für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] war um +7,6 größer als der Medianwert für [(ΔT0-T2)/Dosis MTC]. Die Differenz zwischen den Medianen von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug -21,18. Die Differenz zwischen den Quotienten [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug -13,58.

Die Abbildungen 5.18.1 – 5.18.4 zeigen in vier Graphen die Medianwerte (*in Form von Boxplots*) der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration (pg/ml) zwischen den Zeitpunkten T0, T1, T2 und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin unter Aufspaltung der Ergebnisse in die vier Untergruppen Atopiker/Raucher, Atopiker/Nichtraucher, Nichtatopiker/Raucher und Nichtatopiker/Nichtraucher.



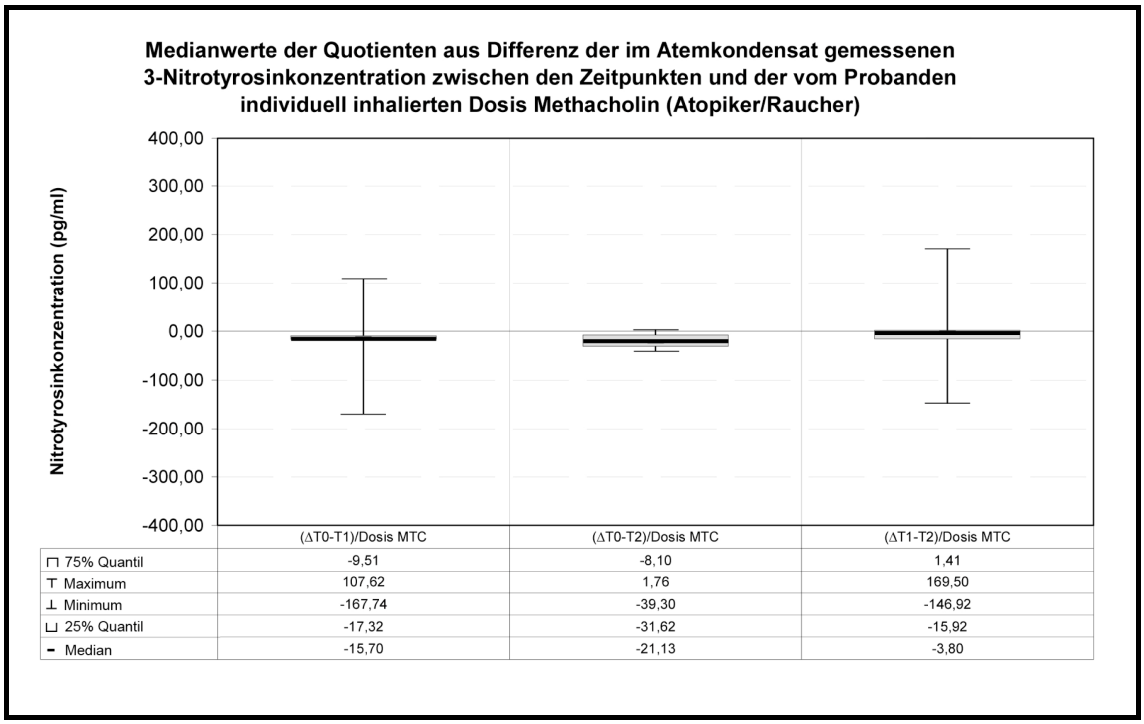
	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	18,91	84,46	389,74
⊤ Maximum	40,47	134,60	394,13
⊥ Minimum	-309,68	-165,10	-205,57
⊔ 25% Quantil	-255,13	-143,29	-72,57
⁃ Median	-70,71	-17,71	-36,63

Abbildung 5.18.1: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker/Nichtraucher** (n=5).



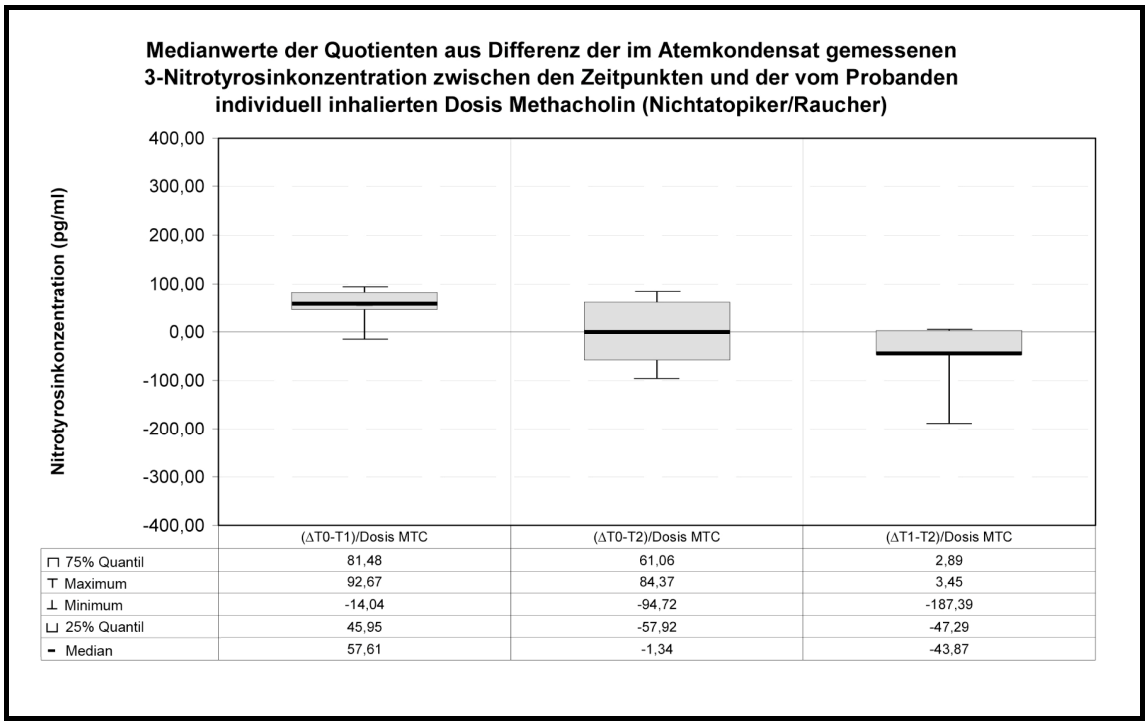
	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	14,40	28,66	55,14
⊤ Maximum	34,30	64,30	60,71
⊥ Minimum	-55,48	5,23	-5,63
⊔ 25% Quantil	4,01	11,20	7,18
⁃ Median	9,15	22,30	7,90

Abbildung 5.18.2: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker/Nichtraucher** (n=5).



	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	-9,51	-8,10	1,41
⊤ Maximum	107,62	1,76	169,50
⊥ Minimum	-167,74	-39,30	-146,92
⊔ 25% Quantil	-17,32	-31,62	-15,92
⁃ Median	-15,70	-21,13	-3,80

Abbildung 5.18.3: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Atopiker/Raucher** (n=5).



	(ΔT0-T1)/Dosis MTC	(ΔT0-T2)/Dosis MTC	(ΔT1-T2)/Dosis MTC
⊓ 75% Quantil	81,48	61,06	2,89
⊤ Maximum	92,67	84,37	3,45
⊥ Minimum	-14,04	-94,72	-187,39
⊔ 25% Quantil	45,95	-57,92	-47,29
⁃ Median	57,61	-1,34	-43,87

Abbildung 5.18.4: Boxplots der Quotienten aus Differenz der im Atemkondensat gemessenen 3-Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten (T0 zu T1; T0 zu T2 und T1 zu T2) und der vom Probanden individuell inhalierten Dosis Methacholin.
Grafische Darstellung der Medianwerte,25%- und 75%-Quantile, Minimum und Maximum. Die Auswertung erfolgte für die Gruppe der **Nichtatopiker/Raucher** (n=5).

1.) **Atopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.18.1)*:** Die Differenz der Medianwerte [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] betrug +53. Zwischen [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug die Differenz -18,92. Der Medianwert für [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war im Vergleich zu [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] um 34,08 höher.

2.) **Nichtatopiker/Nichtraucher *(Abb. 5.18.2)*:** In der Probandengruppe der nichtrauchenden Nichtatopiker hatten die Medianwerte für [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] eine Differenz von +13,15. Im Vergleich von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug die Differenz -1,25. Die Differenz zwischen [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug -14,4.

3.) **Atopiker/Raucher *(Abb. 5.18.3)***: Die Medianwerte der Quotienten [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] zeigten eine Differenz von -5,43. Die Differenz zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] betrug +11,9. Im Vergleich Quotient [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] zu [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] war der Medianwert um +17,33 höher.

4.) **Nichtatopiker/Raucher *(Abb. 5.18.4)***: Die Medianwerte Quotienten unterschieden sich im Vergleich von [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT0-T2)/Dosis MTC] um -58,95 und im Vergleich [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] zu [(ΔT1-T2)/Dosis MTC] um -101,48. Im Vergleich zwischen [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] und [(ΔT0-T1)/Dosis MTC] betrug die Differenz -42,53.

