

Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig Maximilian-Universität-München,
Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

Die Entzündungsparameter NO, H₂O₂ und Nitrit in der Ausatemluft:
Erstellung von Referenzwerten bei gesunden Kindern

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Philipp Latzin
aus München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Griese

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Häußinger
Prof. Dr. A. Schuh

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2003

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG	8
2. MATERIAL UND METHODE	11
2.1. H₂O₂	11
2.1.1. Probanden	11
2.1.1.1. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung	11
2.1.1.2. Referenzwerte	12
2.1.2. Sammelmethode des Exhalates	12
2.1.2.1. Absaugsystem	12
2.1.2.2. System mit Hineinatmen	13
2.1.3. Meßmethode	14
2.1.4. Vorversuche	15
2.1.4.1. Sammelmethode	15
2.1.4.2. Meßmethode	15
2.1.4.3. Reproduzierbarkeit	16
2.1.5. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung	16
2.1.5.1. Vergleich des Einflusses der Stelle der Exhalatentnahme (Nase vs. Mund)	16
2.1.5.2. Vergleich zwischen dem Absaugsystem und dem System mit Hineinatmen	16
2.1.5.3. Rolle der Einatmung	17
2.1.5.4. Menge Exhalat pro Zeit	17
2.1.6. Referenzwerte	17
2.1.6.1. 117 Kinder	17
2.1.6.2. Beeinflußbarkeit durch atopische Veranlagung	18
2.1.6.3. Exhalat der Kinder	18
2.2. NO	19
2.2.1. Probanden	19
2.2.2. Meßmethode	19
2.2.3. Sammelmethode	20
2.2.4. Referenzwerte	21
2.2.4.1. 117 Kinder	21

2.2.4.2. Beeinflußbarkeit durch atopische Veranlagung	21
2.2.5. Variabilität der NO-Konzentrationen	21
2.2.6. NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Ausatemflüssen	22
2.3. Nitrit	23
2.3.1. Probanden	23
2.3.2. Meßmethode	23
2.3.3. Sammelmethode	24
2.3.4. Referenzwerte	24
2.3.4.1. 117 Kinder	24
2.3.4.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung	24
2.4. Korrelation von NO, Nitrit und H₂O₂	24
2.5. Statistik	25
3. ERGEBNISSE	26
3.1. H₂O₂	26
3.1.1. Vorversuche zur Methode	26
3.1.1.1. Sammelmethode	26
3.1.1.2. Messmethode	28
3.1.1.3. Reproduzierbarkeit	34
3.1.2. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung	36
3.1.2.1. Vergleich des Einflusses der Stelle der Exhalatentnahme (Nase vs. Mund)	36
3.1.2.2. Vergleich zwischen dem Absaugsystem und dem System mit Hineinatmen	38
3.1.2.3. Rolle der Einatmung	39
3.1.2.4. Menge Exhalat pro Zeit	40
3.1.3. Referenzwerte	43
3.1.3.1. 117 Kinder	43
3.1.3.2. Beeinflußbarkeit durch atopische Veranlagung	46
3.1.3.3. Exhalat der Kinder	47
3.2. NO	49
3.2.1. Referenzwerte	49
3.2.1.1. 117 Kinder	49

3.2.1.2. Beeinflußbarkeit durch atopische Veranlagung	55
3.2.2. Variabilität der NO-Konzentrationen	56
3.2.3. NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Ausatemflüssen	64
3.3. Nitrit	65
3.3.1. Referenzwerte	65
3.3.1.1. 117 Kinder	65
3.3.1.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung	66
3.4. Korrelation von NO, Nitrit und H₂O₂	67
4. DISKUSSION	71
4.1. H₂O₂	71
4.1.1. Sammelmethode des Exhalates	71
4.1.1.1. Absaugsystem	71
4.1.1.2. System mit Hineinatmen	71
4.1.2. Vorversuche zur Methode	73
4.1.2.1. Sammelmethode	73
4.1.2.2. Messmethode	75
4.1.2.3. Reproduzierbarkeit	79
4.1.3. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung	80
4.1.3.1. Vergleich des Einflusses der Stelle der Exhalatentnahme	80
4.1.3.2. Rolle der Einatmung	81
4.1.3.3. Menge Exhalat pro Zeit	81
4.1.4. Referenzwerte	82
4.1.4.1. 117 Kinder	82
4.1.4.2. Beeinflußbarkeit durch atopische Veranlagung	84
4.1.4.3. Exhalat der Kinder	85
4.2. NO	86
4.2.1. 117 Kinder	86
4.2.1.1. Referenzwerte	86
4.2.1.2. Beeinflußbarkeit durch atopische Veranlagung	88
4.2.2. Variabilität der NO-Konzentrationen	89
4.2.3. NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Ausatemflüssen	91

4.3. Nitrit	91
4.3.1. Messmethode	91
4.3.2. 117 Kinder	91
4.3.2.1. Referenzwerte	91
4.3.2.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung	92
4.4. Korrelation von NO, Nitrit und H₂O₂	93
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. LITERATURVERZEICHNIS	97
7. ANHANG	107
7.1. Danksagung	107
7.2. Lebenslauf	108

1. Einleitung

NO

Auf der Suche nach Alternativen zur Bronchiallavage bei der Untersuchung von entzündlichen Vorgängen in den unteren Atemwegen ist das Interesse an nichtinvasiven Parametern in den letzten Jahren stark gestiegen. Gerade in der Kinderheilkunde ist es erforderlich, Methoden zu finden, die es ermöglichen, auf schmerzlose und einfache Weise den Verlauf von Entzündungsvorgängen in den Atemwegen darzustellen.

Zu den am besten erforschten Parametern gehören Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxyd (H₂O₂).

NO ist, mit einem freien Elektron, ein sehr reaktives Radikal und spielt eine große Rolle in vielen biologischen Vorgängen, wie Regulation des Blutflusses, Trombozytenaggregation, Immunabwehr und als Neurotransmitter. Es entsteht in Zellen bei der durch die NO Synthase (NOS) katalysierten Reaktion der Aminosäure L-Arginin zu L-Zitrullin. Dabei werden neben molekularem Sauerstoff NADPH als Cosubstrat und Flavin-Mono-Nukleotid, FAD, Hämoglobin und Tetrahydrobiopterin als Cofaktoren benötigt (Nathan; 1992).

Es wurden drei verschiedene Formen der NOS charakterisiert. Typ-1 NOS (nNOS, neuronal) und Typ-3 NOS (eNOS, endothelial), produzieren verhältnismäßig geringe Mengen an NO, die Reaktionen sind Ca²⁺ abhängig.

Die Expression von Typ-2 NOS (iNOS, induzierbar) wird durch Zytokine oder bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide (Nathan et al.; 1994) stark hochreguliert. Dieses Enzym kommt also z.B. in aktivierten Leukozyten und Epithelzellen vor, und führt zur Produktion großer Mengen an NO.

Man vermutet, dass von iNOS im Überschuss produziertes NO eine Rolle bei Entzündungen und der Immunabwehr spielt.

In den Atemwegen wurden alle drei Isoformen des Enzyms dargestellt: eNOS wurde in Blutgefäßen der Mukosa gefunden (Shaul et al.; 1994), nNOS konnte in Epithelzellen der Bronchien isoliert werden (Asano et al.; 1994) und iNOS konnte unter entzündlichen Bedingungen auch in Epithelzellen gefunden werden (Hamid et al.; 1993).

Wegen der kurzen Halbwertszeit von NO in biologischen Flüssigkeiten ist es schwierig, NO direkt zu messen. Daher wurden indirekte Messmethoden wie die Messung der stabilen Endprodukte Nitrat und Nitrit eingeführt.

NO lässt sich allerdings direkt in der Ausatemluft bestimmen, da es in gasförmiger Form relativ stabil ist (Body et al.; 1995). Wenn in oberflächlich gelegenen Zellen der Atemwege

nun NO produziert wird, kann man bei Infektionen des unteren Respirationstrakts (Alving et al.; 1993) und des oberen Atemweges (Kharitonov et al.; 1995b) eine Erhöhung des exhalieren NO gegenüber Gesunden in der Ausatemluft bestimmen.

Bei Asthmatikern wurde nicht nur gezeigt, dass die orale NO-Konzentration erheblich erhöht ist (Persson et al.; 1994a), sondern auch, dass sie durch antientzündliche Glukokortikoidgabe normalisiert werden kann (Kharitonov et al.; 1994). Bei Kindern wurde eine dosisabhängige Reduktion der NO-Werte beobachtet, je höher die Glukokortikoiddosierung war, desto niedriger war das orale NO (Lundberg; 1996). Es konnte zudem schon früh gezeigt werden, dass regelmäßiges Rauchen zu einem gegenüber Nichtrauchern erniedrigten NO-Gehalt in der Ausatemluft führt (Kharitonov et al.; 1995a).

H₂O₂

Ebenso wie NO wird auch der reaktive Metabolit H₂O₂ bei Entzündungsvorgängen in den Atemwegen gebildet. H₂O₂ wird nicht nur aus zerstörten Endothelzellen freigesetzt, sondern auch von Entzündungszellen produziert. Dabei spielen sowohl Alveolarmakrophagen - stimulierte Aveolarmakrophagen produzieren mehr reaktive Oxide als Makrophagen von Gesunden (Cluzel et al.; 1987b) - als auch Eosinophile eine Rolle (Motojima et al.; 1992a). Neuerdings konnte man auch einen Zusammenhang zwischen erhöhtem H₂O₂ und aktivierten neutrophilen Granulozyten feststellen (Wielders et al.; 1998). Daher ist es auch nicht erstaunlich, dass in mehreren klinischen Studien eine Erhöhung der H₂O₂-Konzentration im Exhalat der Patienten bei Entzündungen der Atemwege festgestellt wurde. Die H₂O₂-Konzentration in den Atemwegen wird gemessen, indem man auf unterschiedliche Weise Ausatemluft von Probanden über eine Kühlfalle kondensiert und so Exhalat der Patienten gewinnt.

So konnte erhöhtes H₂O₂ gegenüber Gesunden z. B. bei Asthmatikern (Antczak et al.; 1997a; Jobsis et al.; 1997b), bei Bronchiektasien (Loukides et al.; 1998a) und bei ARDS (Kietzmann et al.; 1993) nachgewiesen werden. Bei Mukoviszidosepatienten scheint die H₂O₂-Konzentration nicht signifikant gegenüber Gesunden verändert zu sein, wohingegen im Exhalat gemessenes Nitrit bei dieser Krankheit unabhängig davon, ob die Patienten mit oralen Steroiden behandelt werden, signifikant erhöht ist (Ho et al.; 1998b).

Ziel dieser Arbeit war es, Normalwerte von NO in der oralen und nasalen Ausatemluft, sowie von H₂O₂ und Nitrit im Exhalat bei Kindern zu bestimmen. Da es bisher kaum Referenzwerte von Kindern gibt bzw. diese auf einen sehr engen Altersbereich begrenzt sind (z.B. 9 - 13

Jahre, (Jobsis et al.; 1998c)), wurden bei 117 gesunden Kindern im Alter von 3 - 18 Jahren die entsprechenden Parameter ermittelt.

Bei den bisher benutzten Sammelmethode der Ausatemluft müssen die Probanden durch den Mund gegen einen relativ hohen Widerstand atmen (Dohlman et al.; 1993c), was eine gewisse Konzentration erfordert und gerade für Kinder nicht leicht ist.

Um die Sammlung des Exhalates auch für kleinere Kinder zu ermöglichen und zudem angenehmer und einfacher zu gestalten, wurde eine neue Sammelmethode eingeführt.

Dabei wird nasale Ausatemluft abgesaugt, wodurch die Probanden normal und ruhig atmen können. Diese Methode wurde bei einigen Tests mit Erwachsenen auf ihre Praxis-tauglichkeit getestet und validiert.

Man weiß, dass bei der Messung von NO-Werten die Höhe des festgestellten Gehaltes stark vom Ausatemfluss pro Zeit abhängt (Silkoff et al.; 1997c). Um dies auch an Kindern zu überprüfen, wurde bei 79 Probanden die NO-Konzentration bei mehreren Expirationsflüssen gemessen. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob die NO-Konzentration bei den gleichen Personen im Tagesverlauf und über sechs Tage hinweg variiert oder ob sie verlässlich konstant bleibt.

2. Material und Methode

2.1. H₂O₂

2.1.1. Probanden

Es wurden verschiedene Messungen an unterschiedlichen Probandengruppen durchgeführt. Eine Übersicht zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1 Aufteilung der Versuche zu H₂O₂

	Absaugsystem			System mit Hineinatmen		
	Mund - Mund	Nase - Nase	Mund - Nase	Nase - Nase	Mund - Mund	Nase - Mund
Nase vs. Mund	6 Erw.	6 Erw.		7 Erw.	7 Erw.	
Rolle der Einatmung		21 Erw.	11 Erw.		20 Erw.	22 Erw.
Normwerte		117 Kinder				

2.1.1.1. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung

Die Messungen Nase vs. Mund und zur Rolle der Einatmung wurden an 22 gesunden Erwachsenen im Alter von 19 - 54 Jahren durchgeführt.

Sämtliche Erwachsene, die an den Versuchen teilnahmen, haben keine chronische Erkrankung der Atemwege wie Asthma bronchiale, Mukoviszidose oder chronische Bronchitis. Außerdem war keiner der Probanden regelmäßiger Raucher.

2.1.1.2. Referenzwerte

Die 117 Kinder, deren Daten die Grundlage für die Normwerte darstellten, kamen alle aus München. Sie wurden durch einen Rundbrief an sämtliche Eltern eines Münchner Schwimmvereins rekrutiert.

Ca. 60 Kinder schwimmen Breitensportmäßig, 8 - 10 Kinder trainieren regelmäßig zweimal die Woche bei einem Schwimmverein. Alle anderen Probanden sind Geschwister oder Freunde der Kinder, bzw. ehemalige Schwimmer.

Keines der Kinder hat eine chronische Erkrankung der Atemwege wie Asthma bronchiale, Mukoviszidose oder chronische Bronchitis. Ansonsten stellen die Kinder einen normalen Querschnitt der Bevölkerung dar.

Von allen Teilnehmern der Untersuchungen wurde deren Einverständnis und das der Eltern schriftlich eingeholt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU genehmigt.

2.1.2. Sammelmethode des Exhalates

2.1.2.1. Absaugsystem

Die Ausatemluft wurde direkt abgesaugt und als Kondensat in den Gefäßen gesammelt.

Dabei wurde mittels einer Saugpumpe (Laborport N 811 KN.18S, KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland) unter einer Pumpleistung von 11,5 l/min das Exhalat direkt vor der Nase abgesaugt und durch eine Sauerstoffbrille (B + F Medical by Allied Healthcare Products, St. Louis, Missouri, USA) in zwei Sammelgefäße (cellstar[®], PP-Röhrchen steril, 50 ml, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) geleitet, die über Glasröhrchen verbunden waren. Die Gefäße befanden sich in einer Kühlbox, die mit tiefgefrorenen Salzwassertüten gefüllt war. Da das System dicht abgeschlossen war, konnte nur Luft über die Sauerstoffbrille in die Sammelrohre gelangen (siehe Abbildung 1).