5.3.4.3 Signifikanztests (p-Werte):

Bei der statistischen Auswertung für die Quotienten aus Differenz der einzelnen Messergebnisse zwischen den Zeitpunkten (*T0 zu T1; T0 zu T2; T1 zu T2*) und der individuell inhalierten Dosis Methacholin ergab sich kein statisch signifikantes Ergebnis. (*Signifikanzniveau 5%*)

6 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, die Hypothese zu untersuchen, ob eine inhalative Provokation mit Methacholin einen Einfluss auf die Konzentration von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat hat. Diese Hypothese basierte auf der Annahme, dass die Inhalation von Methacholin und dessen potenzielle Auswirkungen auf die Atemwegsgeometrie zu oxidativem Stress in den unteren Atemwegen führen. In wissenschaftlichen Studien wurde bereits die positive Korrelation von oxidativem Stress mit dem Auftreten von 3-Nitrotyrosin nachgewiesen [*Schwedhelm (2000)*]. Nitrotyrosin ist ein stabiles Endprodukt und Biomarker des Status des oxidativen Stresses, welcher im nicht-invasiv gewonnenen Atemkondensat mit Hilfe der Massenspektrometrie im pg/ml-Bereich gemessen werden kann.
In zahlreichen Studien [*Persson et al. (1994), Kharitonov et al. (1994), Kharitonov et al. (1995*), *Massaro et al. (1996), Mehta et al. (1997), Guo et al. (2000), Silkhoff et al. (2000) und Dweik et al. (2001)*] wurde bereits die positive Korrelation von NO mit atopischem Asthma und/oder Rauchen nachgewiesen. Die Bildung von Nitrotyrosin ist abhängig von dem Vorhandensein von NO und von Superoxidanionradikalen, die im Rahmen des oxidativen Stresses entstehen. Durch die bekannte mögliche Reaktion des NO mit Superoxidanionradikalen zu Peroxynitrit ist der Zusammenhang zur Nitrotyrosinbildung gegeben (*siehe 2.1 „Oxidativer Stress und Nitrotyrosin“*). Daher ging die Studie von der Annahme aus, dass das Auftreten von oxidativem Stress nach inhalativer Provokation mit Methacholin positiv mit dem Vorhandensein einer Atopie und/oder Rauchen korreliert.

Diese Hypothesen wurden widerlegt: Es konnte kein signifikanter Einfluss (*Signifikanzniveau 5%*) der unspezifischen Provokation mit Methacholin auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat - weder unter Berücksichtigung des Atopiestatus, noch unter Berücksichtung des Raucherstatus - nachgewiesen werden.

6.1 Diskussion der Methoden:

Bei der Auswahl der Methoden zur Versuchsdurchführung, Probengewinnung, Lagerung und Analyse orientierten wir uns streng an den Empfehlungen und Leitlinien der European Respiratory Society, der American Thoracic Society und der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin.

Die 20 teilnehmenden Probanden wurden nach dargelegtem Schema (*siehe 4.2.2 „Kollektiverstellung“*) rekrutiert und den beschriebenen Untergruppen zugeordnet. Nach Horváth et al. sind die geschlechts-, gewichts- und altersbezogenen Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung des Atemkondensates bisher noch nicht geklärt (*2005*). Gemessen an den definierten Erfordernissen zur Teilnahme an dieser Studie können alle teilnehmenden Probanden als gesund und normalgewichtig bezeichnet werden. Vorliegende Ergebnisse des Mikrozensus des Bundesamtes für Statistik und des Landesamtes für den öffentlichen Gesundheitsdienst NRW belegen zudem eine niedrige Prävalenz in der Altersgruppe der 20 bis 40 Jährigen bei Erkrankungen im Allgemeinen und Atemwegserkrankungen im Speziellen. Folglich kann das Probandenkollektiv dieser Studie nach aktuellem Kenntnisstand als relativ risikoarm auch in Bezug auf bisher noch unbekannte Confounder angesehen werden.

Die Sammlung der Atemkondensatproben fand vor, 15 Minuten nach und 90 Minuten nach Provokationstestung statt. Die Durchführung der standardisierten Sammlung von Atemkondensat entsprach den Empfehlungen und Richtlinien der ATS/ERS Taskforce.
Am Tage der Messung durfte nicht geraucht werden, da das Rauchen von Zigaretten einen nachgewiesenen Effekt auf den Nitrotyrosin-Spiegel im Atemkondensat hat [*Nowak et al. (1996), Guatara et al. (2000), Balint et al. (2001), Garey et al. (2004), Horváth et al. (2004)].* Somit sollte ein akuter Einfluss des Rauchens auf den Nitrotyrosinspiegel verhindert werden. In der Gruppe der Raucher befanden sich drei ehemalige Raucher. Diese Maßnahme des Rauchstopps könnte somit kurzfristige Effekte des Rauchens auf die Zusammensetzung des Atemkondensats verringern und die Gruppe der Raucher mit ihren ehemaligen und noch aktiven Rauchern homogenisieren. Des Weiteren konnte in Studien bislang noch nicht der genaue Einfluss des Rauchverhaltens, der Zigarettenmarke oder zum Beispiel des Vorhandenseins eines Zigarettenfilters auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat verdeutlicht werden.

Der Provokationstest mit Methacholin erfolgte in der dargestellten standardisierten Durchführung gemäß „New Jaeger APS Protocol“ unter Berücksichtigung der Richtlinien von ATS, ERS und DGAUM. Die vorherige Durchführung der Untersuchungsmethode unter Anwendung von physiologischer Kochsalzlösung anstatt von Methacholin als Agens diente der Studie quasi als „Leerwert“ um die Auswirkung einer Konzentrationsänderung von Nitrotyrosin im Atemkondensat

nach Provokation mit Methacholin auch der Anwendung von Methacholin zuordnen zu können. Grundlage hierfür ist die Annahme, dass die Inhalation von physiologischer Kochsalzlösung keinerlei Auswirkungen auf die Atemwege besitzt. In zahlreichen Studien wird deshalb 0,9%ige Kochsalzlösung als Agens für die Provokationstestung in der Placebo-Gruppe verwendet [*Huber et al. (2000)*]. Des Weiteren ist die Ermittlung des sogenannten „Leerwertes“ zu Beginn einer Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung üblich. Die in dieser Studie an 12 von 20 Probanden durchgeführte Provokationstestung mit 0,9%iger NaCl-Lösung kann somit auch zum Vergleich der Entwicklung der Nitrotyrosinkonzentration nach inhalativer Exposition mit Methacholin herangezogen werden. Während die Ergebnisse für den Provokationstest mit Kochsalzlösung demnach einen „Leerwert“ darstellen, dienen sie gleichermaßen bei der Auswertung der Ergebnisse für den Provokationstest mit Methacholin als Vergleichsmaßstab. Eine Abweichung sollte demnach auf die inhalative Provokation mit Methacholin zurückzuführen sein.

Die Analyse der Atemkondensatproben auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration wurde bei dieser Studie mit Hilfe der LC-MS/MS nach SPE-Anreicherung durchgeführt. Alternativ wird in der Literatur der Nachweis von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat oft unter Anwendung eines EIA (Enzym-Immun-Assay) oder eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) realisiert. Die Auflösung des ELISA soll zwar mitunter bis auf Proteinebene möglich sein; die Spezifität der Methode in Bezug auf sichere Unterscheidung zwischen 3-Nitrotyrosin oder nur dem Vorhandensein irgendeines nitrierten Proteins ist nach derzeitigem wissenschaftlichen Kenntnisstand eher fraglich. Bei der EIA liegt die Nachweisgrenze bei 3,9 ng/ml [*Horváth et al. (2005*)], während bei Anwendung der LC-MS/MS-Methode Nitrotyrosinkonzentrationen sogar im pikomolaren Bereich nachgewiesen werden können. Die sichere Nachweisgrenze der in dieser Studie angewandten LC/MS-MS lag bei 8,5 pg/ml [*Göen et al. (2005)*]. Folglich kann bei der Wahl der LC/MS-MS nach SPE Anreicherung als Nachweismethode von einem sehr hohen und auch validierten Auflösungsvermögen in Bezug auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat ausgegangen werden. Damit wurden selbst geringgradige Konzentrationen und Konzentrationsunterschiede der 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat nach Provokationstestung mess- und beurteilbar.

6.2 Diskussion der Ergebnisse nach Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung:

Es konnte gezeigt werden, dass der bronchiale Provokationstest mit physiologischer Kochsalzlösung keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat hat; weder im Gesamtkollektiv, noch bei Aufschlüsselung der Probanden in Untergruppen gemäß ihres Atopie- und/oder Rauchstatus. Allerdings zeigte sich, dass trotz mangelnder statistischer Signifikanz, die individuellen Ergebnisse der einzelnen Gruppen und der einzelnen Personen nicht in allen Fällen übereinstimmten.

Bei Betrachtung der Mittel- oder Medianwerte der Nitrotyrosinkonzentrationen aller Probanden zu den drei verschiedenen Zeitpunkten zeigt sich das Bild eines allgemeinen Abfalls der Konzentration nach Provokation, gefolgt von einem erneuten Ansteigen der Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2. Dieses Muster setzt sich bei der Aufgliederung in die einzelnen Untergruppen größtenteils fort. Allerdings gilt es zu beachten, dass bei Betrachtung eines Kollektivs von zum Teil nur drei Probanden die natürliche Streuung der Messwerte ein stärkeres Gewicht bekommt als bei einem vergleichsweise größeren Kollektiv. Dies erklärt letztlich die beobachtete zunehmende Harmonisierung der grafischen Auswertung der Ergebnisse bei Betrachtung des gesamten Probandenkollektivs mit 12 Probanden gegenüber der Betrachtung der einzelnen Untergruppen mit jeweils nur 3 Probanden.

Wendet man die in der Literatur veröffentlichten Erkenntnisse [*Hanazawa et al. (2000), Balint et al. (2001), Garey et al. (2004), Horváth et al. (2004)*] auf das in dieser Studie untersuchte Kollektiv an, so wäre zu erwarten gewesen, dass die höchsten Ausgangswerte der Nitrotyrosinkonzentration (T0) entweder in der Gruppe der Raucher und/oder der Gruppe der Atopiker zu finden seien. Dieser Befund konnte anhand der ermittelten Messwerte in unserem Probandenkollektiv nicht bestätigt werden. Vor allem die Medianwerte der Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat in den einzelnen Gruppen Raucher, Nichtraucher, Atopiker und Nichtatopiker zum Zeitpunkt T0 sind bis auf wenige pg/ml nahezu gleichwertig. Die Betrachtung der Mittelwerte der Nitrotyrosinkonzentration der Raucher, Nichtraucher, Atopiker und Nichtatopiker zum Zeitpunkt T0 zeigt allerdings ein abweichendes Bild gegenüber demjenigen der Medianwerte. Allerdings ist in diesem Fall die Betrachtung des Medianwertes aussagekräftiger, da er gegenüber Ausreißern wesentlich robuster und damit für ein kleines Kollektiv repräsentativer ist als der Mittelwert.

Im zeitlichen Verlauf wäre anzunehmen gewesen, dass eine inhalative Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung aufgrund des „inerten“ Charakters keine Auswirkungen auf die Atemwege und damit auf die Zusammensetzung des Atemkondensates hat. Wenn auch nicht statistisch signifikant, so zeigt die grafische Darstellung der Mittel- und der Medianwerte zunächst den Abfall der Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten T0 und T1, und der erneuten Zunahme der Nitrotyrosinkonzentration von Zeitpunkt T1 zu Zeitpunkt T2. Unmittelbar nach Provokationstestung reduziert sich demnach die Konzentration, um dann zum Abschluss der Untersuchung zum Zeitpunkt T2 wieder anzusteigen. Aufgrund fehlender Vergleichsstudien kann die Ursache für diesen Abfall nur rein hypothetisch erörtert werden. Prinzipiell erlaubt die Versuchsanordnung folgende Schlüsse auf die mögliche Ursache zu ziehen: so liegt zwischen Zeitpunkt T0 und T1 definitionsgemäß der Provokationstest mitsamt seiner Atemmanöver und der abschließenden Inhalation zweier Hübe Berotec® N 100 µg. Der Provokationstest wurde von jedem Probanden ausnahmslos von Anfang bis Ende gemäß Protokoll erfolgreich durchgeführt. D.h. die Ausgangsbedingungen für die Atemkondensatsammlung zum Zeitpunkt T1 sind für jeden Probanden ähnlich bzw. gleichwertig gewesen.

Einen Einfluss auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat nach inhalativer Exposition von Berotec® N 100 µg bzw. dessen Wirkstoff Fenoterolhydrobromid ist in bisherigen Studien noch nicht untersucht worden. Dennoch wäre ein Einfluss von Berotec® auf die Zusammensetzung des Atemkondensats und speziell auf die Nitrotyrosinkonzentration denkbar. Fenoterolhydrobromid gehört zur Gruppe der β_2-Sympathomimetika (β_2-Adrenozeptor-Agonisten) und wirkt auf die β_2-Rezeptoren des vegetativen Nervensystems. Durch Angriff an den β_2-Rezeptoren der Atemwegsmuskelzellen kommt es zu einer Entspannung der Muskelzellen und damit zur Bronchodilatation. Die bronchialerweiternde Wirkung setzt nach wenigen Minuten ein und beträgt 3 bis 5 Stunden. Angenommen die Inhalation von Fenoterolhydrobromid hätte einen Einfluss auf die gemessene 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat, so wäre bei einer anzunehmenden Halbwertszeit von 120 Minuten auch ein Einfluss auf die Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 zu erwarten gewesen. Letztlich lässt sich diese Frage aber nur in einer weiteren Studie anhand einer isolierten Versuchsanordnung beantworten.

Auch die bei einem Provokationstest ausgeübten Atemmanöver wurden noch nicht explizit in Zusammenhang mit deren Einfluss auf die Zusammensetzung des Atemkondensates untersucht. Als Bestandteil der Provokationstestung musste der

Proband eine Reihe forcierter Atemmanöver durchführen. Diese Atemmanöver könnten wiederum potentiell die Zusammensetzung des Atemkondensates beeinflussen, da eventuell durch maximale Exspiration in Folge tiefer Inspiration eine Art „Verbrauch“ der Biomarker in der Lunge stattfindet. In der Ruhephase zwischen Zeitpunkt T1 und T2 wurden derartige Atemmanöver nicht durchgeführt, so dass sich die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat wieder der Ausgangskonzentration annähert. Bisherige Studien [*Gessner et al. (2001*)] beschäftigen sich mit dem Einfluss der Atemmechanik auf das Volumen des gewonnenen Atemkondensates und schlagen eine Ruheatmung bei der Gewinnung vor. Die genauen Einflüsse der Atemmanöver eines Provokationstestes auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat wurden bisher allerdings noch nicht untersucht.
Ein weiterer Erklärungsansatz für den beobachteten Konzentrationsabfall könnte auch in der hohen Auflösung der angewendeten LC-MS/MS mit SPE-Anreicherung gesucht werden. Die Mittel- bzw. Medianwerte der Nitrotyrosinkonzentrationen aller Probanden unterschieden sich zwischen den einzelnen Zeitpunkten T0, T1 und T2 nur im niedrigen pikomolaren Bereich. Das beschriebene Phänomen könnte demnach auch in der natürlichen Streuung der Messwerte begründet sein.

Zusammenfassend lässt sich für die bronchiale Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung feststellen, dass sich statistisch betrachtet kein Einfluss auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat feststellen ließ. Jedoch gibt der Konzentrationsabfall von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat zum Zeitpunkt T1 und der anschließende Anstieg der Konzentration zum Zeitpunkt T2 Anlass zur Diskussion. Aufgrund fehlender Vergleichsstudien und Literatur lässt sich diese Frage allerdings derzeit nur hypothetisch erörtern. Zukünftig könnte diese Frage durch weitere wissenschaftliche Untersuchungen beantwortet werden. Für die Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse bei Provokationstestung mit Methacholin können diese Ergebnisse allerdings zum Vergleich dienen, da die physiologische Kochsalzlösung als Agens zur inhalativen Provokation nur gegen eine Methacholinlösung ausgetauscht wurde. Die Rahmenbedingungen und die Testdurchführung blieben allerdings bestehen. Eine Abweichung der Ergebnisse wäre so auf die Anwendung von Methacholin zurückzuführen.

6.3 Diskussion der Ergebnisse nach Provokationstestung mit Methacholin:

Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss eines Provokationstests mit Methacholin bezogen auf die Konzentration von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat statistisch nicht signifikant ist. Auch die statistische Auswertung der Ergebnisse nach Atopiestatus und Raucherstatus ergab keinen signifikanten Einfluss von Methacholin auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat.

Allerdings zeigte sich, dass trotz fehlender statistischer Signifikanz, die individuellen Ergebnisse der einzelnen Gruppen und der einzelnen Personen nicht in allen Fällen übereinstimmten.

Bei Betrachtung der grafischen Auswertung der Mittelwerte der gemessenen Nitrotyrosinkonzentrationen aller Probanden zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt sich ausgehend vom Zeitpunkt T0 ein relativ konstantes Konzentrationsniveau, welches zum Zeitpunkt T2 abfällt. Tendenziell ähnlich ist auch die grafische Auswertung der Medianwerte, allerdings fällt hier die Konzentration von 3-Nitrotyrosin bereits im Vergleich von Zeitpunkt T0 zu T1. Bedeutsam für die Interpretation dieser Daten ist vor allem die Spanne, in der sich die drei einzelnen Mittelwerte bzw. Medianwerte maximal voneinander unterscheiden: Liegt der größte Konzentrationsunterschied zwischen den drei Medianwerten bei 12,7 pg/ml, so unterscheiden sich die Mittelwerte der Nitrotyrosinkonzentrationen zu den drei einzelnen Zeitpunkten nur um maximal 4,78 pg/ml. Mit Bezug auf das Auflösungsvermögen der angewandten LC-MS/MS handelt es sich hierbei nur um eine sehr geringe Differenz zwischen den einzelnen Werten.