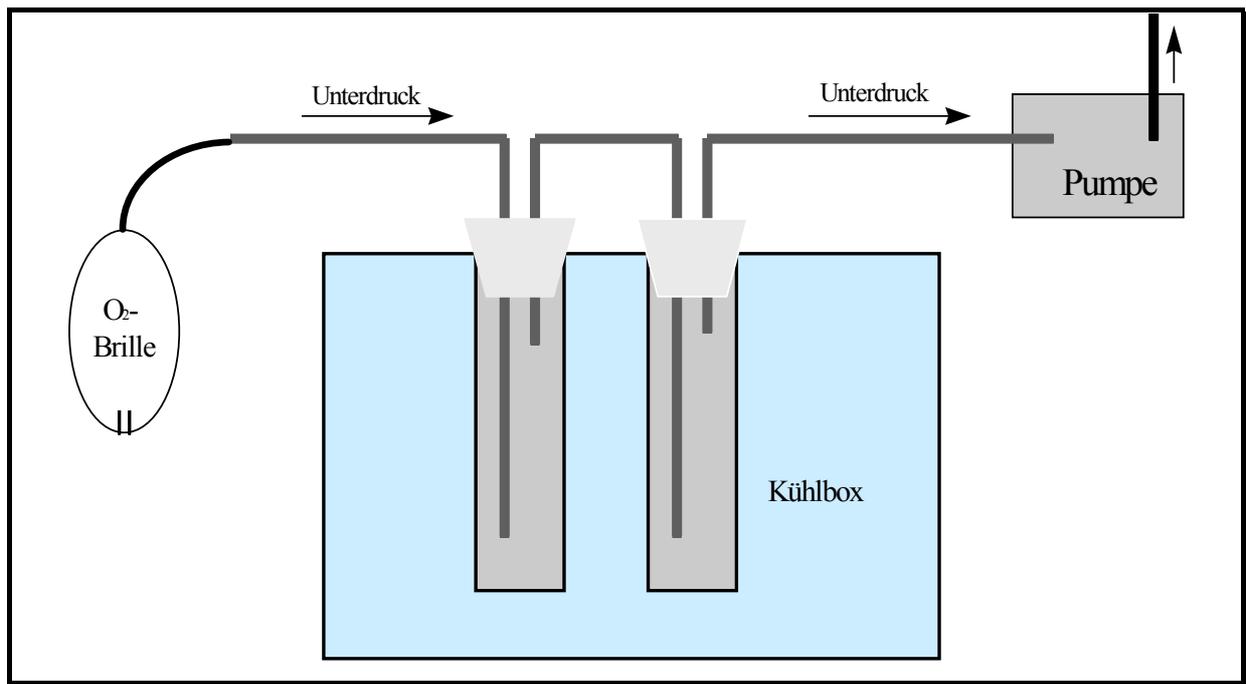


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Sammelvorrichtung mit Absaugsystem

Nase - Nase

Die Probanden sollten normal tief und gleichmäßig durch die Nase für etwa 30 Minuten ein- und ausatmen. Während dieser Zeit sollte der Mund geschlossen sein, so dass über die Absaugstelle eingeatmet wurde.

Mund - Nase

Die Probanden atmeten auf die gleiche Art wie bei „Nase - Nase“, der einzige Unterschied bestand darin, dass sie durch den offenen Mund einatmeten und durch die Nase nur ausatmeten.

Mund - Mund

Es wurde ein Stück Schlauch von einer abgeschnittenen Sauerstoffbrille vor den Mund gehalten, in das die Probanden hineinatmeten, wobei sie sowohl durch den Mund ein- wie auch ausatmeten.

2.1.2.2. System mit Hineinatmen

Dabei wurde die Ausatemluft aktiv in die Sammeleinrichtung hineingeatmet ohne abgesaugt zu werden. Die Ausatemluft wurde gesammelt, indem die Probanden durch ein Y-förmiges Mundstück mit einem Inspirationsventil an einem Schenkel des Y und einem sich anschließenden Schlauch am anderen Schenkel des Y in ein offenes Gefäß in der Kühlbox

atmeten. Der Arm des Y, durch den eingeatmet wurde, fungierte dabei auch als Speichelreservoir, um eine Verunreinigung des Kondensates zu vermeiden.

Mund - Mund

Alle Personen wurden angewiesen, normal und nur durch den Mund ein- und auszuatmen.

Dabei sollten sie für ca. 20 Minuten atmen.

Nase - Mund

Die Einatmung bei diesen Versuchen erfolgte durch die Nase, die Ausatmung über den Mund in das Ventil. Ansonsten waren die Vorgaben die gleichen wie bei „Mund - Mund“.

Nase - Nase

Mit einer kleinen Beatmungsmaske wurde die nasale Ausatemluft über einen Schlauch in das offene Gefäß geleitet. Durch das zwischengeschaltete Y-förmige Mundstück mit Ventil wurde es den Probanden ermöglicht, sowohl durch die Nase ein- als auch auszuatmen.

2.1.3. Meßmethode

Die Konzentration von H_2O_2 wurde fluorometrisch mithilfe von Meerrettich-Peroxidase und para-Hydroxyphenylacetatsäure bestimmt. Die Messung beruht auf der Reaktion von H_2O_2 und Meerrettich-Peroxidase, welche ein Produkt bilden, das para-Hydroxyphenylacetatsäure zu einem fluoreszierenden Stoff oxidiert (Hyslop et al.; 1984; Panus et al.; 1993a).

400 μ l Kondensat (zur Gewinnung siehe Sammelmethode) wurde unmittelbar nach dem Sammeln mit 10 μ l einer 1,5 mM para-Hydroxyphenylacetatsäure und 4 μ l Meerrettich-Peroxidase der Konzentration 100 μ g/ml (beide von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gemischt, gut geschüttelt und sofort bei -70°C eingefroren. Das aufgetaute Produkt sowie die Lösungen zur Erstellung einer Standardkurve wurden an einem Fluorometer (LS 50 B, Perkin Elmer, Norwalk, USA) bei einer Exzitationswellenlänge von 295 nm, einer Emissionswellenlänge von 405 nm und einer Schlitzbreite von 10 nm gemessen. Dabei wurden die Emissionswerte zur Erstellung der Standardkurve in Dreifachbestimmung und die aufgetauten Exhalate in Doppelbestimmungen gemessen. Die Konzentrationen von H_2O_2 wurden mithilfe einer Standardkurve errechnet, welche an jedem Messtag neu erstellt wurde. Die Kurve hatte ein unteres Detektionslimit von 0,05 μ M und war linear im Bereich zwischen 0 und 1,6 μ M (siehe Abbildung 2). Die genauen Sammel- und Messbedingungen wurden an Vorversuchen ermittelt (siehe Ergebnisse unter „Folgerungen für die Messmethode“).

Während der Exhalatsammlungen lag die Umgebungstemperatur zwischen 22°C und 26°C , der Luftdruck bei 913 - 943 hPa und die Luftfeuchtigkeit bei 40 % bis 51 %.

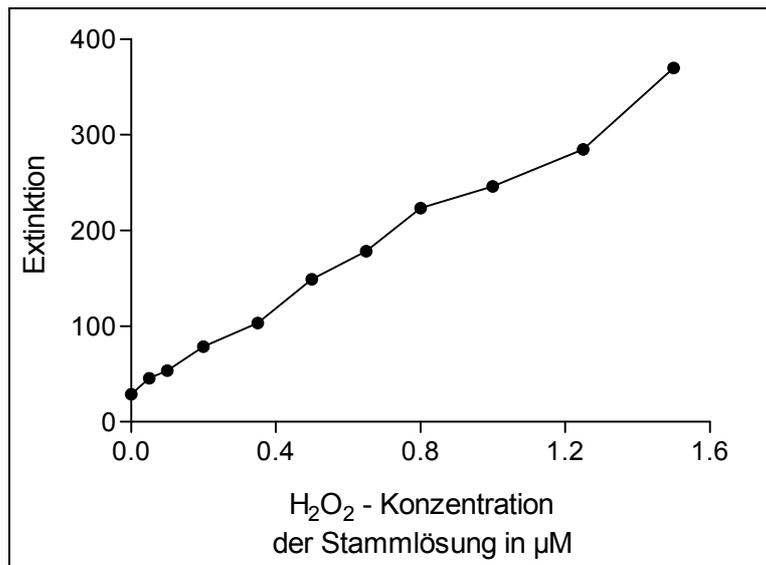


Abbildung 2 Darstellung einer H₂O₂-Standardkurve

2.1.4. Vorversuche

Bevor die H₂O₂-Konzentrationen bei den Kindern und bei den Erwachsenen im Nase-Mund Vergleich gemessen wurden, wurde in Versuchen mit eigenem Exhalat probiert, die bestmögliche Methode zum Sammeln, Verarbeiten, Einfrieren und Messen des gesammelten Kondensates zu finden. Dazu waren mehrere Versuche notwendig.

2.1.4.1. Sammelmethode

Um zu untersuchen, aus welchen Luftanteilen sich das gesammelte Kondensat im neuen System mit Absaugen und Nasenatmung zusammensetzt, wurden verschiedene Exhalatsammlungen durchgeführt :

- ⇒ Ansaugen der Umgebungsluft über längere Zeit
- ⇒ Vergleich von Atmung durch beide Nasenlöcher und Atmung durch ein Nasenloch
- ⇒ Vergleich von Sammlung mit normaler Sauerstoffbrille und Sammlung mit an der Nase abgedichteten Schläuchen
- ⇒ Sammlungen mit mehr als zwei Sammelgefäßen
- ⇒ Vergleich von H₂O₂ im 1. und 2. Sammelgefäß

2.1.4.2. Meßmethode

Zur Optimierung der Meßmethode wurden mehrere Exhalatsammlungen mit verschiedenen Versuchen durchgeführt, wobei bei allen Sammlungen das Absaugsystem unter Nasenatmung verwendet wurde :

- ⇒ Vergleich von mit und ohne Enzymen eingefrorenem H_2O_2 bei $-70^\circ C$
- ⇒ Stabilität von H_2O_2 im Exhalat bei $-70^\circ C$ nach Zugabe der Reaktionsenzyme
- ⇒ Stabilität von H_2O_2 im Sammelgefäß ohne Zugabe der Enzyme
- ⇒ Stabilität von H_2O_2 im Sammelgefäß mit Zugabe der Enzyme
- ⇒ Stabilität der eingefrorenen Enzyme

2.1.4.3. Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit sowohl der Messungen als auch der Sammlungen zu überprüfen, wurden einige mehrfach durchgeführte Bestimmungen der H_2O_2 -Konzentration auf ihre Genauigkeit überprüft.

2.1.5. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung

2.1.5.1. Vergleich des Einflusses der Stelle der Exhalatentnahme (Nase vs. Mund)

Um Unterschiede zwischen Nasen- und Mundatmung zu untersuchen, wurden beim Absaugsystem die H_2O_2 -Konzentrationen an 6 erwachsenen Nichtrauchern jeweils bei Mundatmung und bei Nasenatmung bestimmt.

Ebenso wurde beim System mit Hineinatmen an 5 erwachsenen Nichtrauchern die H_2O_2 -Konzentrationen jeweils bei Mund- und Nasenatmung bestimmt.

2.1.5.2. Vergleich zwischen dem Absaugsystem und dem System mit Hineinatmen

Mit den durchgeführten Versuchen konnten auch Aussagen über eventuelle Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Sammelsystemen gemacht werden. So wurden die H_2O_2 -Konzentrationen bei gleicher Atemtechnik (Nase - Nase und Mund - Mund), jedoch unterschiedlicher Exhalatsammlung (Absaugsystem und System mit Hineinatmen) verglichen.

2.1.5.3. Rolle der Einatmung

Um eventuelle Einflüsse der Einatmung auf die H_2O_2 -Konzentration im Exhalat und auf die Menge Kondensat, die pro Zeit gesammelt wurde festzustellen, wurden folgende Versuche durchgeführt :

Beim Absaugsystem (Nasenausatmung) wurde an 11 Erwachsenen die H_2O_2 -Konzentration unter Mundeinatmung, sowie bei 21 Erwachsenen unter Naseneinatmung gemessen. Außerdem wurde bei 10 bzw. 16 Erwachsenen die Menge Exhalat pro Zeit unter Mundeinatmung und Naseneinatmung bestimmt.

Beim System mit Hineinatmen ohne Absaugen (Mundausatmung) wurden die H_2O_2 -Konzentrationen bei 20 Probanden unter Mundeinatmung mit 22 Probanden unter Naseneinatmung verglichen. Dabei wurde jeweils bei 15 Personen die gesammelte Menge Exhalat pro Zeit bestimmt.

2.1.5.4. Menge Exhalat pro Zeit

Um Aussagen über die Menge Exhalat pro Zeit machen zu können, die bei den Probanden gewonnen wurde, hat man bei beiden Sammelsystemen verglichen, wie viel Kondensat bei Nasen- bzw. Mundeinatmung gesammelt wurde.

2.1.6. Referenzwerte

2.1.6.1. 117 Kinder

Um Normalwerte der H_2O_2 -Konzentrationen bei Kindern zu erhalten und das neue Sammelsystem (Absaugsystem mit Nasenatmung) auf die Praxistauglichkeit zu überprüfen, wurde die H_2O_2 -Konzentration und die Sammelmenge Exhalat pro Zeit bei 117 Kindern im Alter von 3 - 18 Jahren bestimmt. Es wurde geprüft, ob die H_2O_2 -Konzentration von der Tageszeit der Sammlung abhängig ist. Zudem wurden die Kinder klinisch auf ihren Atopikerstatus untersucht. Dafür wurden an allen 117 Probanden folgende Untersuchungen durchgeführt :

⇒ ein einfacher, forciertes Lungenfunktionstest (Master-Lab von Jaeger, Würzburg) mit u.a. Messung vom maximalen expiratorischen Einsekundenvolumen (FEV1) und maximalem

endexpiratorischen Fluss (MEF 25). Die Messungen wurden zweifach wiederholt und die Ergebnisse nach der ATS-Methode ausgewertet.

- ⇒ ein Pricktest mit 16 Allergenen (Bencard, Smithkline Beecham, Großbritannien), die genauen Allergene sind in Tabelle 14 unter 3.1.6.1. aufgeführt. Positive Kontrolle war 0,1%-ige Histaminlösung, negative Kontrolle war Natriumchlorid. Als positiv wurde die Reaktion dabei gewertet, wenn nach 15 Minuten eine Quaddel mit einem Durchmesser von mehr als 3 mm wie die negative Kontrolle entstanden war.
- ⇒ eine ausführliche Anamnese mit Fragen zu saisonalen allergischen Symptomen wie Konjunktivitis und Rhinitis, aktiv und passiv rauchen, Erkältungen und zur Familienanamnese.

2.1.6.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Um einen möglichen Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die H₂O₂-Konzentration zu untersuchen, wurde eine Multivarianz Regressionsanalyse durchgeführt. Mittels des errechneten p-Wertes für die jeweiligen Faktoren kann ein statistisch signifikanter Einfluss festgestellt werden. Die einzelnen Variablen waren dabei Alter, FEV₁, MEF₂₅, Geschlecht, Familienanamnese, Pricktestergebnis, saisonale Symptome und Rauchexposition der Kinder. Im einzelnen wurden die Untergruppen wie folgt unterschieden:

- Anamnese : keine Familienanamnese oder mindestens ein Elternteil mit positiver Atopikieranamnese
- Pricktest : nur negative Pricktestergebnisse oder mind. ein positives Pricktestergebnis.
- Symptome : nie Symptome aus dem atopischen Formenkreis oder saisonal atopische Symptome wie Konjunktivitis, Rhinitis oder Juckreiz an bestimmten Körperstellen.
- Rauchen : absolute Nichtraucher oder Aktivraucher bzw. starke Passivraucher (um in die Kategorie der Passivraucher eingeteilt zu werden, musste mind. ein Elternteil zuhause regelmäßig rauchen).

2.1.6.3. Exhalat der Kinder

Es wurde die durchschnittlich gesammelte Menge Exhalat pro Zeit gemessen.

Anschließend wurde geprüft, ob eine Abhängigkeit vom Alter oder vom Tageszeitpunkt bestand, d.h. ob bei älteren Kindern mehr Exhalat gesammelt werden kann oder ob z.B. die Kinder morgens mehr Exhalat produzieren.

2.2. NO

2.2.1. Probanden

Die Probanden für sämtliche Messungen von NO sind alle Bestandteile der Probandengruppe, die unter 2.1.1.2. genau aufgeführt wurde.

2.2.2. Meßmethode

Alle Messungen wurden an einem NO / NO_x Chemilumineszenz-Meßgerät (LR 2000, Logan Research, Rochester, U.K.) durchgeführt.