Auch wenn das Kollektiv bei der Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung nur einen Teil des Kollektivs der Provokationstestung mit Methacholin darstellt, so können dennoch die dabei erhaltenen Ergebnisse zum Vergleich herangezogen werden. Im direkten Vergleich ist deutlich erkennbar, dass die ermittelten Mittel- und Medianwerte der Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat aller Probanden zum Zeitpunkt T0 nahezu identisch mit denjenigen Werten sind, die wir bei der Provokationstestung mit Kochsalzlösung zum Zeitpunkt T0 ermittelt haben. (*Differenz zwischen den Mittelwerten zum Zeitpunkt T0: ±3 pg/ml, Differenz zwischen den Medianwerten zum Zeitpunkt T0: ±5,5 pg/ml*). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt man, wenn man die Mittel- und Medianwerte der Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T2 mit denen der Provokationstestung mit 0,9%iger NaCl-Lösung vergleicht. Während Ausgangs- und Endwerte der Nitrotyrosinkonzentration scheinbar im Mittel bzw. Median bei Provokationstestung mit Kochsalzlösung und bei Provokationstestung mit Methacholin ungefähr gleichwertig sind, weichen die Werte im direkten Vergleich der Provokationstestung

mit Methacholin und der mit 0,9%iger NaCl-Lösung für den Zeitpunkt T1 erkennbar voneinander ab. Der oben diskutierte Konzentrationsabfall von Nitrotyrosin im Atemkondensat zum Zeitpunkt T1 nach Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung findet sich nicht bei der Provokation mit Methacholin. Aufgrund der beobachteten Gleichwertigkeit der Mittel- und Medianwerte zu den Zeitpunkten T0 und T2 bei Provokation mit Methacholin und Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung lässt sich auf eine positive - wenn auch nicht statistisch signifikante - Korrelation einer inhalativen Exposition mit Methacholin auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat schließen. Schlüsselt man die Ergebnisse gemäß Atopiestatus oder Rauchstatus weiter in Untergruppen auf, so stößt man im Vergleich der Gruppen zueinander allerdings auf ein inkonstantes Verhalten der Nitrotyrosinkonzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten. Während zum Beispiel bei den Rauchern und Nichtatopikern die Nitrotyrosinkonzentration zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zu T0 sinkt, steigt sie umgekehrt bei den Atopikern und Nichtrauchern. Die vermutete positive Korrelation von Methacholin auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat setzt sich demnach nicht gleichartig in den einzelnen Untergruppen fort. Bedeutend für die Diskussion der für die Provokation mit Methacholin erhaltenen Messwerte könnte demnach der Aspekt sein, dass anders als bei der inhalativen Provokation mit physiologischer Kochsalzlösung die Ergebnisgrundlage bei der Provokationstestung mit Methacholin auf einer individuell unterschiedlichen kumulativen Dosis Methacholin beruht. Der hierbei für die Auswertung konstruierte und ausgewertete Quotient aus Differenz der Nitrotyrosinkonzentration zwischen den Zeitpunkten T0, T1 und T2 und der individuell inhalierten Dosis Methacholin erzeugt eine weitere Homogenisierung der Ergebnisse. Vor allem bei Betrachtung des Kollektivs in den jeweiligen Untergruppen erfolgte neben einer Angleichung der Daten auch eine Verringerung der Interquartilsabstände bzw. der Standardabweichung. Lediglich in der Gruppe der atopischen Nichtraucher ist der genannte Trend der Homogenisierung nicht so deutlich ausgeprägt. Die grafische Darstellung in der Gruppe Atopiker/Nichtraucher zeigt im Vergleich zu den Vergleichsgruppen vor allem Unterschiede in der Ausprägung der Interquartilsabstände. Dieser Aspekt findet sich bei einzelner Betrachtung von nur einem der beiden Merkmale „Atopiker“ oder „Nichtraucher“ wiederum im Kollektiv der Atopiker wieder: relativ homogene Medianwerte treffen im Vergleich zu den anderen Kollektivgruppen auf vergleichsweise große Interquartilsabstände. Ein großer Quartilsabstand korreliert mit einem hohen Streuungsmaß der einzelnen ermittelten Werte. Die Erwartung ein den nichtrauchenden Atopikern ähnliches Ergebnis auch in der Gruppe der

rauchenden Atopiker zu finden, bestätigt sich allerdings nicht. Folglich muss die Ursache für das erhöhte Streuungsmaß in der Kombination Nichtraucher und Atopiker gesucht werden. Zur Erklärung dieser Abweichung lässt sich auf die Tatsache verweisen, dass alle Probanden in der Gruppe der nichtrauchenden Atopiker positiv auf die inhalative Provokation mit Methacholin reagiert haben. D.h. bei allen nichtrauchenden Atopikern dieser Studie musste die Provokationstestung aufgrund des Abfalls der FEV1 um mehr als 20% frühzeitig abgebrochen werden. Außerdem lässt sich nach Durchsicht der Anamnesebögen feststellen, dass 80% der nichtrauchenden Atopiker an einer nicht saisonalen Form der Atopie litten. Die Provokationstestungen wurden alle außerhalb der Heuschnupfenzeit durchgeführt. Im Vergleich dazu litten bei den rauchenden Atopikern nur 20% an einer nicht saisonalen Atopie, aber 80% an einem saisonal betonten Heuschnupfen. Somit war die Wahrscheinlichkeit in der Gruppe der nichtrauchenden Atopiker während der Versuchsdurchführung mit klinisch relevanten Allergenen in Kontakt zu kommen um ein vielfaches höher als in der Vergleichsgruppe der rauchenden Atopiker. Folglich kann vermutet werden, dass die inhalative Provokation mit Methacholin in der Phase eines Kontaktes mit relevanten Allergenen Auswirkungen auf 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat hat.
In der Literatur gibt es derzeit aber keine Vergleichsstudien zu dieser Thematik.

Zusammenfassend lässt sich für die inhalative Provokationstestung mit Methacholin feststellen, dass sich statistisch betrachtet kein Einfluss auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat feststellen ließ.
Trotz fehlender statistischer Signifikanz kann unter Aufschlüsselung der Ergebnisse in die einzelnen Untergruppen und der Relativierung der Ergebnisse auf die individuell kumulierte Dosis Methacholin für das Kollektiv der nichtrauchenden Atopiker eine Abweichung vermutet werden. Vergleicht man die erhaltenen Werte der Provokationstestung mit physiologischer Kochsalzlösung mit denen der Provokationstestung mit Methacholin, so erhält man zu den Zeitpunkten T0 und T2 etwa gleichwertige Ergebnisse für das gesamte Probandenkollektiv. Zum Zeitpunkt T1, sprich unmittelbar nach Provokationstestung, findet sich allerdings ein leicht abweichendes Verhalten der Ergebnisse. So bleibt die Nitrotyrosinkonzentration nach inhalativer Exposition mit Methacholin anders als nach der Provokation mit Kochsalzlösung annähernd gleich. Innerhalb der Untergruppen kommt es zu unterschiedlichen Ergebnissen mit entweder Konzentrationsanstieg oder Konzentrationsabfall zum Zeitpunkt T1. Eine Aufschlüsselung der Ergebnisse auf die individuell unterschiedlich kumulierte Dosis Methacholin zeigt, dass außer der

Gruppe der nichtrauchenden Atopiker die übrigen Kollektivgruppen nahezu gleichwertig in punkto Medianwert und Interquartilsabstand sind. Die Gruppe der nichtrauchenden Atopiker zeigt hierbei ein erhöhtes Maß an Streuung der Messwerte. Ursächlich könnte die 100%ig positive Reaktion des Probandenkollektivs der nichtrauchenden Atopiker auf die Provokationstestung sein, sowie deren hohe Prävalenz an nichtsaisonalen Formen der Atopie sein.

6.4 Schlussfolgerung:

Als Ergebnis dieser Studie lässt sich feststellen, dass die inhalative Provokation mit Methacholin keinen Einfluss auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat zu haben scheint, bzw. dass unter den derzeit gegebenen Methoden eine Verifizierung dieser Hypothese nicht möglich war.
Die Anwendung eines strikten und stets reproduzierbaren Regimes aus Anamnese, Testmessung nach „New Jaeger APS Protocol“, nicht-invasiver Gewinnung von Atemkondensat und der standardisierten Auswertung der Proben im Labor halfen etwaige Fehlerquellen auszuschließen und untereinander vergleichbare Messergebnisse zu erhalten. Durch die hohe Auflösung des angewandten Verfahrens für den Nachweis von Nitrotyrosin befand sich die Nachweisgrenze im Pikogramm-Bereich (10^{-12} *g*). Die anschließend breite Auswertung der ermittelten Messwerte in Diagrammen und Statistik führte letztlich zu dem hier ausführlich dargestellten Studienergebnis.

Diese Studie besitzt selber einen explorativen Ansatz. In der Literatur finden sich bislang keine Studien über mögliche Auswirkungen einer Methacholingabe bei Provokationstestung auf die 3-Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat. Insbesondere durch die internationale Bedeutung von Methacholin als Reagens für die inhalative Provokation und möglicherweise damit verbundenen adversen Effekten sind weiterführende Studien indiziert. Somit schafft diese Studie einen Ansatz für weitere Studien mit dieser oder ähnlicher Thematik, wobei aber zukünftige Studien unter folgenden Gesichtspunkten vertieft werden sollten:
Die Festlegung der Probandenanzahl auf 20 bzw. 12 Personen und die weitere Unterteilung in vier gleichstarke Untergruppen (*Raucher/Atopiker; Raucher/Nichtatopiker; Nichtraucher/Atopiker und Nichtraucher/Nichtatopiker*) birgt für die statistische Auswertung das Risiko einer reduzierten Teststärke und damit einer verringerten Aussagekraft des Ergebnisses. So stellt gemäß den Grundsätzen der Statistik eine geringe Spanne der Standardabweichung eine

geringe Streuung der einzelnen Stichproben bzw. der einzelnen Messwerte dar. Umgekehrt entscheidet aber auch die Gesamtanzahl an Messwerten über die Streuung der einzelnen Messwerte. Legt man dieser Erkenntnis zugrunde, dass von den 20 Probanden des Gesamtkollektivs nur 25% die beiden Kriterien „Raucher“ und „Nichtatopiker“ erfüllen, so ergibt sich eine Gesamtzahl von lediglich fünf Messwerten zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Ein vergrößertes Probandenkollektiv vermag möglicherweise, durch einen wachsenden Stichprobenumfang ein andersartiges Ergebnis zu liefern oder aber auch das hier ermittelte Ergebnis zusätzlich zu untermauern.

Außerdem erfolgte die Zugehörigkeit der Probanden zu den einzelnen Gruppen Raucher/Nichtraucher bzw. Atopiker/Nichtatopiker dichotom. D.h. hierbei wurde nicht gesondert unterschieden welche Art von Atopie (*z.B. allergische Rhinitis, allergische Dermatitis*) vorlag, noch wurde die Quantität oder Qualität des Rauchverhaltens in den Ergebnissen berücksichtigt.

Der Marker 3-Nitrotyrosin für oxidativen Stress ist als solcher in der Literatur anerkannt. Dennoch sollten zukünftige Studien die Eignung eines Nachweises von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat als Marker von oxidativem Stress in den unteren Atemwegen weitergehend untersuchen. Ein Schlüssel wäre die bislang nicht eindeutige Erklärung des Entstehungsortes des Atemkondensates in den unteren Atemwegen. Weitergehend erlaubt die studienbedingte Festlegung der drei Messzeitpunkte für zukünftige Studien weitere Modifikationen.

Ausstehende Fragen bezüglich der Einflussnahme von Fenoterolhydrobromid oder der Atemmanöver während einer Provokationstestung auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat könnten durch weitere Studien beantwortet werden.

Damit lässt sich abschließen, dass unter Vorbehalt etwaiger Confounder, wie etwa Rauchgewohnheiten, Definition von Atopie, usw. die im Rahmen dieser Studie erfasst wurden und angesichts der Größe des Kollektivs (*n=20*) und der Nähe der Messwerte zur Nachweisgrenze kein Einfluss einer inhalativen Provokation mit Methacholin auf die Konzentration von 3-Nitrotyrosin im Atemkondensat nachgewiesen werden konnte.

7 Zusammenfassung

Die unspezifische bronchiale Provokation mit Methacholin ist eine Methode, mit welcher die individuelle Reagibilität des Atemwegssystems eines Patienten überprüft werden kann und die in der arbeitsmedizinischen Frühdiagnostik von Atemwegserkrankungen einen hohen Stellenwert hat. In der internationalen Literatur gibt es derzeit jedoch keinen Hinweis auf Untersuchungen, ob diese inhalierten Lösungsaerosole beim Menschen adverse Atemwegseffekte, wie das Auslösen von oxidativen Stressreaktionen in der Lunge bzw. in den unteren Atemwegen, induzieren.
Die nicht-invasive Gewinnung und Untersuchung des Atemkondensats aus den unteren Atemwegen ermöglicht die Erkennung von subklinischen adversen Atemwegseffekten anhand von Biomarkern und damit eine frühzeitige Intervention mit präventiver Zielsetzung. 3-Nitrotyrosin gilt als sensitiver Marker für oxidativen Stress. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer inhalativen Atemwegsprovokation mit Methacholin auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat zu prüfen. Hierbei wurden potentielle Einflussfaktoren wie der Atopiestatus und die Rauchgewohnheiten berücksichtigt.

Das Kollektiv umfasste 20 Personen (*10 Atopiker und 10 Nichtatopiker, à 5 Raucher und 5 Nieraucher*) im Alter von 20 bis 40 Jahren. Es erfolgten eine individuelle Anamneseerhebung sowie spirometrische bzw. bodyplethysmo-graphische Untersuchungen. Bei jedem Probanden wurde ein inhalativer Provokationstest mit Methacholin (*gemäß „New Jaeger APS Protocol“*) und zeitlich unabhängig davon an einem Subkollektiv (*n=12*) mit 0,9%iger NaCl-Lösung durchgeführt. Die Probensammlung erfolgte jeweils 15 min vor sowie 15 min und 90 min nach der Testung. Die Nitrotyrosinkonzentration wurden per LC-MS/MS-Analyseverfahren ermittelt.

Die mittleren Nitrotyrosinkonzentrationen (*in pg/ml*) vor bzw. nach Testung betrugen für NaCl 51,45 [SD: ± 41,7], 30,14 [SD: ± 28,67], 41,31 [SD: ± 37,36]; und für Methacholin 57,69 [SD: ± 47,25], 58,30 [SD: ± 36,80], 53,52 [SD: ± 34,55].
Die medianen Nitrotyrosinkonzentrationen (*in pg/ml*) vor bzw. nach Testung betrugen für NaCl 41,7 [IQR: 27,1], 19,25 [IQR: 33,98], 33,65 [IQR: 28,32];
und für Methacholin 47,25 [IQR: 68,05], 36,80 [IQR: 36,58], 34,55 [IQR: 66,82]. Signifikante systematische Änderungen wurden auf Gruppenbasis unter Berücksichtigung von Atopiestatus und Rauchgewohnheiten weder nach Kochsalzinhalation noch nach Methacholinprovokation nachgewiesen.
Ein unspezifischer Provokationstest mit Methacholin zeigt keine signifikante Auswirkung auf die Nitrotyrosinkonzentration im Atemkondensat.

8 Literatur

[01] **Babior BM, Knipnes RS, Curnutte JT:**
Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.
In: *J Clin Invest (1973), Nr.52, S.741-744*

[02] **Babior BM:**
NADPH oxidase: an update.
In: *Blood (1999), Nr. 93, S.1464-1476*

[03] **Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ:**
Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke.
In: *Thorax (2001), Nr.56, S.456-461*

[04] **Baur X, Bergmann K-CH, Ganshorn P, Köbusch R, Kröll G, Müller G, Paap:**
Leitlinie für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit Allergenen.
In: *Pneumologie (2002), Nr.56, S.187-198*

[05] **Becher G, Beck E, Rothe M, Neubauer G, Stresemann E:**
Vorrichtung zur Sammlung von nichtgasförmigen Bestandteilen der Ausatemluft durch Ausfrieren (Atemkondensat).
In: *Mt Medizintechnik (1997), Nr.117, S. 89-95*

[06] **Becher G, Winsel K, Beck E, Neubaur G, Stresemann E:**
Das Atemkondensat als Methode zur nichtinvasiven Erfassung von Entzündungsmediatoren aus den unteren Atemwegen.
In: *Pneumologie 51 (1997), Nr.2, S.456-459*

[07] **Beckmann JS:**
The physiological and pathophysiological chemistry of nitric oxide.
In: *Lancaster J (Hrsg.): Nitric Oxide: Principles and Actions.*
San Diego, Kalifornien: Academic Press, 1996, S.1-82

[08] **Brand P:**
Quelle der biochemischen Information im Exhalat.
In: *Sonderausgabe Firma Jaeger (2001), Nr.1, S.12*

[09] **Chance B, Sies H, Boveris A:**
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
In: *Physiol Rev 59 (1979), Nr.3, S.527-605*

[10] **Cole JWL, Grizzle JE:**
Applications of Multivariate Analysis of Variance to Repeated Measurements Experiments.
In: *Biometrics 22 (1966), Nr.4, S.810-828*

[11] **Crapo R, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, MacIntyre NR, McKay RT, Wanger JS, Anderson SD, Cockcroft DW, Fish JE, Sterk PJ, and the American Thoracic Society:**
Guidelines for methacholine and exercise challenge testing – 1999.
In: *Am J Respir Crit Care Med 161 (2000), Nr.1, S.309-329*

[12] **Crapo RO, Chairman MD, Hankinson J, Charles I, MacIntyre NR, Voter K, Wise R, Graham B, O'Donnell C, Paoletti P, Rota J, Viegi G and the American Thoracic Society:**
Standardization of Spirometrie (1994 update),
In: *Am J Respir Crit Care Med 152 (1995), Nr.3, S.1107-1136*

[13] **Daly AK:**
Molecular drug metabolism.
In: *J Mol Med (1995), Nr.73, S.539-553*

[14] **Dweik RA, Comhair SAA, Gaston B:**
Nitric oxide chemical events in the human airway during the immediate and late antigen induced asthmatic response.
In: *Proc Natl Acad Sci 98 (2001), S.2622-2627*

[15] **Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwel B, van der Vliet A:**
Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils.
In: *Nature 391 (1998), Nr.6665, S.393-397*

[16] **Fish JE:**
Bronchial challenge testing.
In: *Middleton E (Hrsg.): Allergy: Principles and Practice.*
4. Auflage St. Louis: Mosby-Year Book,1993

[17] **Fridovich I:**
Superoxide radical and superoxide dismutases.
In: *Ann Rev Biochem (1995), Nr.64, S.97-112*