NO in der gasförmigen Probe reagiert mit Ozon (O₃), welches im Überschuss vorhanden ist, zu NO₂ mit einem angeregten Elektron. Dieses Elektron wird abgegeben und sendet dabei elektromagnetische Strahlung im Bereich von 600 - 3000 nm Wellenlänge aus. Mit dieser sehr sensitiven Methode kann NO bis zu einer Konzentration von 1 ppb gemessen werden.

An jedem Messtag wurde das Chemilumineszenzgerät mit Hilfe von bekannten NO-Konzentrationen (106 ppb, BOC Gase, Bopfingen) neu geeicht.

Während der Messungen lag die Umgebungstemperatur zwischen 22° C und 26° C, der Luftdruck bei 913 - 943 hPa und die Luftfeuchtigkeit bei 40 % bis 51 %.

An insgesamt 21 Testtagen lag die NO-Umgebungskonzentration 14 mal unter 4 ppb.

Viermal betrug die NO-Konzentration in der Umgebungsluft 4 - 10 ppb, und an 5 Testtagen lag der NO-Raumwert bei 18 - 56 ppb.

2.2.3. Sammelmethode

Oral gemessenes NO

Die Probanden atmeten durch ein 10 cm langes Plastikröhrchen aus, an dessen Ende verschiedene Atmungswiderstände angebracht werden konnten. Über zwei Öffnungen im Rohr wurde die Ausatemluft mittels Schläuche in das NO-Analysegerät bzw. zur Atmungsdruckluftmessung geleitet.

So konnten die Probanden über die Bildschirmanzeige des Ausatemdruckes ihren Expirationsfluß konstant halten.

Je nach eingesetztem Widerstand war der Expirationsfluss 10 ml/s, 20 ml/s, 45 ml/s, 86 ml/s, 184 ml/s oder 237 ml/s. Vor der Messung wurde tief eingatmet, um möglichst lange mit einem konstanten Luftfluss auszuatmen.

Gegen Ende der Ausatmung und mit steigender - simultan gemessener - CO₂-Konzentration bildete sich bei der NO-Konzentration ein Plateau aus. Es wurde stets ein NO-Wert als Messwert bestimmt, welcher gegen Ende der Ausatmung während des NO-Plateaus und bei einer möglichst hohen CO₂-Konzentration abgelesen wurde.

Wenn bei einzelnen Probanden kein NO-Plateau erreicht wurde oder sie Schwierigkeiten bei der langdauernden Ausatmung hatten und dadurch die CO₂-Konzentration nicht mindestens 4,5 % erreichte, wurden die entsprechenden NO-Werte nicht verwendet.

Nasal gemessenes NO

Die Probanden sollten möglichst lange die Luft bei geschlossenen Mund anhalten und auch nicht durch die Nase atmen. Über einen dünnen Schlauch, der bis in die Nase reichte, wurde durch einen geringen Unterdruck die Luft aus der Nase abgesaugt und direkt in das NO-Analysegerät geleitet. Durch eine ansteigende CO₂-Konzentration wurden die Kinder darauf aufmerksam, dass Ausatemluft mit angesaugt wurde. Bei Probanden, denen es nicht möglich war, die Luft ausreichend lange anzuhalten, wurden die durch Ausatemluft verfälschten NO-Messwerte selbstverständlich nicht in die Wertung mit einbezogen.

Jede Messung wurde mit neu desinfizierten Schläuchen, Plastikrohren und Mundstücken durchgeführt.

2.2.4. Referenzwerte

2.2.4.1. 117 Kinder

Bei 117 Kindern wurde die orale NO-Konzentration bei einem Expirationsfluß von 184 ml/s und die nasale NO-Konzentration bestimmt.

Bei 33 Kindern wurde zudem noch die orale NO-Konzentration bei einem Expirationsfluß von 45 ml/s, 86 ml/s und 237 ml/s gemessen, um festzustellen, ob die oralen NO-Konzentrationen bei verschiedenen Ausatemflüssen in Verhältnis zueinander stehen.

Anschließend wurde eine mögliche Abhängigkeit der NO-Werte vom Tageszeitpunkt der Messung geprüft.

2.2.4.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Analog der unter 2.1.6.1. und 2.1.6.2. beschriebenen Kriterien wurde mittels einer Multivarianz Regressionsanalyse geprüft, ob die NO-Konzentration von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

2.2.5. Variabilität der NO-Konzentrationen

Um die Variabilität der NO-Werte und die Gleichmäßigkeit der Messungen zu testen, wurde bei 7 Kindern an 6 aufeinanderfolgenden Tagen morgens, nachmittags und spätabends die orale NO-Konzentration bei einem Expirationsfluß von 184 ml/s gemessen.

Bei den Probanden handelte es sich um 4 Jungen im Alter von 9, 12, 12 und 15 Jahren; die 3 Mädchen waren 9, 12 und 14 Jahre alt.

Alle Kinder waren zum Zeitpunkt der Messung gesund und haben keine chronische Erkrankung der Atemwege wie Asthma bronchiale, Mukoviszidose oder chronische Bronchitis. Einer der Probanden hat eine positive Atopikeranamnese und eine pathologische Lungenfunktion (MEF75 = 91 %; MEF50 = 68 %; MEF25 = 60 %).

Ansonsten hatte kein Kind ein positives Pricktestergebnis, eine bekannte Allergie oder eine positive Familienanamnese, alle Lungenfunktionen waren bis auf oben genannte völlig normal (FEV 1 > 100 % soll und MEF 25 > 90 % soll) und keines der Kinder ist Raucher.

An jedem der sechs Messtage wurde morgens zwischen 8:30 und 8:45 Uhr und abends zwischen 22:35 und 23:30 Uhr sowie an fünf Tagen nachmittags zwischen 16:45 und 18:50 Uhr die NO-Konzentration bestimmt. Dabei wurde bei allen Probanden am selben Tag jeweils zur gleichen Zeit gemessen.

2.2.6. NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Ausatemflüssen

Bei mehreren Probanden wurden die NO-Werte bei mindestens 4 verschiedenen Expirationsflüssen gemessen (Tabelle 2), um die Theorie der Flussabhängigkeit des NO-Wertes experimentell zu belegen.

Bei 32 Kindern wurden die oralen NO-Konzentrationen bei Expirationsflüssen von 45 ml/s, 86 ml/s, 184 ml/s und 237 ml/s bestimmt. 13 Kinder wurden zusätzlich bei einem Expirationsfluss von 20 ml/s gemessen.

Die oralen NO-Konzentrationen bei Expirationsflüssen von 20 ml/s, 45 ml/s, 86 ml/s und 184 ml/s wurden bei 20 Kindern getestet.

Tabelle 2 Übersicht der NO-Messungen bei verschiedenen Ausatemflüssen

Expirationsfluß	10 ml/s	20 ml/s	45 ml/s	86 ml/s	184 ml/s	237 ml/s
32 Kinder	o	o	X	X	X	X
13 Kinder	o	X	X	X	X	X
20 Kinder	X	X	X	X	X	o

2.3. Nitrit

2.3.1. Probanden

Die Probandengruppe bestand aus den gleichen Kindern wie bei der Bestimmung von NO- und H₂O₂-Normwerten (siehe 2.1.1.2).

2.3.2. Meßmethode

Die Konzentration von Nitrit (NO₂⁻) wurde mit einem Nitrat/Nitrit Assay Kit (Cayman Chemical, Alexis, Grünberg, Deutschland) über eine fluorometrische Reaktion bestimmt. Dabei wird Nitrit mit 2,3-Diaminonaphtalene und NaOH vermischt, was zu einem fluoreszierenden Produkt führt. 20 µl Kondensat (siehe Sammelmethode) wurden mit vorgegebenen Assay-Puffer zu 100 µl aufgefüllt.

Anschließend gab man 20 µl 2,3-Diaminonaphtalene und 10 µl NaOH hinzu.

Bei einer Exzitationswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm wurde nach der entsprechenden Inkubationszeit die Mikrotiterplatte abgelesen. Mithilfe einer Nitrit-Standardkurve konnte man die Konzentration der einzelnen Proben bestimmen. Die Kurve hatte ein unteres Detektionslimit von 0,04 µM und war linear im Bereich von 0 - 50 µM (siehe Abbildung 3).

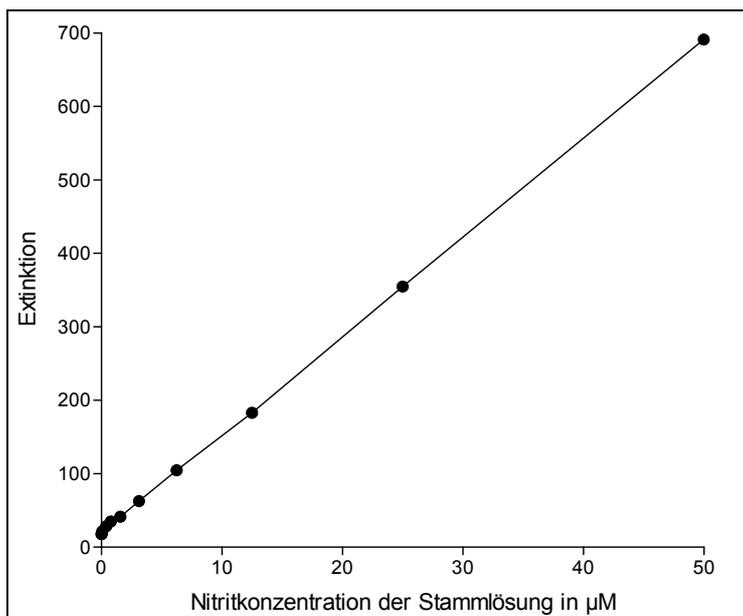


Abbildung 3 Darstellung der Nitrit-Standardkurve

Anhand dieses Assays sollte auch die Nitratkonzentration bestimmt werden. Da jedoch auch bei mehrmaliger Wiederholung der Messungen keine ausreichend gute Standardkurve dargestellt werden konnte, musste auf die Bestimmung von Nitratwerten verzichtet werden.

2.3.3. Sammelmethode

Die Nitritkonzentration wurde analog der H₂O₂-Konzentration aus dem Exhalat der Kinder bestimmt. Dabei wurde entsprechend der H₂O₂-Normwertbestimmung die Sammelmethode mit Absaugen vor der Nase verwendet, wobei die Probanden nur einmal ca. 30 Minuten gesammelt haben, da aus dem dabei entstandenen Exhalat sowohl die H₂O₂-Konzentration als auch die Nitritkonzentration bestimmt werden konnte.

2.3.4. Referenzwerte

2.3.4.1. 117 Kinder

Es wurden Normwerte der Nitritkonzentration in der Ausatemluft von Kindern aufgestellt. Eine mögliche Abhängigkeit der Nitritkonzentration von der Tageszeit der Messung wurde getestet.

2.3.4.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Analog der unter 2.1.6.1. und 2.1.6.2. beschriebenen Kriterien wurde mittels einer Multivarianz Regressionsanalyse geprüft, ob die NO-Konzentration von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

2.4. Korrelation von NO, Nitrit und H₂O₂

Da NO und H₂O₂ z.B. bei Asthma erhöht sind (siehe Einleitung), stellt sich die Frage, ob die NO- und H₂O₂-Produktion durch ähnliche Ursachen im menschlichen Körper getriggert werden kann und ob durch bestimmte Faktoren die gleichzeitige Entstehung beider

Metaboliten erhöht werden kann. Außerdem ist bekannt, dass ein bestimmter Teil des gasförmigen NO in Nitrat bzw. Nitrit metabolisiert wird (Gaston et al.; 1994; Grasmann et al.; 1997b). Daher wurde überprüft, ob orales bzw. nasales NO mit im Exhalat gemessenem Nitrit oder H₂O₂ bei Gesunden korreliert. Außerdem wurde im Rahmen der Korrelationsmessungen Nitrit mit H₂O₂ verglichen.

2.5. Statistik

Alle Daten der H₂O₂- und Nitrit-Messungen wurden mindestens in Doppelbestimmungen erhoben, bei Erstellung der Standardkurven und bei den Eigenversuchen zur Optimierung der Messmethoden wurden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt. Bei der Bestimmung der endexpiratorischen NO-Konzentration wurde der Mittelwert aus drei Versuchen verwendet.

Alle Werte der Messungen sind angegeben in Median, 25. Perzentile - 75. Perzentile von der Anzahl n an gemessenen Einzelwerten – falls nicht abweichend vermerkt. In Tabellen ist zusätzlich noch der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Vergleiche zweier nicht-parametrischer und nicht gepaarter Beobachtungen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Test analysiert, Vergleiche von mehr als zwei nicht-parametrischer Untersuchungen mittels des Kruska-Wallis-Test. Die Korrelation wurde je nach Verteilung der Daten mittels eines Pearson oder Spearman Korrelationstest geprüft. Ein zweiseitiges $p < 0,05$ galt als signifikant.

Die statistische Auswertung wurde mit Graph Pad Prism Software (San Diego, CA, USA) durchgeführt, alle Abbildungen wurden auch damit erstellt. Die Multivarianz Regressionsanalyse wurde mit Microsoft Excel Software (Santa Rosa, CA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. H₂O₂

3.1.1. Vorversuche zur Methode

3.1.1.1. Sammelmethode

Umgebungsluft

Bei insgesamt 5 Versuchen, über längere Zeit die Umgebungsluft anzusaugen, um festzustellen, wie viel Kondensat gesammelt werden kann und wie hoch die H₂O₂-Konzentration in diesem Kondensat ist, konnte viermal (14 - 18 Stunden) überhaupt kein Kondensat gewonnen werden, einmal wurde bei einer Sammeldauer von 15 Stunden 1,4 ml Wasser gesammelt mit einer H₂O₂-Konzentration von 1,68 µM.

Vergleich beider Nasenlöcher

Bei vergleichenden Versuchen zwischen Sammlung auf normale Art mit Ausatmung durch beide Nasenlöcher, Sammlung mit Ausatmung durch ein Nasenloch und Sammlung mit an der Nase abgedichteten Schläuchen, so dass die gesamte Ausatemluft in die Sammelgefäße geleitet wurde, kam es zu erwartungsgemäßen Ergebnissen. Man kann erkennen, dass die Menge Kondensat pro Zeit bei Sammlung mit einem Nasenloch etwas mehr als die Hälfte des Wertes bei Sammlung mit beiden Nasenlöchern darstellt. Bei abgedichteter Nase lag die Menge Exhalat pro Zeit bei dem 2,65-fachen der Menge bei Sammlung mit der Sauerstoffbrille locker in der Nase (Tabelle 3).

Tabelle 3 gesammelte Menge Exhalat pro Zeit bei verschiedenen Sammelmethoden; Sammeldauer ca. 25 Minuten; angegeben ist jeweils die Menge in $\mu\text{l}/\text{min}$

Testtag Nr.	zwei Nasenlöcher	ein Nasenloch	an der Nase abgedichtet
1 a	70	45	
1 b	60	46,6	
2	46,6	28,6	113
3	70	38,6	180
4	68	33,3	186,6
Median	68	39	180

Bei den Messungen der H_2O_2 -Konzentration bei allen Sammelvariationen zeigt sich, dass diese mit Medianwerten von 1,2; 1,1 und 0,98 μM in etwa gleich hoch ist (Tabelle 4), und damit unabhängig von dem Anteil der Ausatemluft, der abgesaugt wird.

Tabelle 4 H_2O_2 -Konzentration in μM bei unterschiedlichen Sammelmethoden

Testtag Nr.	zwei Nasenlöcher	ein Nasenloch	an der Nase abgedichtet
1 a	0,32	0,37	
1 b	0,33	0,40	
2	1,34	1,21	1,2
3	1,22	1,09	0,58
4	1,36	1,78	0,98
Median	1,2	1,1	0,98

Mehrere Sammelgefäße

Bei Sammlungen mit mehr als zwei Sammelgefäßen wurden im dritten und vierten Gefäß nur unbedeutende Mengen ($< 0,2 \mu\text{l}/\text{min}$) an Kondensat gefunden. Dies stand aber auch in Relation dazu, wie dicht die Verbindungsschläuche waren, durch welche die Luft angesaugt wurde. Je mehr Sammelgefäße verwendet wurden, desto undichter wurden die Verbindungen

und desto weniger Exhalat konnte im Endeffekt angesaugt werden. Außerdem spielte die Konstanz der Temperatur um die Gefäße eine entscheidende Rolle.