[18] **Garey K, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I:**
Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healty smokers.
In: *Chest (2004), Nr.125, S.22-26*

[19] **Gessner C, Conrad K (Hrsg.), Sack U (Hrsg.):**
Das Atemkondensat - nicht-invasiv gewonnene biochemische Information aus der Lunge.
Lengerich: Pabst Science Publishers, 2006

[20] **Gessner C, Kuhn H, Seyfarth HJ, Pankau H, Winkler J, Schauer J, Wirtz H:**
Factors influencing breath condensate volume.
In: *Pneumologie (2001), Nr.55, S.414–419*

[21] **Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H:**
Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients.
In: *Lung Cancer 43 (2004), Nr.2, S.215-222*

[22] **Gessner C:**
Detection of mutations of the K-ras gene in condensed breath of patients with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) as a possible non-invasive screening method.
In: *Pneumologie 52 (1998), Nr.7, S.426-427*

[23] **Göen T, Müller-Lux A, Dewes P, Musiol A, Kraus T:**
Sensitive and accurate analyses of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate by LC-MS/MS.
In: *J Chromatogr B 825 (2005), Nr.1-2, S.261-266*

[24] **Gonsior E, Henzgen M, Jörres RA, Kroidl RF, Merget R, Riffelmann FW, Wallenstein G, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie and Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie:**
Leitlinie für die Durchführung bronchialer Provokationstests mit Allergenen.
In: *Pneumologie 56 (2002), S.187-198*

[25] **Gonsior H (Hrsg.):**
Richtlinien für die Durchführung von bronchialen Provokationen mit Allergenen und pharmakodynamischen Substanzen bei obstruktiven Atemwegserkrankungen.
In: *Allergologie 7 (1984), S.238-242*

[26] **Guo FH, Comhair SAA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC:**
Molecular Mechanisms of Increased Nitric Oxide (NO) in Asthma: Evidence for Transcriptional and Post-Translational Regulation of NO Synthesis.
In: *J Immunol (2000), Nr. 164, S.5970-5980*

[27] **Halliwel B, Gutteridge JM:**
Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts.
In: *Arch Biochem Biophys 246 (1986), Nr.2, S.501-514*

[28] **Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Balint B, Kharitonov SA, Barnes PJ:**
Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide concentrations in asthmatic smokers.
In: *Respiration (2004), Nr.71, S.463-468*

[29] **Horváth I, Hunt J, Barnes PJ and the ATS/ERS Task Force "Exhaled Breath Condensate":**
Exhaled breath condensate: methodical recommodations and unresolved questions.
In: *Eur Respir J 26 (2005), Nr.1, S.523–548*

[30] **Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharionov SA, Cole P, Barnes PJ:**
Increased Levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress.
In: *Thorax 53 (1998), Nr.10, S.867-870*

[31] **Huber H, Lauschner R, Papenfuß F, Allmers H, Baur X:**
Randomisierte Doppelblindstudie (Third place blinded) zur Untersuchung der Wirksamkeit und Nebenwirkung von Methacholin im unspezifischen bronchialen Provokationstest.
In: *Pneumologie 54 (2000), S.99-103*

[32] **Huie RE, Padmaja S:**
The reaction of NO with superoxide.
In: *Free Radic Res Commun 18 (1993), Nr.4, S.195-199*

[33] **Inoue S, Kawanishi S:**
Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide.
In: *FEBS Lett 371 (1995), Nr.1, S.86-88*

[34] **Ischiropoulos H, al Mehdi AB:**
Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications.
In: *FEBS Lett 364 (1995), Nr.3, S.279-282*

[35] **Ischiropoulos H:**
Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species.
In: *Arch Biochem Biophys 356 (1998), S.1-11*

[36] **Kharitonov SA, Barnes PJ:**
Exhaled Markers of Pulmonary Disease.
In: *Am J Respir Crit Care Med 163 (2001), Nr.7, S.1693-1722*

[37] **Kharitonov SA, O'Connor BJ, Evans DJ, Barnes PJ:**
Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide.
In: *Am J Respir Care Med (1995), Nr.151, S.1894-1899*

[38] **Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ:**
Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients.
In: *Lancet (1994), Nr. 343, S.133-135*

[39] **Kietzmann D, Kahl R, Muller M, Burchadi H, Kettler D:**
Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS.
In: *Intensive Care Med 19 (1993), Nr.2, S.78-81*

[40] **Klein G, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie - Wissenschaftliche Arbeitsgruppe "Bronchiale Provokationstests":**
Empfehlungen zur Durchführung bronchialer Provokationstests mit pharmakologischen Substanzen.
In: *Med Klinik 92 (1997), S.458-463*

[41] **Klug D, Rabani J, Fridovich I:**
A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis.
In: *J Biol Chem 247 (1972), Nr.15, S.4839-4842*

[42] **Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS:**
Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide.
In: *Chem Res Toxicol 5 (1993), Nr.6, S.834-842*

[43] **Koppenol WH:**
The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite.
In: *Free Radic Biol Med 25 (1998), Nr.4-5, S.385-391*

[44] **Lancaster JR, Jr.:**
Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide.
In: *Proc Natl Acad Sci USA (1994), Nr.91, S.8137-8141*

[45] **Loos U, Labedzki L, Weiss JM:**
Schädigung des pulmonalen Surfactant-Systems nach bronchoalveolärer Lavage.
In: *Prax Klin Pneumol (1987), Nr.41, S.868-869*

[46] **Malinski T, Taha Z:**
Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor.
In: *Nature (1992), Nr.358, S.676-678*

[47] **Martin RJ, Wanger JS, Irvin CG, Bartelson BB, Cherniack RM, and the Asthma Clinical Research Network (ACRN):**
Methacholine challenge testing: safety of low starting FEV1
In: *Chest 112 (1997), Nr.1, S.53-56*

[48] **Massaro A, Metha S, Lilly C, Kobzik L, Reilly J, Drazen J:**
Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects.
In: *Am J Respir Crit Care Med (1996), Nr.153, S.1510-1514*

[49] **McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, Greening AP, Innes JA:**
Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite and protein concentration
In: *Thorax 59 (2004), Nr.8, S.694-698*

[50] **McCord JM, Fridovich I:**
Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).
In: *J Biol Chem 244 (1969), Nr.22, S.6049-6055*

[51] **Mehta S, Lilly C, Rollenagen J, Haley K, Asano K, Drazen J:**
Acute and chronic effects of allergic airway inflammation on pulmonary nitric oxide production.
In: *Am J Physiol (1997), Nr.272, S.124-131*

[52] **Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J, and and the ATS/ERS Task Force "Standardisation of lung function testing'':**
General considerations for lung function testing.
In: *Eur Respir J 26 (2005), Nr.1, S.153–161*

[53] **Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J, and and the ATS/ERS Task Force "Standardisation of lung function testing'':**
Standardization of Spirometry.
In: *Eur Respir J 26 (2005), Nr.1, S.319–338*

[54] **Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J, and the ATS/ERS Task Force "Standardisation of lung function testing'':**
Standardisation of the measurement of lung volumes.
In: *Eur Respir J 26 (2005), Nr.1, S.511–522*

[55] **Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J, and the ATS/ERS Task Force "Standardisation of lung function testing'':**
Interpretative strategies for lung function tests.
In: *Eur Respir J 26 (2005), Nr.1, S.948–968*

[56] **Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW:**
Peroxynitrite: a biologically significant oxidant.
In: *Gen Pharmacol 31 (1998), Nr.2, S.179-186*

[57] **Nakano M, Kimura H, Hara M, Kuroiwa M, Kato M, Totsune K, Yoshikawa T:**
A highly sensitive method for determining both Mn- and Cu-Zn superoxide dismutase activities in tissues and blood cells.
In: *Anal Biochem 187 (1990), Nr.2, S. 277-280*

[58] **National Asthma Education and Prevention Program:**
Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma - Summary Report 2007
URL: *http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthsumm.pdf*
Stand: *28.08.2007, S.45*

[59] **Nowack D, Szadkowski D, Baur X, Triebig G, Schneider J and the Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin:**
Leitlinie: Lungenfunktionsprüfungen in der Arbeitsmedizin
URL: *http://www-dgaum.med.uni-rostock.de/leitlinien/lungfunk.htm*
Stand: *13.07.2005*

[60] **Oesch F:**
Fremdstoffmetabolismus
In: *Marquart H, Schäfer SG (Hrsg.): Lehrbuch der Toxikologie Mannheim: BI Wissenschaftsverlag, 1994, S.68-93*

[61] **Papineni RS, Rosenthal FS:**
The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects.
In: *J Aerosol Med 10 (1997), Nr.2, S.105-116*

[62] **Perpina M, Pelhcer C, de Diego A, Compte L, Macian V:**
Diagnostic value of the bronchial provocation test with methacholine in asthma: Bayesian analysis approach.
In: *Chest 104 (1993), Nr.1, S.149-154*

[63] **Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LS:**
Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers.
In: *Lancet (1994), Nr. 343, S.146-147*

[64] **Petro W, Konietzko N (Hrsg.):**
Atlas der pulmonalen Funktionsdiagnostik
Heidelberg: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, 1989

[65] **Pryor WA, Squadrito GL:**
The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide.
In: *Am J Physiol 268 (1995), Nr.5, S.699-722*

[66] **Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC:**
Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardisation of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society.
In: *Eur Respir J 6 (1993), Nr. 16, S.5-40*

[67] **Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA:**
Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide.
In: *Arch Biochem Biophys 288 (1991), Nr.2, S.481-487*

[68] **Rassaf T, Lauer T, Heiss C, Balzer J, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Drexhage C, Meyer C, Kelm M:**
Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity.
In: *Br J Sports Med 41 (2007), Nr.10, S.669-673*

[69] **Reinhold P, Becher G, Rothe M:**
Evaluation of the measurement of leukotriene
B4 concentrations in exhaled condensate as a noninvasive
method for assessing mediators of inflammation in the lungs of calves.
In: *Am J Vet Res 61 (2000), Nr.7, S.742–749*

[70] **Riffelmann FW, Droste G, Lauter H, Kohler D:**
Einfluss von Montelukast auf die inhalative bronchiale Allergenprovokation.
In: *Pneumologie 56 (2002), S.493-497*

[71] **Riffelmann FW, Droste G, Lauter H, Kohler D:**
Untersuchung zum Karenzintervall von Montelukast vor inhalativer bronchialer Allergenprovokation.
In: *Pneumologie 57 (2003), S.429-432*

[72] **Rothe M:**
Atemkondensatmessungen: Entstehung, Gewinnung, Lagerung und Analytik.
In: *Sonderausgabe Firma Jaeger 1 (2001), Nr.1, S.13-16*

[73] **Sampson JB, Ye Y, Rosen H, Beckman JS:**
Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosin nitration in protein from nitrite and hydrogen peroxide.
In: *Arch Biochem Biophys 356 (1998), Nr.2, S.207-213*

[74] **Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K:**
Anatomie.
8. Auflage Berlin: Springer Verlag, 2002

[75] **Schmidt RF, Lang F, Thews G (Hrsg.):**
Physiologie des Menschen.
29. Auflage Heidelberg: Springer Medizin, 2005

[76] **Schmidt W:**
Angewandte Lungenfunktionsprüfung.
6. Auflage München: Dustri-Verlag, 1982

[77] **Schumacher GH:**
Repetitorium Anatomie für Zahnmediziner.
München: Urban & Schwarzenberg, 1996

[78] **Schwedhelm E:**
Isoprostane und 3-Nitrotyrosin als neue Indexparameter des oxidativen Stresses in vivo: Analytik, Bildung, Metabolismus und biologische Bedeutung. (Dissertation)
URL: *http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e002/323295835.pdf*
Stand: 11.01.2001

[79] **Scott GC, and Braun SR:**
A survey of the current use and methods of analysis of bronchoprovocational challenges.
In: *Chest 100 (1991), Nr.2, S.322-328*

[80] **Sies H:**
Biochemie des oxidativen Stresses.
In: *Angew Chemie 98 (1986), Nr.12, S.1061-1075*

[81] **Silkoff P, Sylvester J, Zamel N, Permutt S:**
Airway nitric oxide diffusion in asthma: Role in pulmonary function and bronchial responsiveness.
In: *Am J Respir Crit Care Med (2000), Nr.161, S.1218-1228*

[82] **Statistische Bundesamt (Zweigstelle Bonn):**
Mikrozensus – Fragen zur Gesundheit, Kranke und Unfallverletzte.
URL: *http://www.destatis.de/* als Datei im Publikationsservice
Stand: *02.09.2008*

[83] **Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byme PM, Anderson SD, Juniper EF, Malo JL:**
Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Official Statement of the European Respiratory Society.
In: *Society Eur Respir J Suppl 16 (1993), S.53-83*

[84] **Tashkin DP, Altose MD, Bleecker ER, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise R, and the Lung Health Research Group:**
The Lung Health Study: airway responsiveness to inhaled methacholine in smokers with mild to moderate airflow limitation.
In: *Am Rev Respir Dis 145 (1992), Nr.2, S.301-310*

[85] **Ulmer WT (Hrsg.):**
Lungenfunktions-Manual.
2. Auflage Stuttgart: Thieme Verlag, 1998

[86] **Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE:**
Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite.
In: *J Biol Chem 272 (1997), Nr.12, S.7616-7625*

[87] **Watson BL, Cormier RA, Harbeck RJ:**
Effect of pH on the stability of methacholine chloride in solution.
In: *Respir Med 92 (1998), Nr.3, S.588-592*

[88] **Wu W, Chen Y, Hazen SL:**
Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues.
In: *J Biol Chem 274 (1999), Nr.36, S.25933-25944*

9 Anhang

9.1 Beispiel des Datenerfassungsbogen: „Provokation mit 0,9% NaCl“

(Promotionsarbeit: cmd D. Gerritz)

Studie: Provokationstest mit NaCl

Nachname: [redacted] **Vorname:** [redacted] **Geburtsort:** [redacted] **Geburtsdatum:** [redacted] **Geschlecht** (weiblich)

Größe (cm): 169 **Gewicht (kg):** 62 **Raucher:** [nein] **Atopiker** [nein] **Datum:** 21.07.2004

1. Probe: Uhrzeit: 14.10 **Atemdauer:** 15:02 **Geatmetes Volumen (l):** 128.8 **Volumen: Atemkondensat (ml):** 2,2

2. Probe: Uhrzeit: 15.30 **Atemdauer:** 15:00 **Geatmetes Volumen (l):** 128.5 **Volumen: Atemkondensat (ml):** 1,8

3. Probe: Uhrzeit: 17.00 **Atemdauer:** 15:00 **Geatmetes Volumen (l):** 125.1 **Volumen: Atemkondensat (ml):**2,1

Auskulationsbefund (vorher):

[X] kein pathologische Befund
[ ] Gimmen und Brummen
[ ] verlängerte Exspirio
[ ] verschärftes Atemgeräusch

Teststatus:

[X] kompletter Testdurchlauf

Auskultationsbefund (nachher):

[X] kein pathologische Befund
[ ] Gimmen und Brummen
[ ] verlängerte Exspirio
[ ] verschärftes Atemgeräusch

Sonstiges:

Abbildung 9.1: Beispiel des Datenerfassungsbogens „Provokation mit NaCl“

9.2 Beispiel des Datenerfassungsbogen: „Provokation mit Methacholin“

Studie: Provokationstest mit Methacholin (Promotionsarbeit: cmd D. Gerritz)

Nachname: [redacted] **Vorname:** [redacted] **Geburtsort:** [redacted] **Geburtsdatum:** [redacted] **Geschlecht (weiblich)**

Größe (cm): 167 **Gewicht (kg):** 62 **Raucher: [nein]** **Atopiker [ja]** **Datum:** 03.02.2004

1. Probe:	**Uhrzeit:** 14.39	**Atemdauer:** 15:11	**Geatmetes Volumen (l):** 101,2	**Volumen: Atemkondensat (ml):** 1,8
2. Probe:	**Uhrzeit:** 16.06	**Atemdauer:** 15:02	**Geatmetes Volumen (l):** 100,4	**Volumen: Atemkondensat (ml):** 1,8
3. Probe:	**Uhrzeit:** 17.18	**Atemdauer:** 15:06	**Geatmetes Volumen (l):** 101,3	**Volumen: Atemkondensat (ml):** 1,8

Auskulationsbefund (vorher):

[X] kein pathologische Befund
[ ] Gimmen und Brummen
[ ] verlängerte Exspirio
[ ] verschärftes Atemgeräusch

Teststatus: (0,072 mg NaCl) (0,026 mg MTC) (0,045 mg MTC) (0,090 mg MTC) (0,180 mg MTC) (**0,360 mg MTC**) (0,720 mg MTC)

Auskultationsbefund (nachher):

[X] kein pathologische Befund
[ ] Gimmen und Brummen
[ ] verlängerte Exspirio
[ ] verschärftes Atemgeräusch

Sonstiges: -

Abbildung 9.2: Beispiel des Datenerfassungsbogens „Provokation mit Methacholin“

9.3 Beispiel des Auswertungsbogens: „Bodyplethysmographie“

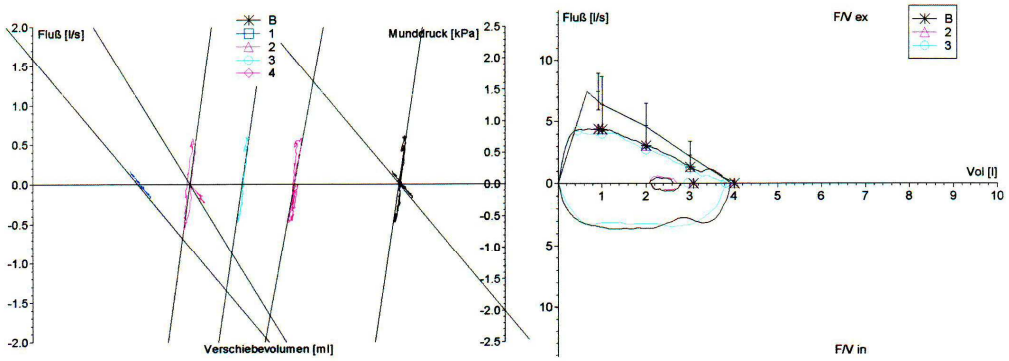
Universitätsklinikum Aachen

UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN
INSTITUT FÜR ARBEITSMEDIZIN
AMBULANZ FÜR ARBEITSMEDIZIN
DIREKTOR: UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. MED. THOMAS KRAUS