Als beste und praktikabelste Lösung stellte sich bei unserem System die Sammlung mit zwei Sammelgefäßen heraus.

Vergleich der H₂O₂-Konzentrationen im 1. und 2. Sammelgefäß

Da man aufgrund der unterschiedlichen Mengen des Exhalates in beiden Sammelgefäßen (im ersten Gefäß war erwartungsgemäß wesentlich mehr Kondensat als im zweiten Gefäß) vermuten konnte, dass auch Unterschiede im H₂O₂ Gehalt des Exhalates bestehen, wurden beide Sammelgefäße verglichen.

Dazu wurden beim selben Sammelvorgang die Konzentrationen von H₂O₂ im ersten Sammelgefäß mit denen im zweiten Gefäß verglichen.

Man konnte eine konstante Erhöhung der H₂O₂-Konzentration bei allen Werten im zweiten Gefäß feststellen. Der Median im ersten Gefäß lag bei 0,35 (0,27 - 0,36) µM; n=7, im zweiten Gefäß bei 0,76 (0,69 - 0,83) µM; n=7 (Abbildung 4).

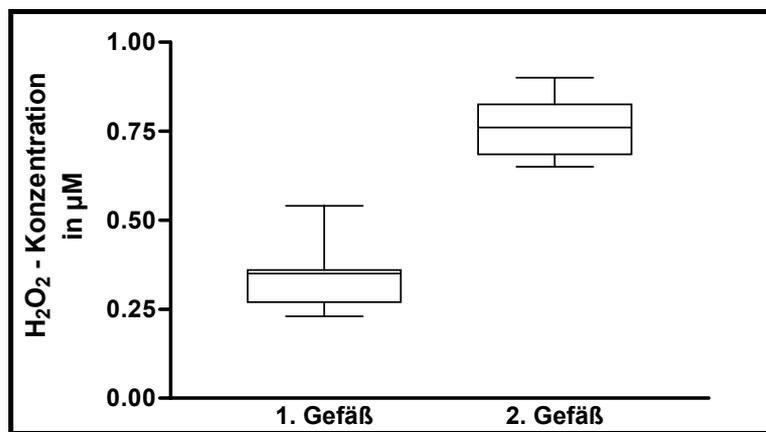


Abbildung 4 Vergleich der H₂O₂-Konzentration zwischen dem ersten und dem zweiten Gefäß; Darstellung von Median, 25. und 75 Perz., Min und Max

3.1.1.2. Messmethode

Vergleich von mit und ohne Enzymen eingefrorenem Kondensat bei - 70° C

Der Vergleich zwischen mit zugegebenen Enzymen eingefrorenem Kondensat und ohne Enzymen eingefrorenem Exhalat hat ergeben, dass die Werte stabiler sind, wenn man das Exhalat sofort mit Enzymen mischt und dann mehrere Tage einfriert. Gegenüber den H₂O₂-Konzentrationen der Versuche, bei denen das Enzym erst nach dem Auftauen hinzugegeben

wurde, waren die Werte der Versuche mit sofort beigemischten Enzymen mit einem Medianwert von - 3,5 % gegenüber - 20 % näher an der ursprünglichen Ausgangskonzentration (siehe Tabelle 5). Dies veranlasste uns, dass bei allen folgenden Bestimmungen die Enzyme immer vor dem Einfrieren dazugegeben wurden.

Tabelle 5 Vergleich von mit und ohne Enzym eingefrorenem Exhalat. Dargestellt ist jeweils die ursprüngliche H₂O₂-Konzentration, die gemessene Konzentration nach dem Auftauen in µM sowie die Konzentrationsänderung in Prozent und die Einfrierdauer

H ₂ O ₂ -Konzentration	mit Enzym	Veränderung in %	ohne Enzym	Veränderung in %	Dauer des Einfrierens
0,34 µM	0,37 µM	+ 8,8	0,24 µM	- 29,4	1 Tag
0,23 µM	0,23 µM	0	0,24 µM	+ 4,3	2 Tage
0,72 µM	0,67 µM	- 6,9	0,65 µM	- 9,7	2 Tage
0,61 µM	0,50 µM	- 18	0,27 µM	- 55,7	4 Tage

Der Medianwert der H₂O₂-Konzentrationsänderung bei sofort zugegebenen Enzymen betrug -3,5 (- 18 Minimum; + 8,8 Maximum; n = 4) %.

Bei Zugabe der Enzyme nach dem Auftauen betrug der Median -20 (- 55,7 Minimum; + 4,3 Maximum; n = 4) %.

Stabilität von H₂O₂ im Exhalat bei - 70° C nach Zugabe der Reaktionsenzyme

Anhand dieser Ergebnisse konnte man außerdem annehmen, dass H₂O₂ im eingefrorenen Exhalat bei - 70°C recht konstant bleibt. Trotzdem wurden noch weitere Messungen gemacht, um dieser Frage nachzugehen. Dabei ist ein Teil des Exhalates zwischen 2 Stunden und 4 Tagen eingefroren worden und der Wert der H₂O₂-Konzentration nach dem Auftauen mit dem direkt nach der Sammlung gemessenen anderen Teil des Exhalates verglichen worden.

Die Ergebnisse (siehe Tabelle 6) belegen die Vermutung, dass die H₂O₂-Konzentration im eingefrorenen Zustand des Exhalates recht konstant bleibt.

Tabelle 6 Darstellung der Stabilität von H₂O₂ im Exhalat nach Enzymzugabe

ursprüngliche H ₂ O ₂ -Konzentration	spätere H ₂ O ₂ -Konzentration	Dauer des Einfrierens	Veränderung in Prozent	durchschnittl. Veränderung in Prozent	Prozent vom Ausgangswert
0,30 µM	0,33 µM	2 Std.	+ 10		110 %
0,49 µM	0,46 µM	2 Std.	- 6,1	8,1	93,9 %
0,34 µM	0,37 µM	1 Tag	+ 8,8		108,8 %
0,76 µM	0,88 µM	1 Tag	+ 15,8	+ 12,3	115,8 %
0,23 µM	0,23 µM	2 Tage	0		100 %
0,72 µM	0,67 µM	2 Tage	- 6,9	- 3,5	93,1 %
0,34 µM	0,35 µM	3 Tage	+ 2,9		102,9 %
0,35 µM	0,54 µM	3 Tage	+ 54,3		154,3 %
0,65 µM	0,77 µM	3 Tage	+ 18,5	+ 25,2	118,5 %
0,61 µM	0,50 µM	4 Tage	- 18	- 18	82 %

Der Medianwert in % vom Ausgangswert beträgt 110 (97 - 110; n = 10) %.

Allerdings kann man an Abbildung 5 erkennen, dass die H₂O₂-Konzentrationen stärker schwanken, je länger das Exhalat eingefroren war.

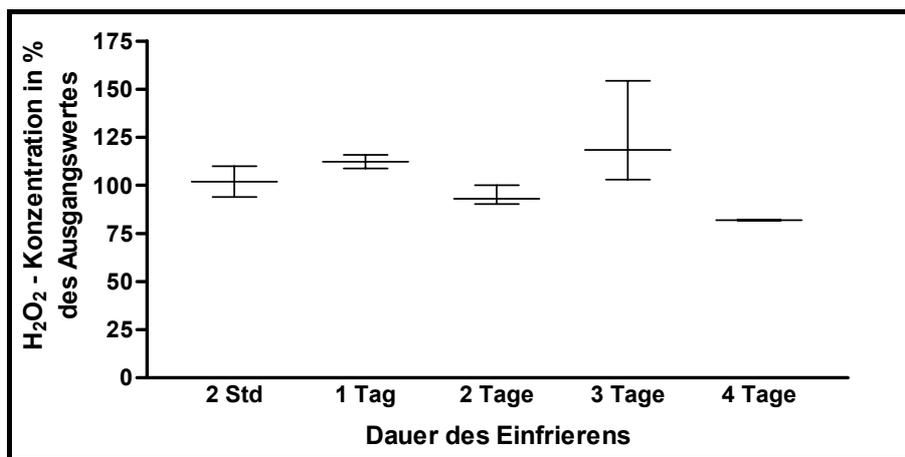


Abbildung 5 Vergleich der H₂O₂-Konzentration bei unterschiedlicher Einfrierdauer; angegeben ist der Medianwert sowie - falls vorhanden - die 25. und 75. Perzentile

Stabilität von H₂O₂ im Sammelgefäß ohne Zugabe der Enzyme

Bei den folgenden Versuchen wurde getestet, wie stabil H_2O_2 im Kondensat im Sammelgefäß ist, bevor man die Enzyme hinzugegeben hat.

Aus Tabelle 7 kann man erkennen, dass die H_2O_2 -Konzentration durch Stehen lassen im Gefäß bei Zimmertemperatur ein wenig zunimmt, jedoch sicher nicht rasch abnimmt. Dennoch wurde beim späteren Sammeln immer darauf geachtet, dass das Exhalat aus den Gefäßen sofort verarbeitet und eingefroren wird.

Tabelle 7 Stabilität von H_2O_2 im Exhalat ohne Zugabe der Reaktionsenzyme

ursprüngliche H_2O_2 -Konzentration	spätere H_2O_2 -Konzentration	Dauer des Stehen lassen	Veränderung in Prozent	Veränderung in % pro min
0,34 μM	0,30 μM	5 min	- 12	- 2,4
0,76 μM	0,90 μM	5 min	+ 18	+ 3,7
0,23 μM	0,32 μM	5 min	+ 39	+ 7,8
0,34 μM	0,35 μM	10 min	+ 0,03	0
0,59 μM	0,66 μM	10 min	+ 11,9	+ 1,2

Der Median der prozentualen Veränderung pro Minute betrug 1,2 (- 2,4 Minimum; + 7,8 Maximum; n = 5) %.

Stabilität von H_2O_2 im Sammelgefäß mit Zugabe der Enzyme

Um herauszufinden, wie schnell man das bereits mit Enzymen versetzte Exhalat einfrieren muss, bzw. wie schnell man die wieder aufgetaute Flüssigkeit im Fluorometer messen muss, wurden in mehreren Versuchsreihen die Unterschiede der H_2O_2 -Konzentration nach 10 und 15-minütigem Stehen lassen des Kondensates gemessen. Dabei stand das Exhalat entweder vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen im ca. 5° C kalten dunklen Kühlschrank mit bereits zugegebenen Enzymen. Die Ergebnisse (Tabelle 8) haben dazu geführt, dass bei den folgenden Messungen das Exhalat nie mit Enzymen gemischt und dann gelagert wurde, sondern sofort eingefroren und direkt nach dem Wiederauftauen gemessen wurde.

Tabelle 8 Stabilität von H₂O₂ mit Zugabe der Reaktionsenzyme

Ursprüngliche H ₂ O ₂ -Konzentration	spätere H ₂ O ₂ -Konzentration	Dauer des Stehen lassen	Wert in % vom Ausgangswert	Zunahme in % pro min
0,54 µM	0,61 µM	10 min	113	1,3
0,59 µM	0,67 µM	10 min	114	1,4
0,88 µM	1,05 µM	10 min	119	1,9
0,72 µM	0,87 µM	10 min	121	2,1
0,27 µM	0,33 µM	10 min	122	2,2
0,50 µM	0,69 µM	10 min	138	3,8
0,23 µM	0,32 µM	10 min	139	3,9
0,24 µM	0,35 µM	10 min	146	4,6
0,33 µM	0,49 µM	10 min	148	4,8
0,23 µM	0,34 µM	10 min	148	4,8
0,37 µM	0,61 µM	10 min	165	6,5
0,24 µM	0,42 µM	10 min	175	7,5
0,30 µM	0,54 µM	10 min	180	8
0,49 µM	0,92 µM	10 min	188	8,8
0,76 µM	0,90 µM	15 min	118	1,2
0,30 µM	0,43 µM	15 min	143	2,8
0,34 µM	0,51 µM	15 min	150	3,3
0,32 µM	0,58 µM	15 min	181	5,4
0,35 µM	0,41 µM	15 min	117	0,9

Die durchschnittliche Zunahme betrug 3,96 (0,9 Minimum - 8,8 Maximum; n = 19) % pro min.

Stabilität der eingefrorenen Enzyme

Um zu testen, wie lange die vorbereiteten Enzyme bei - 20° C haltbar sind, wurde bei 8 verschiedenen Proben am gleichen Exhalat (entspricht gleiche H₂O₂-Konzentration) einmal mit 6 Monate alten tiefgefrorenen Enzymen und einmal mit neu angesetzten Enzymen gemessen. Wie man an Abbildung 6 sieht, war die Extinktion beim Fluorometer in etwa gleich hoch. Man kann daher davon ausgehen, dass die Enzyme bei - 20° C recht stabil sind.

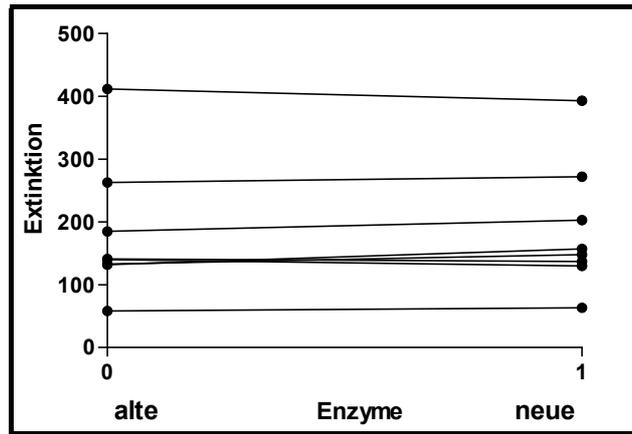


Abbildung 6 Stabilität der eingefrorenen Reaktionsenzyme, angegeben ist die fluorometrische Extinktion, Messungen mit gleich hohen H_2O_2 -Konzentration sind durch Linien verbunden

Folgerungen aus den Vorversuchen für die Messmethodik

Die Folgerung aus allen Vorversuchen war, dass immer der Inhalt beider Sammelgefäße zusammengeschüttet wurde, sofort mit den entsprechenden Reaktionsenzymen vermischt und eingefroren wurde. In der Regel nach zwei Tagen wurde das Kondensat aufgetaut und sofort gemessen.

3.1.1.3. Reproduzierbarkeit

H₂O₂ - Standardkurven

Um zu überprüfen, ob die - an verschiedenen Messtagen erstellten - Standardkurven miteinander identisch sind, wurden die Extinktionen der H₂O₂-Standards bei 0,0; 0,1; 0,5; 1,0 und 1,5 µM von sieben verschiedenen Messtagen übereinander aufgetragen (Abbildung 7).

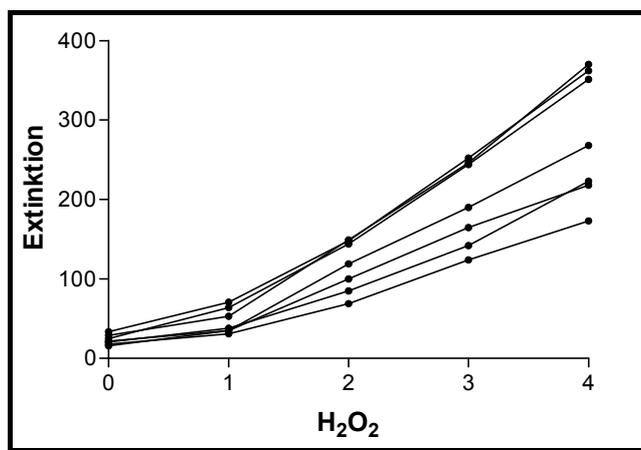


Abbildung 7 Darstellung der H₂O₂-Standardkurven von 7 verschiedenen Messtagen, angegeben ist die H₂O₂-Konzentration der Standards in µM und die fluorometrische Extinktion

Man sieht, dass die Extinktionswerte zwischen den einzelnen Messtagen variieren. Deshalb wurde am Tag der Messung von Probandenexhalat auch immer eine neue Standard-Eichkurve angefertigt.