Bodyplethysmographie und Fluß-Volumen

Identifikation:
Name: [redacted]
Alter:
Größe:
Beruf: Gerritz

Vorname: [redacted]
Geschlecht:
Gewicht:
Bediener: cmd Gerritz



	Soll	Best	%(B/S)	Ist1	Ist2	Ist3	Ist4
Datum		21.07.2004					
Zeit		15:14:19					
SR tot.....[kPa*s]	0.96	0.48	49.9		0.45	0.48	0.62
R tot.....[kPa*s/l]	0.30	0.18	61.1		0.17	0.18	0.24
R eff.....[kPa*s/l]	0.30	0.12	39.9		0.12	0.13	0.09
ITGV.....[l]	2.81	2.29	81.5	2.74	1.84		
ERV.....[l]	1.37	1.29	94.1	1.14	1.29		
RV.....[l]	1.46	1.01	68.9	1.60	0.55		
RV % TLC.....[%]	27.46	20.02	72.9	44.08	12.11		
TLC.....[l]	5.36	5.02	93.6	3.63	4.57		
VC IN .....[l]	3.95	3.89	98.5	2.03	3.89		
FVC.....[l]	3.95	4.01	101.7		4.01	3.82	
FEV 1.....[l]	3.45	3.08	89.2		3.08	2.97	
FEV 1 % VC MAX.....[%]	84.35	76.70	90.9		76.70	77.57	
PEF.....[l/s]	7.44	4.39	59.1		4.39	4.25	
MEF 75.....[l/s]	6.42	4.36	67.9		4.36	3.98	
MEF 50.....[l/s]	4.68	3.03	64.9		3.03	2.71	
MEF 25.....[l/s]	2.26	1.31	58.2		1.31	1.17	

Antiobstruktive Dauermedikation: ja ( ) **nein ( )**

Mitarbeit: gut ( ) mäßig ( ) schlecht ( )

BODY 21.07.2004 15:14 1/1

Abbildung 9.3: Beispiel des Auswertungsbogens: „Bodyplethysmographie“

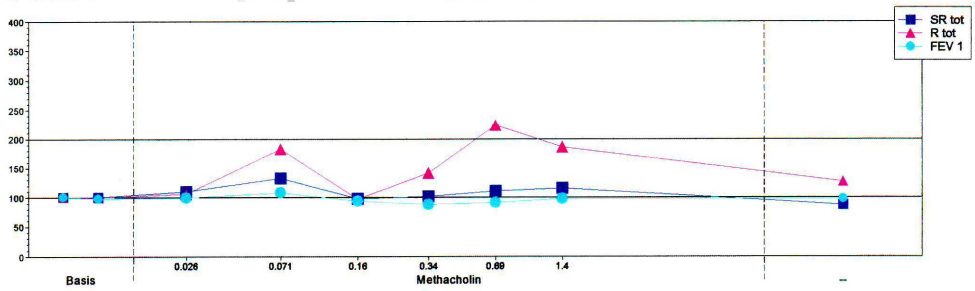
9.4 Beispiel des Auswertungsbogens: „Unspezifischer bronchialer Reaktions-Test“

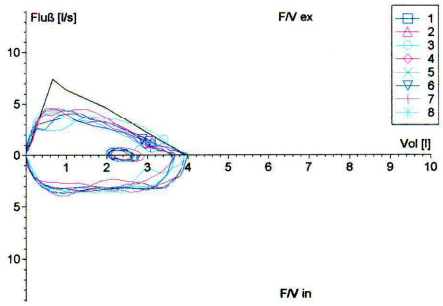
UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN
INSTITUT FÜR ARBEITSMEDIZIN
AMBULANZ FÜR ARBEITSMEDIZIN
DIREKTOR: UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. MED. THOMAS KRAUS

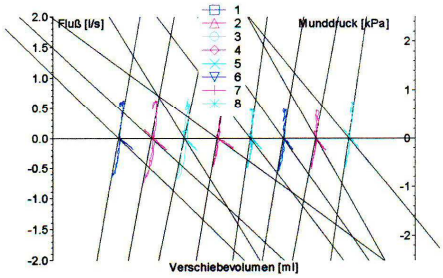
RWTH Universitätsklinikum Aachen

Unspezifischer bronchialer Reaktions-Test

Name: [redacted] Vorname: [redacted]
Identifikation: [redacted] Geburtsdatum: [redacted]
Größe: [redacted] Alter: [redacted]
Gewicht: [redacted] Geschlecht: [redacted]







	S	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12
Subst.		--	NaCL	Metha	Metha	Metha	Metha	Metha	Metha	Metha	--		
Kumul.			0.072	0.026	0.071	0.161	0.341	0.692	1.412	2 Hübe			
SR tot	0.96	0.55	0.55	0.61	0.73	0.54	0.56	0.61	0.64	0.48			
R tot	0.30	0.14	0.14	0.15	0.26	0.14	0.20	0.32	0.27	0.18			
FEV 1	3.45	3.14	3.07	3.11	3.39	2.95	2.77	2.86	3.08	3.08			
Datum		21.07	21.07	21.07	21.07	21.07	21.07	21.07	21.07	21.07.2004			
Zeit		14:26	14:32	14:36	14:41	14:46	14:50	14:56	15:03	15:14:19			

Test-Nr. 11 21.07.2004 15:14:24
PD[+100] SR tot: konnte nicht berechnet werden!
PD[+100] R tot: 0.5625 mg Kumuliert
PD[-20] FEV 1: konnte nicht berechnet werden!

PROVOKATION [redacted] 1/1

Abbildung 9.4: Beispiel des Auswertungsbogens: „Unspezifischer bronchialer Reaktions-Test“

10 Danksagung

An dieser Stelle will ich mich bei all jenen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Dissertation geholfen und/oder mich hierbei unterstützt haben:

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Kraus dafür, dass ich unter seiner Anleitung und an seinem Lehrstuhl diese Studie realisieren durfte. Dies schließt insbesondere auch seine Bereitschaft und Tatkraft im Sinne einer Probandentätigkeit ein.

Des Weiteren möchte ich mich hiermit bei allen Probanden recht herzlich bedanken (die hier aus datenrechtlichen Gründen leider anonym bleiben) die diese Studie mit ihrer Teilnahme erst ermöglicht haben.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Alice Müller-Lux für die persönliche Betreuung dieser Arbeit, Herrn Dr. Thomas Göen für die chemische Analyse der gesammelten Proben und Frau Dr. Nicole Heussen für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Dank gebührt außerdem den übrigen Mitarbeitern des Institutes und des Labors für Arbeitsmedizin an der RWTH Aachen. Namentlich erwähnen möchte ich hierbei besonders Frau P. Dewes, Frau A. Musiol und Frau E. Paulußen.

Ich danke meiner Familie, allen voran meinen Eltern Renate und Kurt, sowie meinen Schwiegereltern Monika und Erwin für die langjährige Unterstützung, Motivation und Hilfestellung.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Geschwistern Judith und Bettina, sowie meinem Schwager David für ihre tatkräftige Unterstützung.

Unter all jenen, denen ich zu Dank verpflichtet bin, nimmt meine Frau Nicola allerdings einen besonderen Stellenwert ein. Wir sind – *wenn auch thematisch unterschiedlich* – von Anfang bis zum Ende diesen Weg gemeinsam gegangen.
Ihr gebührt mein ganzer Dank in Punkto Fleiß, Geduld und Unterstützung an dieser Arbeit.

11 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in dem ***Institut und Poliklinik für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin*** des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

12 Lebenslauf

PERSONALIA

Name:	Daniel Patrick Dayton Gerritz
Geburt:	20.03.1978 in Dinslaken
Nationalität:	deutsch
Ehepartner:	Nicola Gerritz, geb. Breuckmann
Eltern:	Dr. med. dent. Kurt Josef Gerritz
	Renate Germana Gerritz, geb. Pathe
Geschwister:	Michael M.R. Gerritz (†)
	Dr. med. Bettina A.F. Dieckmann, geb. Gerritz
	Judith A.D. Middendorf, geb. Gerritz

AUSBILDUNGSWEG UND SCHULE

1984-1988	Pestalozzi Grundschule Voerde, Niederrhein
1988-1998	Theodor-Heuss-Gymnasium Dinslaken
1999-2004	Studium der Zahnmedizin an der RWTH Aachen
▪ 2001	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
▪ 2002	Zahnärztliche Vorprüfung
▪ 2004	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)
14.12.2004	Approbation als Zahnarzt

BERUFLICHER WERDEGANG

1998-1999	Zivildienst im St. Elisabeth Altenwohnheim Spellen
2005	Assistenzarzt, *Zahnarztpraxis Dr. Gerritz, Voerde*
2005-2006	Zahnarzt, *Andover (Hampshire), England*
2006-2007	Zahnarzt, *Wakefield (Yorkshire), England*
2007-2008	Assistenzarzt, *Zahnarztpraxis Dr. Gerritz, Voerde*
seit 2008	Zahnarzt in eigener Praxis, *Voerde*