Inter - Assay - Koeffizient

Ebenso wurden Messdaten von Probanden verglichen. Dazu wurden alle Sammlungen, die während der Versuchsreihe an unterschiedlichen Tagen auf die gleiche Art und Weise von derselben Person durchgeführt wurden, miteinander verglichen.

An Tabelle 9 und Abbildung 8 kann man klar erkennen, dass die Werte von unterschiedlichen Versuchstagen relativ stark schwanken, dies jedoch auch von Proband zu Proband verschieden ist.

Tabelle 9 Inter-Assay-Koeffizient von n = 10 Probanden, angegeben ist – sofern nicht anders beschrieben - die H₂O₂-Konzentration in µM

Proband Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n Messungen	7	4	3	7	3	3	3	3	7	7
Minimum	0,31	0,45	1	0,48	0,85	0,86	0,77	0,22	0,23	0,65
Median	0,61	0,62	1,1	0,51	1,1	1,4	0,84	0,55	0,35	0,76
Maximum	1,3	1,6	1,4	1,7	1,1	1,7	0,94	0,93	0,54	0,9
Std. abweichung	0,35	0,54	0,18	0,45	0,14	0,42	0,085	0,36	0,1	0,1
Std. fehler	0,13	0,27	0,11	0,17	0,082	0,24	0,049	0,21	0,039	0,038
VK	49 %	65 %	15 %	58 %	14 %	32 %	10 %	63 %	30 %	13 %

Der Median des Variationskoeffizienten von n = 10 Probanden beträgt 31 (14,5 - 53,5) %.

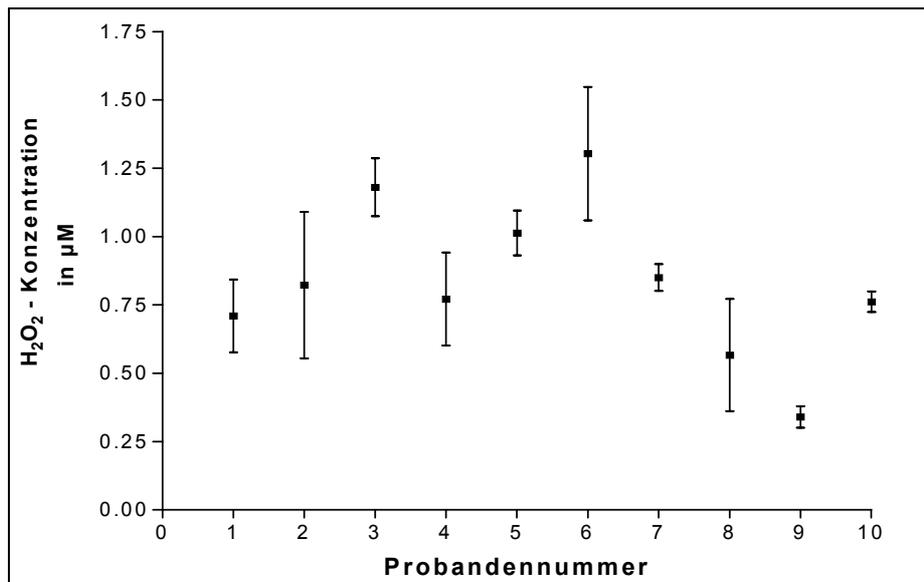


Abbildung 8 Darstellung der Inter-Assay-Variabilität der einzelnen Probanden

Intra - Assay - Koeffizient

Um neben diesem Inter-Assay-Koeffizienten auch noch einen Intra-Assay-Koeffizienten darzustellen, wurde von Standardkurvenstellungen von 20 H₂O₂-Konzentrationen an verschiedenen Tagen jeweils der Variationskoeffizient von den drei Werten der Extinktionsbestimmung errechnet.

Als Median dieser n = 20 Variationskoeffizienten ergibt sich 6,48 (4,07 - 8,79) %.

3.1.2. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung

3.1.2.1. Vergleich des Einflusses der Stelle der Exhalatentnahme (Nase vs. Mund)

Absaugen des Exhalates von Nase oder Mund (Ein- und Ausatmung jeweils über die Absaugstelle)

Zunächst wurden beim System mit Absaugen neben Nase - Nase auch Mund - Mund Versuche durchgeführt, d.h. es wurde einerseits die Sauerstoffbrille in die Nase gehalten, andererseits die abgeschnittene Sauerstoffbrille als Schlauch vor den Mund gehalten.

Die H₂O₂-Konzentration war bei Mundatmung mit 1,10 (1,00 - 1,20 ; n = 6) µM etwa gleich hoch wie bei Nasenatmung mit 0,93 (0,89 - 0,94 ; n = 6) µM (Tabelle 10).

Tabelle 10 Vergleich der H₂O₂-Konzentration in µM zwischen Nasen- und Mundatmung bei Absaugsystem

Art der Atmung	Anzahl	25 % Perzentile	Median	75 % Perzentile	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Nase - Nase	6	0,89	0,93	0,94	0,95	0,16	0,066
Mund - Mund	6	1,0	1,1	1,2	1,1	0,15	0,062

Direktes Ausatmen des Exhalates in Sammeleinrichtung (ohne Absaugen)

Beim Sammelsystem mit Hineinatmen wurden ebenso vergleichende Versuche zwischen Mundatmung und Nasenatmung durchgeführt.

Trotz eines bei Nasenatmung mit 0,75 (n = 5) µM gegenüber Mundatmung mit 0,51 (n = 5) µM erhöhten Medianwertes konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 11). Dies wird durch die Gegenüberstellung der einzelnen Wertepaare (siehe Abbildung 9) bestätigt.

Tabelle 11 Vergleich der H₂O₂-Konzentration in µM zwischen Nasen- und Mundatmung bei System mit Hineinatmen

Art der Atmung	Anzahl	Minimum	Median	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Nase - Nase	5	0,45	0,75	1,6	0,9	0,49	0,22
Mund - Mund	5	0,48	0,51	1,7	0,98	0,66	0,30

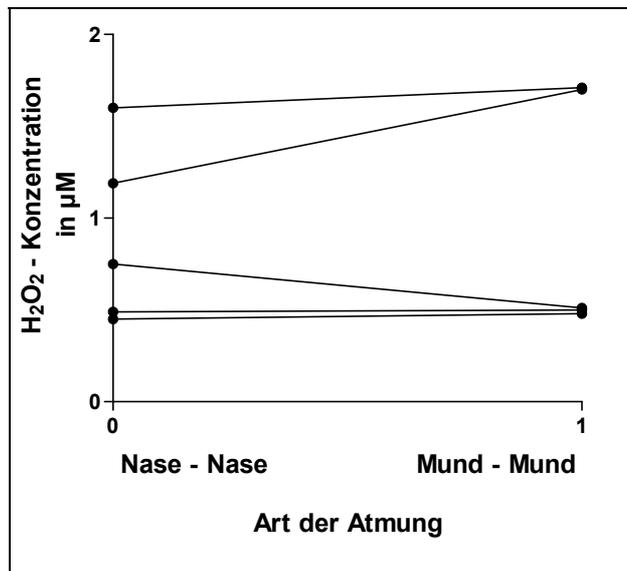


Abbildung 9 Vergleich der H₂O₂-Konzentration in µM bei unterschiedlicher Atmung, Sammlung beim System mit Hineinatmen

3.1.2.2. Vergleich zwischen dem Absaugsystem und dem System mit Hineinatmen

Beim Vergleich der gleichen Atemtechniken (Mund - Mund bzw. Nase - Nase) bei verschiedenen Systemen (Absaugsystem und System mit Hineinatmen) zeigt sich, dass die H₂O₂-Werte beim System mit Hineinatmen etwas stärker schwanken als beim Absaugsystem (Tabelle 12), währenddessen die Medianwerte nicht statistisch signifikant unterschiedlich sind (Kruska-Wallis Test).

Tabelle 12 Vergleich der beiden Sammelsysteme, angegeben ist die H₂O₂-Konzentration in µM

Sammelsystem	Art der Atmung	Anzahl	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Absaugsystem	Nase - Nase	6	0,93	0,95	0,16	0,066
Absaugsystem	Mund - Mund	6	1,1	1,1	0,15	0,062
System mit Hineinatmen	Nase - Nase	5	0,75	0,9	0,49	0,22
System mit Hineinatmen	Mund - Mund	5	0,51	0,98	0,66	0,30

Wie man an Abbildung 10 sieht, scheint die H₂O₂-Konzentration insgesamt unabhängig von der Art der Ausatmung und des Sammelsystems zu sein.

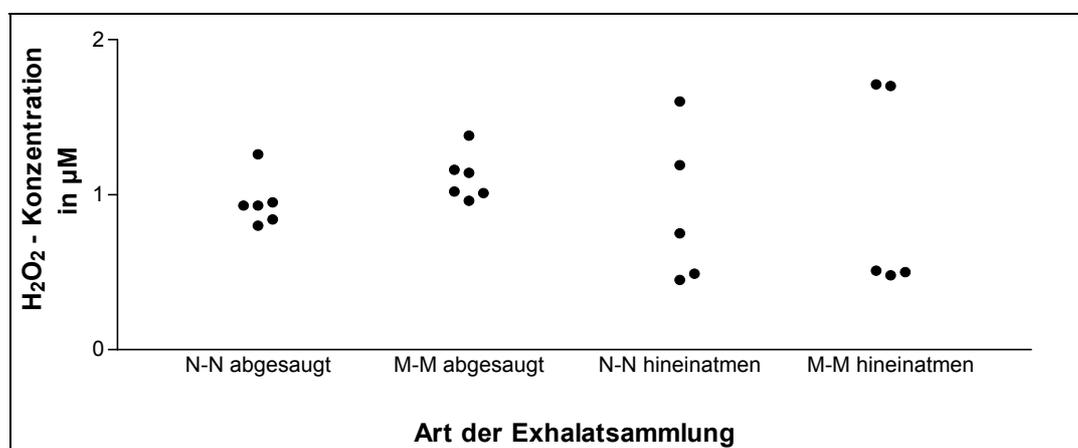


Abbildung 10 Darstellung aller Messwerte abhängig von der Art der Exhalatsammlung

3.1.2.3. Rolle der Einatmung

Um die Rolle der Einatmung auf die H_2O_2 -Konzentration zu beurteilen, wurde bei gleicher Ausatmung und gleichem Sammelsystem einmal durch die Nase eingeatmet und einmal durch den Mund eingeatmet.

Absaugen des Exhalates vor der Nase (Einatmung über Nase verglichen mit Mund)

Beim System mit absaugen und Nasenausatmung waren die Medianwerte bei Naseneinatmung im Vergleich zu den Werten bei Mundeinatmung mit $0,36$ ($0,31 - 0,55$; $n = 11$) μM gegenüber $0,32$ ($0,24 - 0,47$; $n = 21$) μM zwar leicht erhöht (Abbildung 11), diese Erhöhung war jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test).

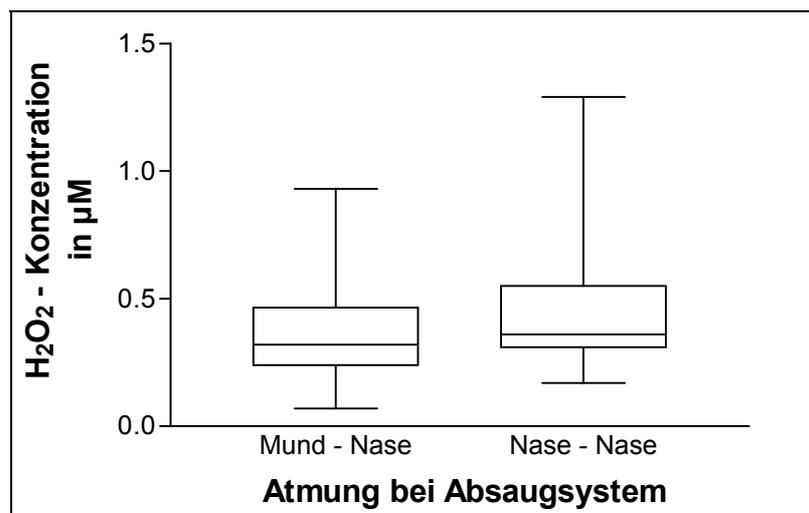


Abbildung 11 Darstellung der Medianwerte, 25.-75. Perzentile und Minimum-Maximum bei unterschiedlicher Einatmung und Nasenausatmung

Direktes Hineinatmen in Sammeleinrichtung durch den Mund (Einatmung über Mund verglichen mit Nase)

Ebenso waren beim System mit Hineinatmen ohne Absaugen die Konzentrationen von H_2O_2 unabhängig von der Art der Einatmung (Abbildung 12). So war der Medianwert bei Mundeinatmung 1,0 (0,84 - 1,4 ; n = 20) μM , bei Naseneinatmung 0,91 (0,65 - 1,1 ; n = 22).

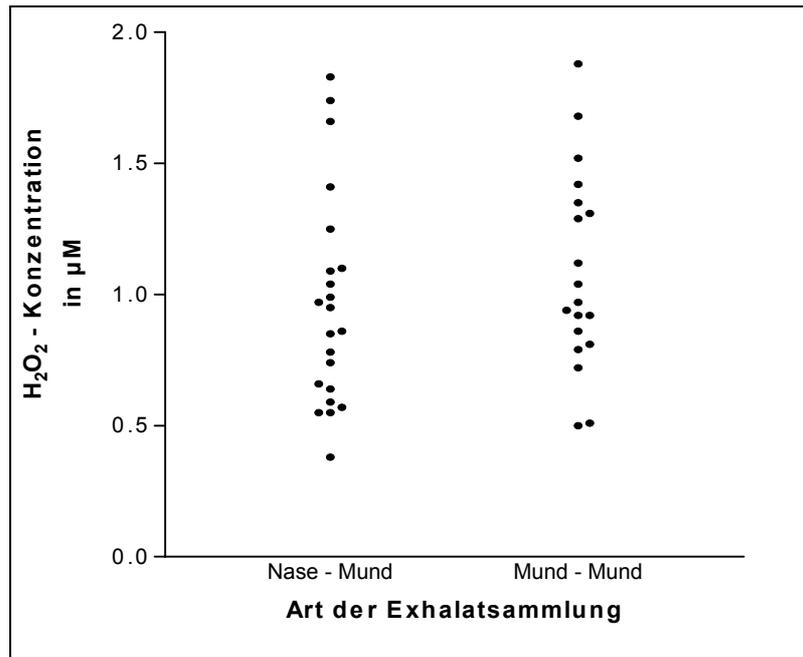


Abbildung 12 Darstellung aller Einzelwerte bei unterschiedlicher Einatmung und System mit Hineinatmen; das höchste Wertepaar (1,8 μM und 3,2 μM) wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit in nebenstehendem Diagramm gestrichen.

3.1.2.4. Menge Exhalat pro Zeit

Absaugen des Exhalates vor der Nase (Einatmung über Nase verglichen mit Mund)

Es stellte sich heraus, dass beim Absaugsystem und Nasenausatmung die Menge Exhalat pro Zeit bei Mundeinatmung mit 93 (87 - 97; n = 10) $\mu\text{l}/\text{min}$ gegenüber Naseneinatmung mit 77 (63 - 88; n = 16) $\mu\text{l}/\text{min}$ zwar leicht erhöht ist, dies aber statistisch nicht signifikant ist (Mann-Whitney-Test; $p > 0,05$).

Auch im direkten Vergleich bei den einzelnen Probanden (Abbildung 13) kann man erkennen, dass nur bei zwei Personen wesentlich mehr Kondensat pro Zeit gesammelt wurde, wenn sie durch den Mund eingatmet haben.

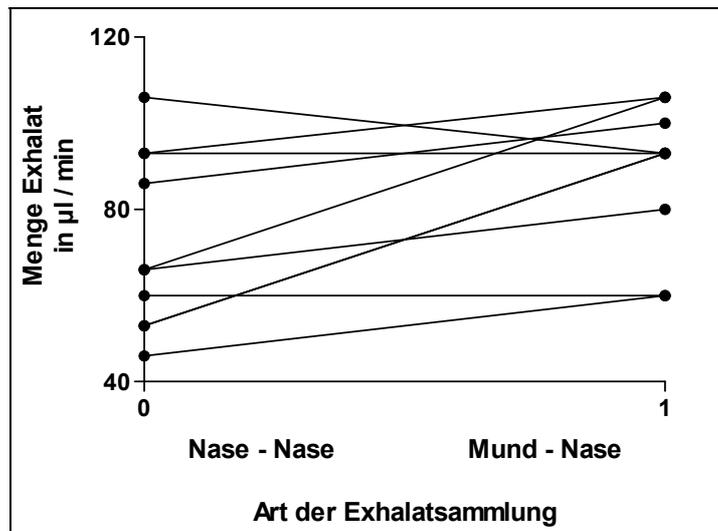


Abbildung 13 Vergleich der Menge Exhalat pro Zeit bei unterschiedlicher Einatmung und Nasenausatmung, Absaugsystem

Direktes Hineinatmen in Sammeleinrichtung durch den Mund (Einatmung über Mund verglichen mit Nase)

Auch beim System mit Hineinatmen ohne Absaugen und Mundausatmung war die gewonnene Menge Kondensat pro Zeit praktisch unabhängig von der Art der Einatmung. So wurde bei Mundeinatmung 66 (60 - 80; n = 15) µl/min und bei Naseneinatmung 80 (63 - 100; n = 15) µl Exhalat pro Minute gewonnen.

Entsprechend kann man im direkten Vergleich (Abbildung 14) keine kontinuierliche Erhöhung der Menge Exhalat pro Zeit erkennen.

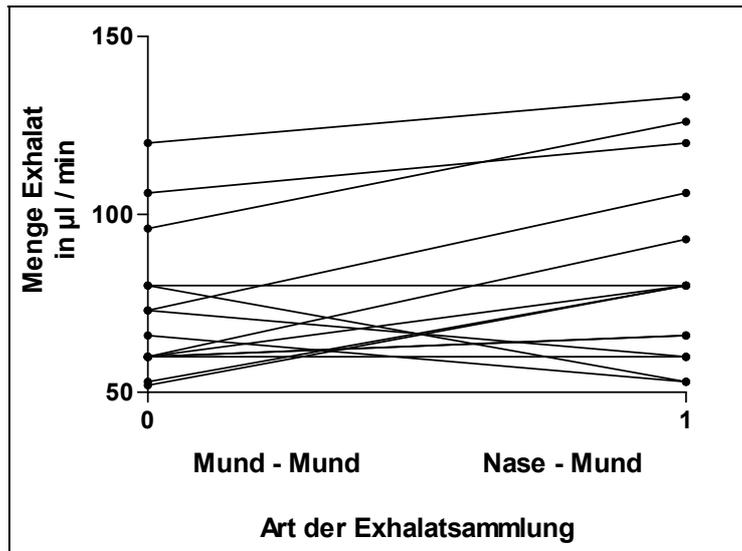


Abbildung 14 Vergleich der Menge Exhalat pro Zeit bei unterschiedlicher Einatmung und Mundausatmung beim System mit Hineinatmen

3.1.3. Referenzwerte

3.1.3.1. 117 Kinder

Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Die klinische Untersuchung der Kinder ergab folgendes Bild:

- ⇒ Keines der 117 Kinder hatte anamnestisch Asthma
- ⇒ 62 Kinder hatten ein negatives Prickergebnis.
- ⇒ Bei 2 Kindern konnte kein Pricktest durchgeführt werden.
- ⇒ 53 Kinder hatten ein positives Pricktestergebnis,
 - ⇒ 18 davon keine familiäre Anamnese und nie Symptome atopischer Erkrankungen,
 - ⇒ 18 von ihnen zeigten eine positive Familienanamnese,
 - ⇒ 17 Kinder zeigten eine positive Familienanamnese und hatten zusätzlich saisonal eine allergische Konjunktivitis oder Rhinitis (siehe Tabelle 13).
- ⇒ 4 Kinder haben zur Zeit der Messungen aktiv, sowie 12 Kinder passiv geraucht.
- ⇒ Die genaue Auflistung der Häufigkeit von positiven Reaktionen im Pricktest gegen bestimmte Allergene geht aus Tabelle 14 hervor.

Tabelle 13 Genaue Aufteilung der Kinder entsprechend ihrer atopischen Anamnese

Anzahl der Kinder		familiäre Anamnese	Prick		Symptome
			positiv	negativ	
	35			x	
62 <=	27	x		x	
18	18	x	x		
18	18		x		
	12		x		saisonal
17 <=	5	x	x		saisonal
2	2		kein Prick		

Tabelle 14 Anzahl der positiven Pricktestergebnisse gegen einzelne Allergene bei insgesamt 117 durchgeführten Pricktests

	Allergen	Anzahl der pos. Ergebnisse
Nahrungsmittel	Ei, Milch	0
	Nüsse	2
Schimmelpilze	Alternaria alternata	3
	Aspergillus niger	7
Pollen	Gräser	39
	Birke	27
	Erle	23
	Hasel	19
	Weide	19
	Kräuter	25
	Roggen	27
	Tierhaare	Hund
Katze		21
Pferde		20
Gänse		14
Hase		24
Hausstaubmilbe	D. pter	28
	D. farinae	33

Referenzwertbestimmung der H₂O₂- Konzentration

Die H₂O₂-Konzentration in der Ausatemluft betrug 0,52 (0,28 - 0,75) µM; n = 116.

Die H₂O₂-Konzentrationen der Kinder waren normalverteilt (siehe Abbildung 15) mit einer KS-Strecke von 0,094 bei einem p > 0,10.

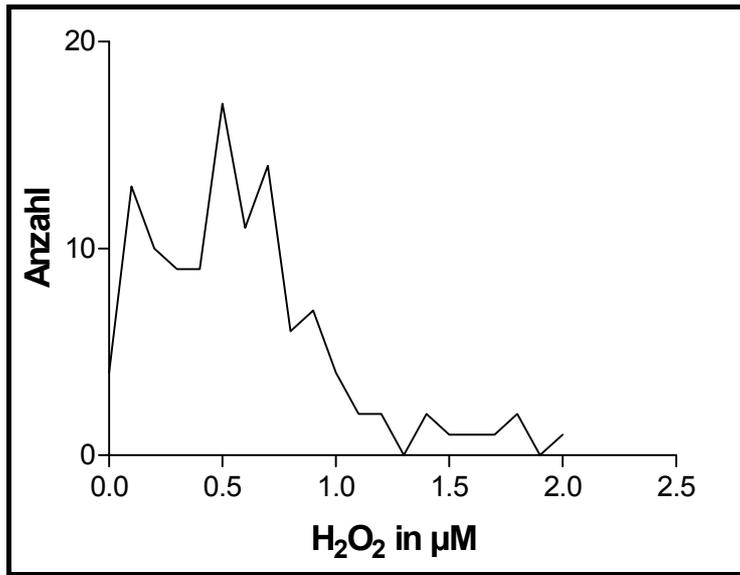


Abbildung 15 Darstellung der Normalverteilung der H₂O₂-Daten

Zwischen der H₂O₂-Konzentration und der Uhrzeit des Testes bestand keine Abhängigkeit (siehe Abbildung 16).

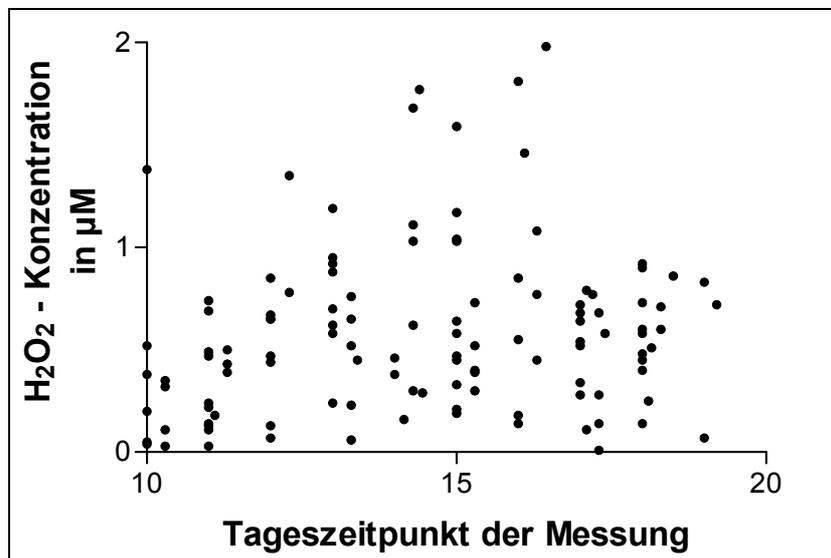


Abbildung 16 Vergleich von Tageszeit der Messung und H₂O₂-Konzentration

3.1.3.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Um zu überprüfen, ob verschiedene Faktoren wie Alter, Lungenfunktion (FEV1, MEF25), Geschlecht, Familienanamnese, Pricktestergebnis, saisonale Symptome oder Rauchexposition einen Einfluss auf die H₂O₂-Konzentration haben, wurde eine Multivarianz Regressionsanalyse mit den o.g. Variablen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgeführt. Bei keiner der Variablen konnte ein signifikanter Einfluss auf die H₂O₂-Konzentration festgestellt werden.

Tabelle 15 Ergebnisse der Multivarianz-Regressions-Analyse für die angegebenen Variablen und ihrem Einfluss auf den gemessenen H₂O₂-Wert. Der Einfluss der Variablen ist als zweiseitiger p-Wert angegeben.

	p-Wert der Multivarianzanalyse		Anzahl und Alter der Kinder in Jahre
Alter	0,33	Alter	115; 11,3
FEV1	0,50	FEV1	115; 11,3
MEF25	0,05	MEF25	115; 11,3
Geschlecht	0,99	Männlich	56; 11,1
		Weiblich	59; 11,9
Familienanamnese	0,06	Negativ	75; 12,2
		Positiv	40; 10,6
Pricktest	0,36	Negativ	62; 11,6
		Positiv	53; 11,5
Saisonale Symptome	0,08	Negativ	69; 11,4
		Positiv	46; 12,2
Rauchen	0,99	Negativ	100; 11,5
		Positiv	15; 12,0

3.1.3.3. Exhalat der Kinder

Die gesammelte Menge Exhalat pro Zeit betrug 91 (80 - 100) $\mu\text{l}/\text{min}$.

Um zu untersuchen, ob ältere Kinder mehr Exhalat pro Zeit sammeln können, da sie ein größeres Atemminutenvolumen haben, wurde die jeweils gesammelte Menge Exhalat pro Zeit mit dem Alter des Probanden verglichen. Wie man in Abbildung 17 sieht, lag eine Altersabhängigkeit vor, welche durch einen signifikanten Korrelationstest nach Pearson bestätigt wird ($r=0,324$ und $p=0,0004$).

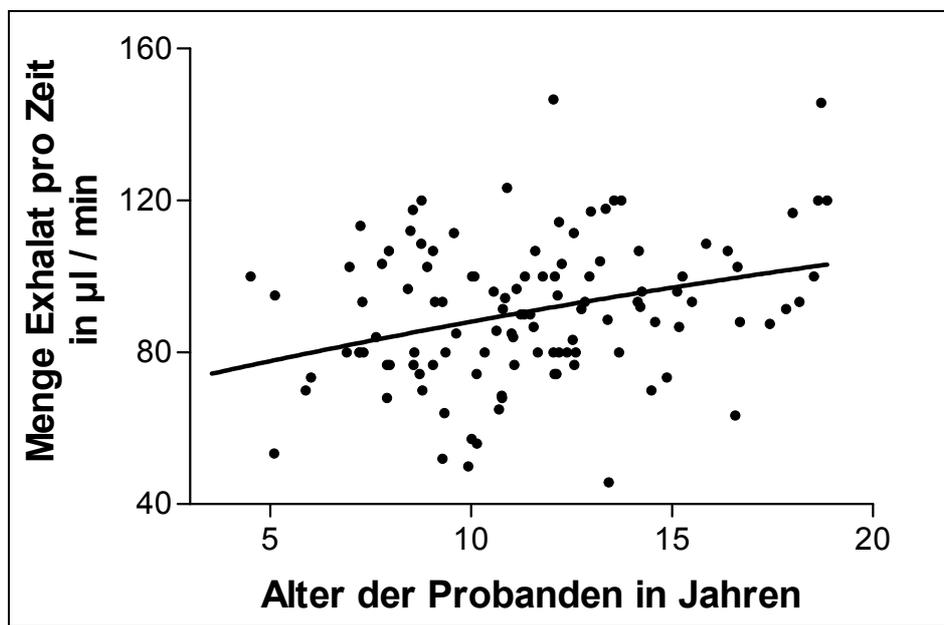


Abbildung 17 Menge Exhalat pro Zeit in $\mu\text{l}/\text{min}$ verglichen mit dem Alter der Probanden in Jahren

Bei der Überprüfung, ob die Kinder z.B. morgens mehr Kondensat produzieren als abends konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Tageszeitpunkt der Messung und der ausgeatmeten Menge Exhalat pro Zeit festgestellt werden (siehe Abbildung 18). Dies bestätigt die Korrelationsanalyse nach Pearson mit einem p von 0,29 und einem r von -0,10.

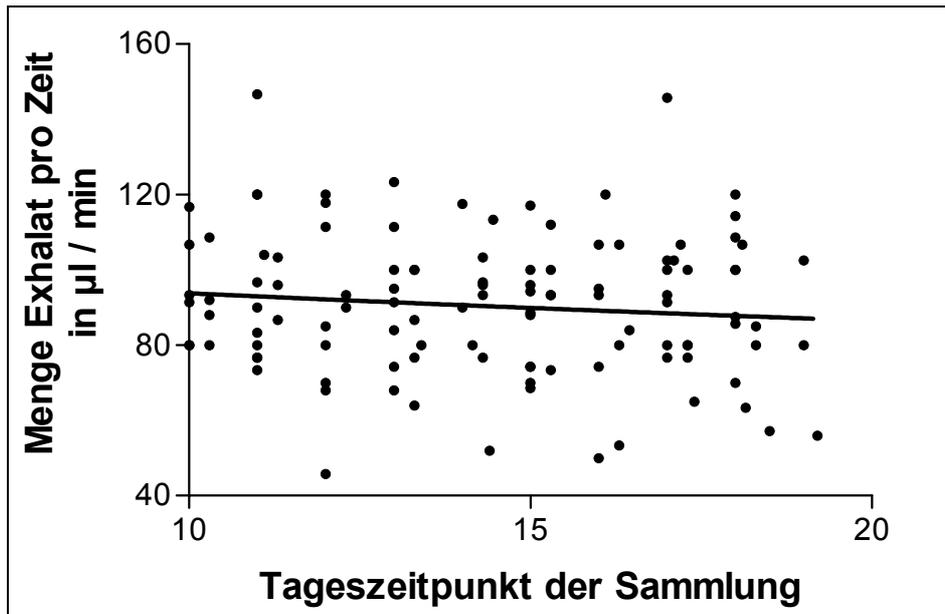


Abbildung 18 Menge Exhalat pro Zeit in µl/min verglichen mit der Tageszeit der Sammlung

Der Vergleich zwischen der gesammelten Menge Exhalat pro Zeit und der H_2O_2 -Konzentration zeigt (Abbildung 19), dass eine höhere Menge Exhalat keine Erhöhung der H_2O_2 -Werte nach sich zieht.

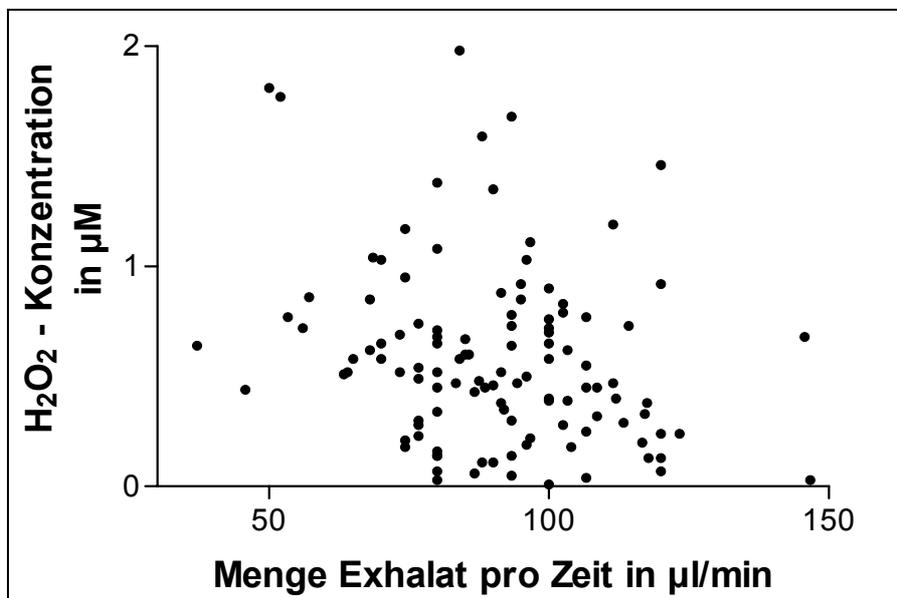


Abbildung 19 Menge Exhalat pro Zeit in µl/min verglichen mit den H_2O_2 -Werten in µM

3.2. NO

3.2.1. Referenzwerte

3.2.1.1. 117 Kinder

Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Die detaillierten Ergebnisse zur Untersuchung auf atopische Prädisposition sind unter 3.1.3.1. aufgeführt.

Referenzwerteerstellung der NO-Konzentrationen

Die orale NO-Konzentration in der Ausatemluft bei 184 ml/s betrug 5,7 ppb (4,3 - 7,9 ppb); n = 107. Die nasale NO-Konzentration war 1200 ppb (930 - 1400 ppb); n = 105. Die genauen Ergebnisse können Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 16 NO-Konzentrationen in ppb bei verschiedenen Ausatemflüssen

	NO nasal	NO 45 ml/s	NO 86 ml/s	NO 184 ml/s
Anzahl der Werte	105	33	33	107
25 % Perzentile	930	11	7,5	4,3
Median	1200	16	11	5,7
75 % Perzentile	1400	23	13	7,9
Mittelwert	1200	20	13	6,6
Standardabweichung	470	15	9,4	3,2
Standardfehler	46	2,5	1,6	0,31

Die Vergleiche der oralen NO-Werte bei den unterschiedlichen Expirationsflüssen 45 ml/s, 86 ml/s und 184 ml/s zeigen eine eindeutige Abhängigkeit der NO-Konzentration vom Ausatemfluss.

Je niedriger das Ausatemvolumen pro Zeit ist, desto höher wird der Gehalt an NO in der Ausatemluft (siehe Abbildung 20).

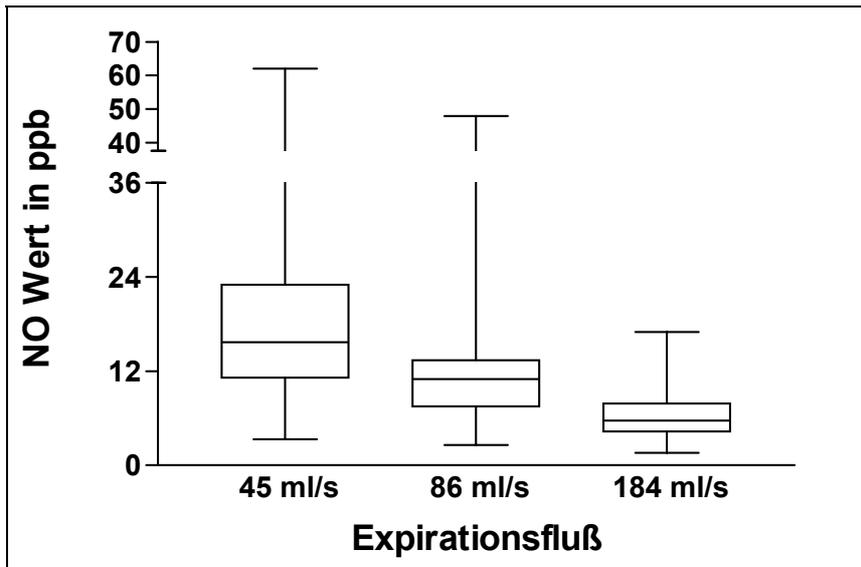


Abbildung 20 Zusammenhang zwischen Ausatemfluss und NO-Wert in ppb, angegeben ist Median, 25.-75.Perzentile, Minimum-Maximum

Bei Vergleichen zwischen den NO-Werten bei einem Ausatemfluss von 184 ml/s und 86 ml/s bzw. 184 ml/s und 45 ml/s zeigt sich eine eindeutige Korrelation (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Dadurch kann man erkennen, dass die geringere NO-Konzentration bei höheren Expirationsflüssen nicht durch Messfehler oder Unterschiede bei einzelnen Probanden bedingt ist, sondern dass bei jedem Probanden die unterschiedlichen NO-Werte bei verschiedenen Flüssen zueinander im Verhältnis stehen.

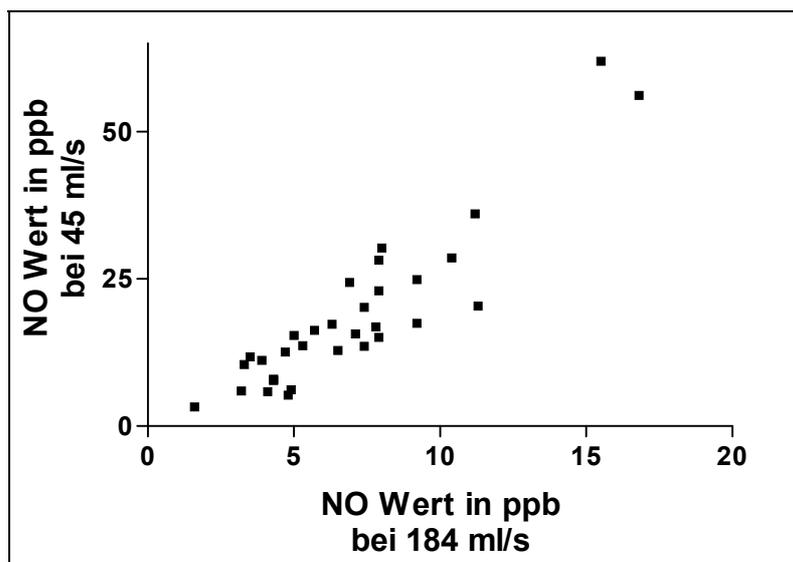


Abbildung 21 Korrelation zwischen der NO-Konzentration bei einem Fluss von 184 ml/s und einem Fluss von 45 ml/s

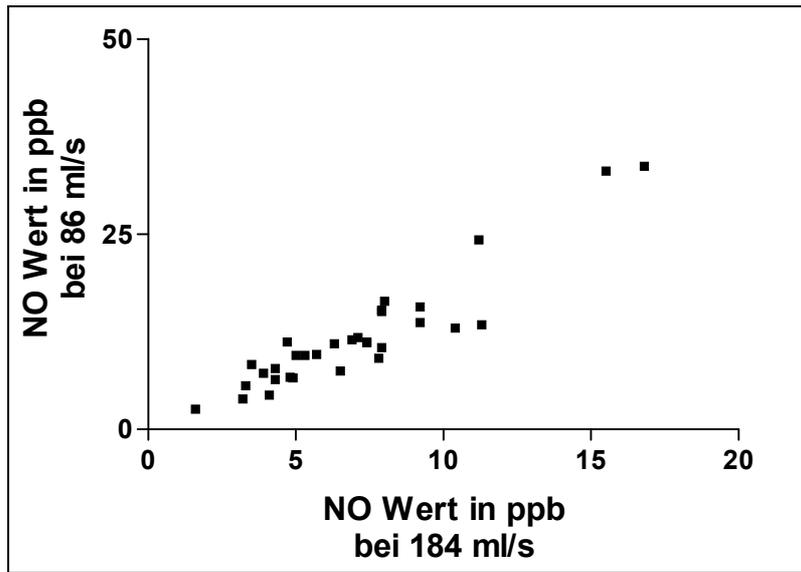


Abbildung 22 Korrelation zwischen der NO-Konzentration bei einem Fluss von 184 ml/s und einem Fluss von 86 ml/s

Sämtliche NO-Werte waren normalverteilt, exemplarisch an den Daten der nasalen Werte (Abbildung 23) dargestellt.

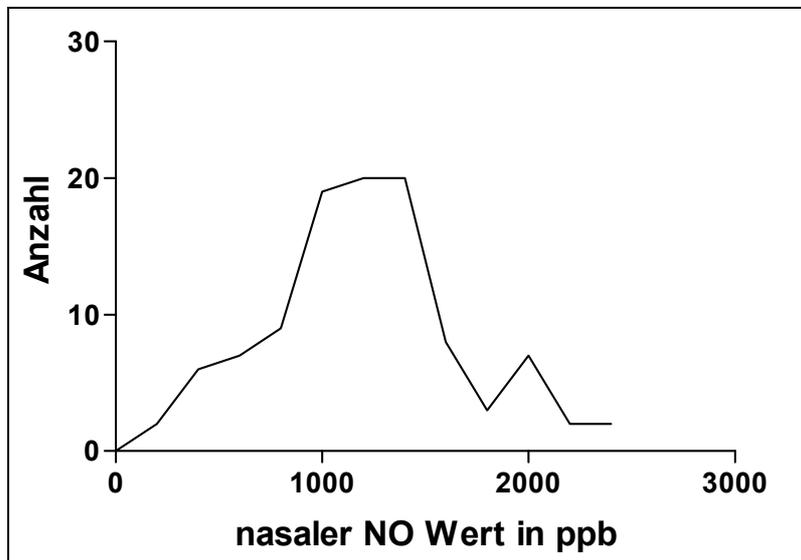


Abbildung 23 Verteilung der NO-Konzentrationen bei einem Fluss von 184 ml/s

Bei Vergleichen zwischen den nasalen NO-Werten und den oralen NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Expirationsflüssen ist keine Korrelation festzustellen, was hier

exemplarisch an den oralen NO-Werten bei einem Fluss von 184 ml/s dargestellt wird (siehe Abbildung 24).

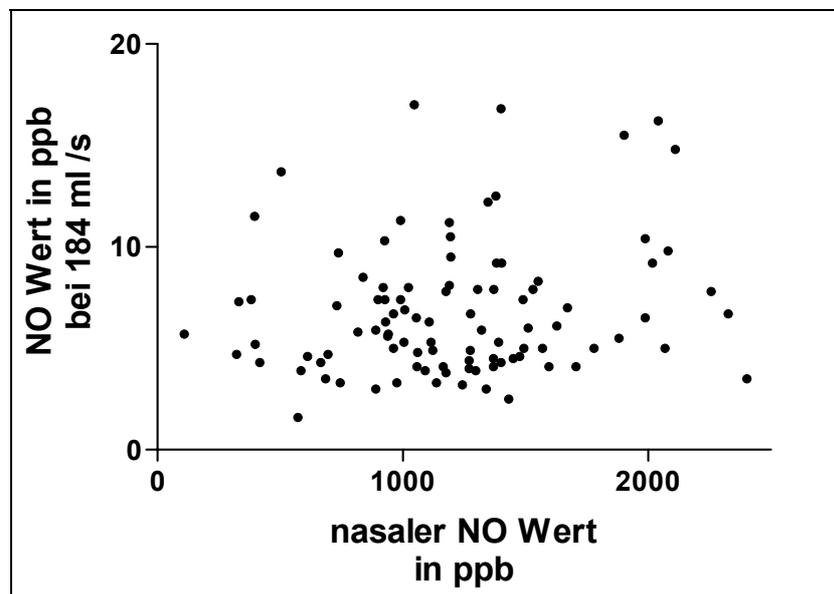


Abbildung 24 Vergleich der nasalen NO-Konzentrationen und der NO-Werte bei einem Fluss von 184 ml/s jeweils in ppb

Da sämtliche oralen NO-Werte miteinander korrelieren, werden alle weiteren Untersuchungen und Vergleiche der NO-Konzentrationen im folgenden nur noch mit den nasalen NO-Daten und den oralen NO-Werten bei einem Expirationsfluß von 184 ml/s (ab hier nur noch „orale NO - Konzentration“) durchgeführt.

Nun wurde geprüft, ob die NO-Konzentrationen durch äußere Einflüsse wie Umgebungsbedingungen, Außentemperatur, Wetter, Ozonwerte oder durch veränderte Messbedingungen wie falsche oder ungenaue Eichungen, menschliches Versagen oder Fehler an den Messgeräten an speziellen Tagen bei allen Probanden besonders hoch oder niedrig bzw. verfälscht waren. Dazu wurde die nasale NO-Konzentration und der orale NO-Wert mit dem Testdatum verglichen. Da die Probanden nach der Reihenfolge ihrer Messungen durchnummeriert wurden, ist die Probandennummer mit dem Messdatum gleichzusetzen.

In Abbildung 25 und Abbildung 26 sieht man jedoch eindeutig, dass zwischen den NO-Daten und dem Testdatum keine Korrelation zu erkennen ist. Auch sieht man keine Punktwolke, was auf gleich hohe Werte an bestimmten Tagen hingewiesen hätte.

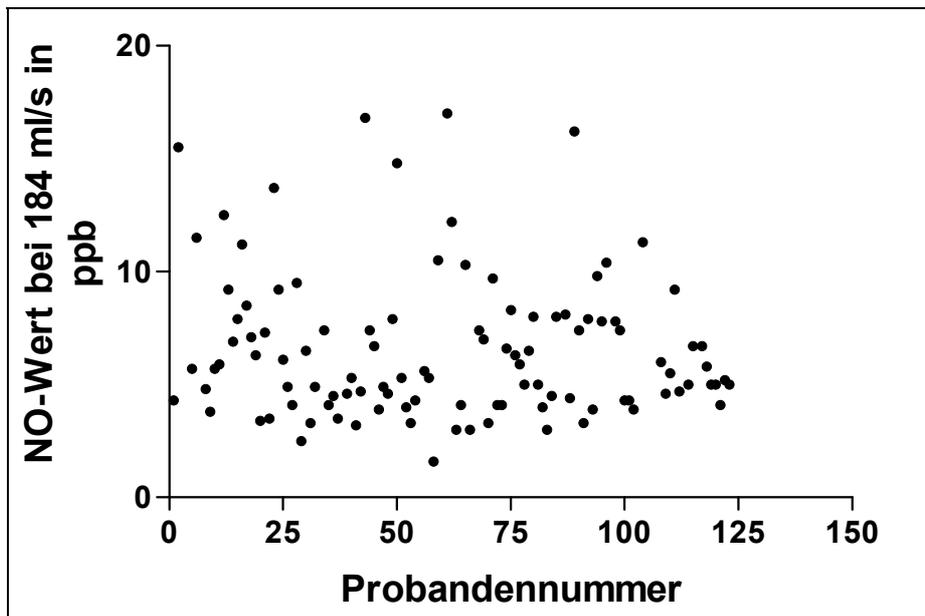


Abbildung 25 Vergleich der oralen NO-Konzentration mit dem Testdatum

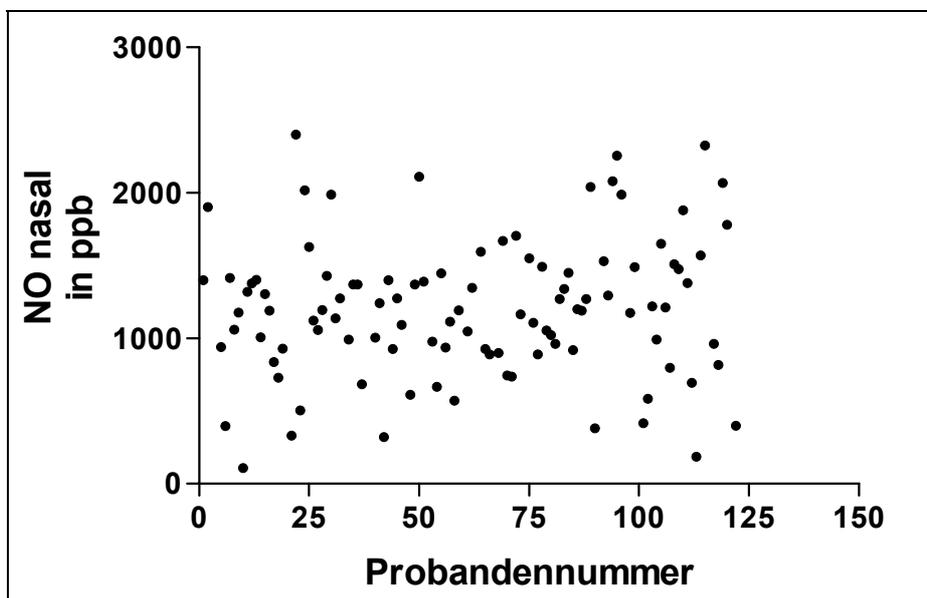


Abbildung 26 Vergleich der nasalen NO-Konzentration mit dem Testdatum

Um zu prüfen, ob Messveränderungen zu speziellen Uhrzeiten auftraten, wurden die NO-Werte und die Tageszeit der Messung verglichen. Da die Messzeiten nicht minütlich notiert wurden, sondern auf 10 Minuten gerundet, erscheinen die Diagramme zwar säulenförmig,

konkrete Veränderungen oder Häufungen von NO-Werten zu bestimmten Zeiten sind jedoch nicht zu bemerken (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

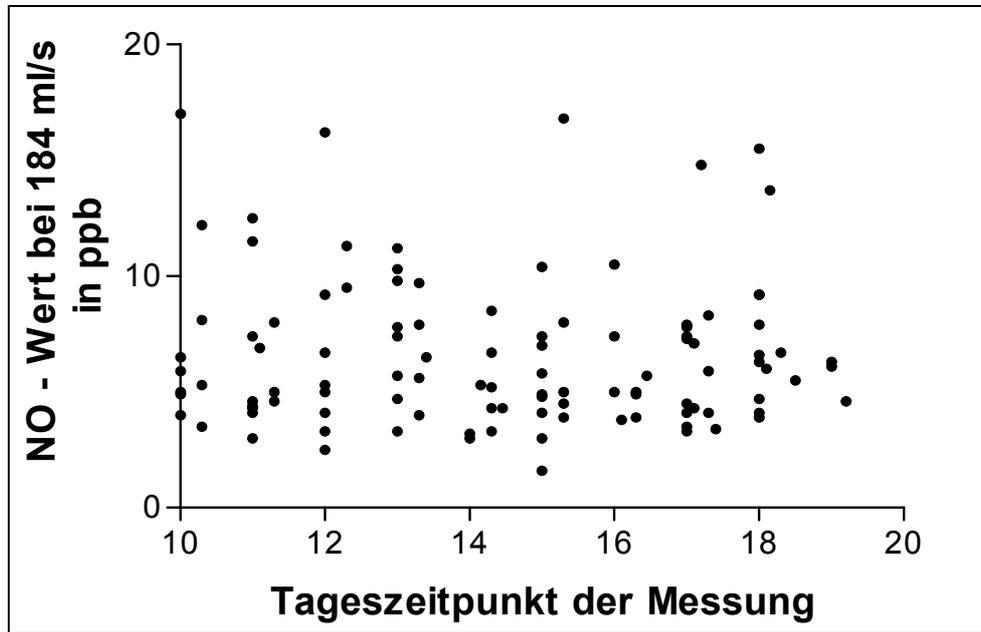


Abbildung 27 Vergleich der oralen NO-Konzentration mit der Tageszeit der Messung

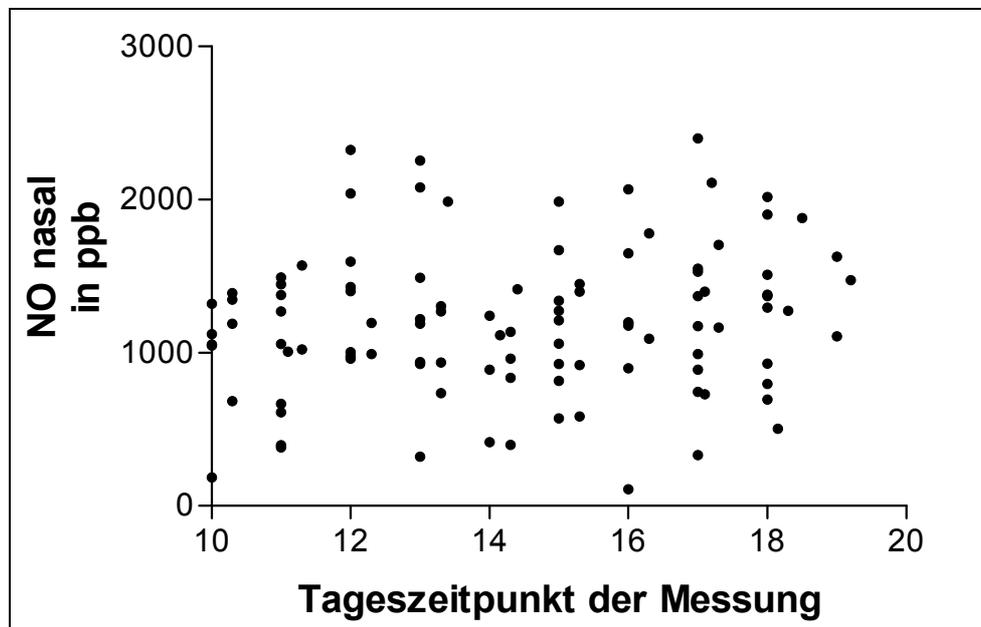


Abbildung 28 Vergleich der nasalen NO-Konzentration mit der Tageszeit der Messung

3.2.1.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Um zu überprüfen, ob verschiedene Faktoren wie Alter, Lungenfunktion (FEV1, MEF25), Geschlecht, Familienanamnese, Pricktestergebnis, saisonale Symptome oder Rauchexposition einen Einfluss auf die orale NO-Konzentration haben, wurde eine Multivarianz Regressionsanalyse mit den o.g. Variablen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 aufgeführt. Es konnte eine signifikante Altersabhängigkeit der NO-Konzentration (p-Wert 0,009) sowie eine Abhängigkeit der NO-Konzentration mit dem Auftreten von saisonalen Symptomen (p-Wert 0,02) festgestellt werden.

Tabelle 17 Ergebnisse der Multivarianz-Regressions-Analyse für die angegebenen Variablen und ihrem Einfluss auf den gemessenen NO-Wert. Der Einfluss der Variablen ist als zweiseitiger p-Wert angegeben.

	p-Wert der Multivarianzanalyse		Anzahl und Alter der Kinder in Jahre
Alter	0,009	Alter	107; 11,1
FEV1	0,42	FEV1	107; 11,1
MEF25	0,72	MEF25	107; 11,1
Geschlecht	0,28	Männlich	50; 10,5
		Weiblich	57; 11,8
Familienanamnese	0,98	Negativ	70; 12,1
		Positiv	37; 10,8
Pricktest	0,47	Negativ	58; 11,1
		Positiv	49; 11,2
Saisonale Symptome	0,02	Negativ	90; 10,9
		Positiv	17; 11,8
Rauchen	0,59	Negativ	92; 11,0
		Positiv	15; 12,5

3.2.2. Variabilität der NO-Konzentrationen

Bei den Messungen zur Variabilität der NO-Werte im Tagesverlauf und zur Gleichmäßigkeit über mehrere Tage hinweg gab es folgende Ergebnisse der NO-Konzentrationen bei den jeweiligen Probanden (siehe Tabelle 18 und Abbildung 29).

Tabelle 18 Übersicht über die oralen NO-Konzentrationen bei einem Expirationsfluß von 184 ml/s, angegeben ist jeweils - falls nicht anders bemerkt - die NO-Konzentration in ppb

Nummer der Probanden	01	02	03	04	05	06	07
Anzahl der Werte	15	17	18	17	14	17	17
25 % Perzentile	2,1	5,9	2,8	13	4,6	2,6	4,5
Median	2,6	6,6	3,2	15	5,0	3,2	4,7
75 % Perzentile	2,8	7,7	3,9	15	5,8	3,7	4,9
Mittelwert	2,4	7,8	3,4	15	5,2	3,2	4,8
Standardabweichung	0,67	4,0	0,71	3,8	1,3	0,86	1,2
Standardfehler	0,17	0,97	0,17	0,92	0,35	0,21	0,29
Variationskoeffizient	27 %	51 %	21 %	24 %	25 %	26 %	25 %

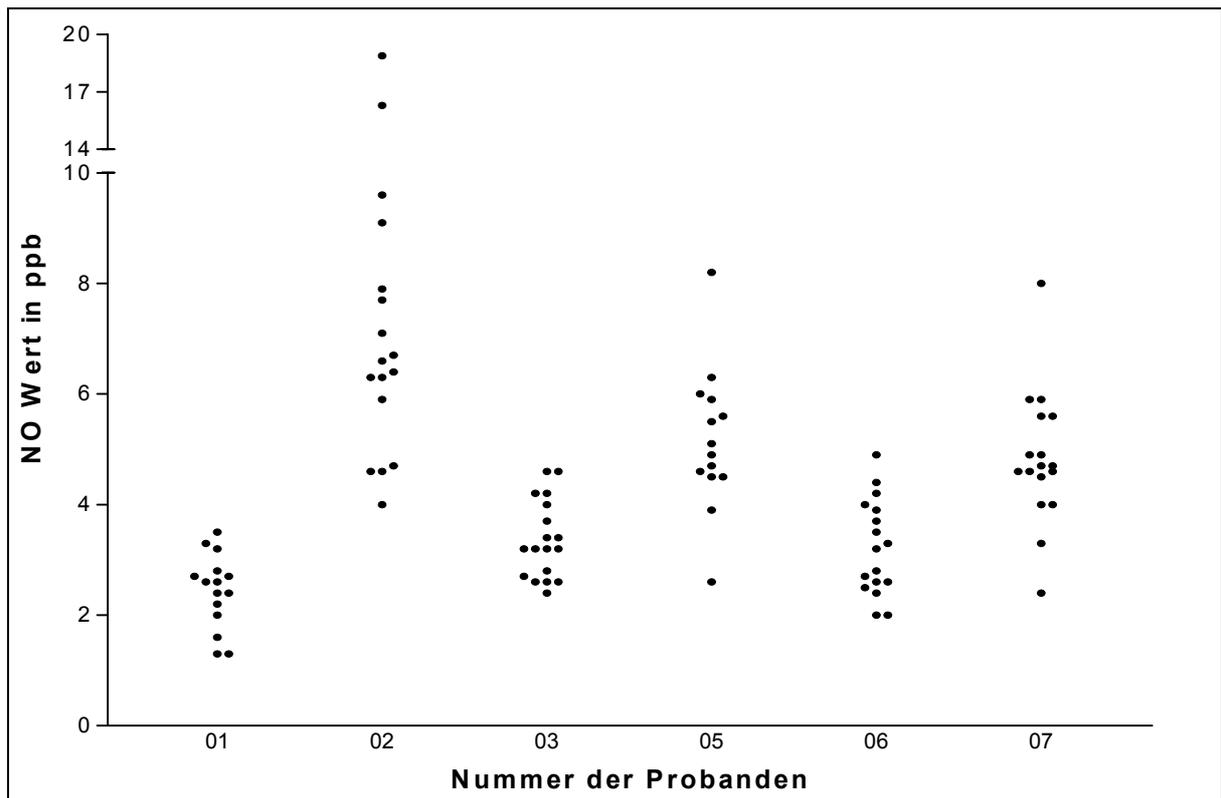


Abbildung 29 Darstellung aller Einzelmesswerte der jeweiligen Probanden, angegeben ist die orale NO-Konzentration in ppb bei einem Expirationsfluß von 184 ml/s

Um zu überprüfen, ob es starke Schwankungen am gleichen Messtag gab oder ob NO-Werte an bestimmten Tageszeiten immer höher ausfielen, wurden die NO-Konzentrationen aller Kinder in morgens, mittags und abends aufgeteilt und verglichen. Dabei stellte sich heraus,

dass die durchschnittlichen NO-Werte aller Kinder morgens, mittags und abends kaum differieren (Tabelle 19).

Tabelle 19 Aufteilung der oralen NO-Konzentrationen in ppb in morgens, mittags und abends

	morgens	mittags	abends
Anzahl der Werte	41	36	38
25 % Perzentile	3,3	2,7	3,3
Median	4,5	4,6	4,7
75 % Perzentile	7,1	5,7	6,3
Mittelwert	6,8	5,6	5,8
Standardabweichung	5,8	4,4	3,9
Standardfehler	0,90	0,74	0,64
Variationskoeffizient	85 %	79 %	67 %

Man erkennt allerdings, dass die Messwerte morgens stärker schwanken als mittags und diese wiederum stärker schwanken als die Abendwerte. Für diese stärkere Variation morgens gegenüber mittags und abends kann jedoch ein einzelner Proband (siehe Abbildung 30) verantwortlich gemacht werden, ohne dessen Daten die Schwankungsbreite weit weniger hoch ist (siehe Tabelle 20).

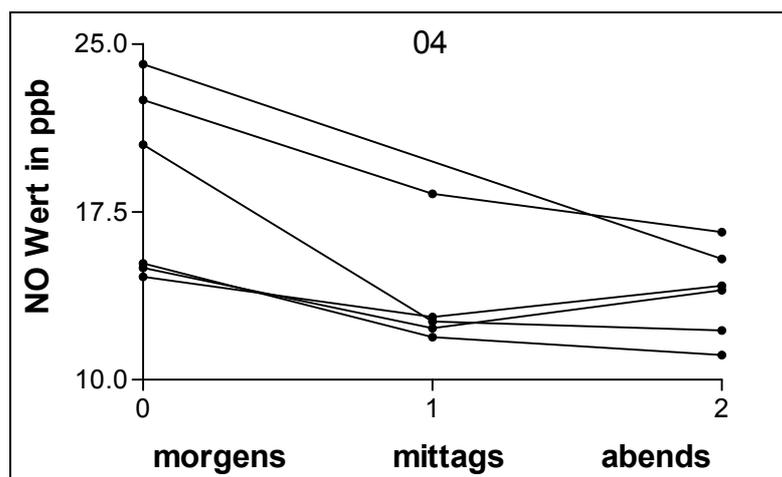


Abbildung 30 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 04, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

Tabelle 20 Aufteilung der oralen NO-Konzentrationen in ppb in morgens, mittags und abends ohne die Werte des Probanden 04.

Name der Probanden	morgens	mittags	abends
Anzahl der Werte	35	31	32
25 % Perzentile	3,2	2,6	3,0
Median	4,0	4,2	4,1
75 % Perzentile	5,2	4,8	5,9
Mittelwert	4,8	4,3	4,3
Standardabweichung	2,8	3,1	1,6
Standardfehler	0,47	0,55	0,29
Variationskoeffizient	59 %	71 %	38 %

In der Vergleichsdarstellung aller NO-Konzentrationen mit Linien an den einzelnen Messtagen zwischen den Werten von morgens, mittags und abends lässt sich auch nicht erkennen, dass zu bestimmten Tageszeitpunkten die Werte immer erhöht sind (siehe Abbildung 31).

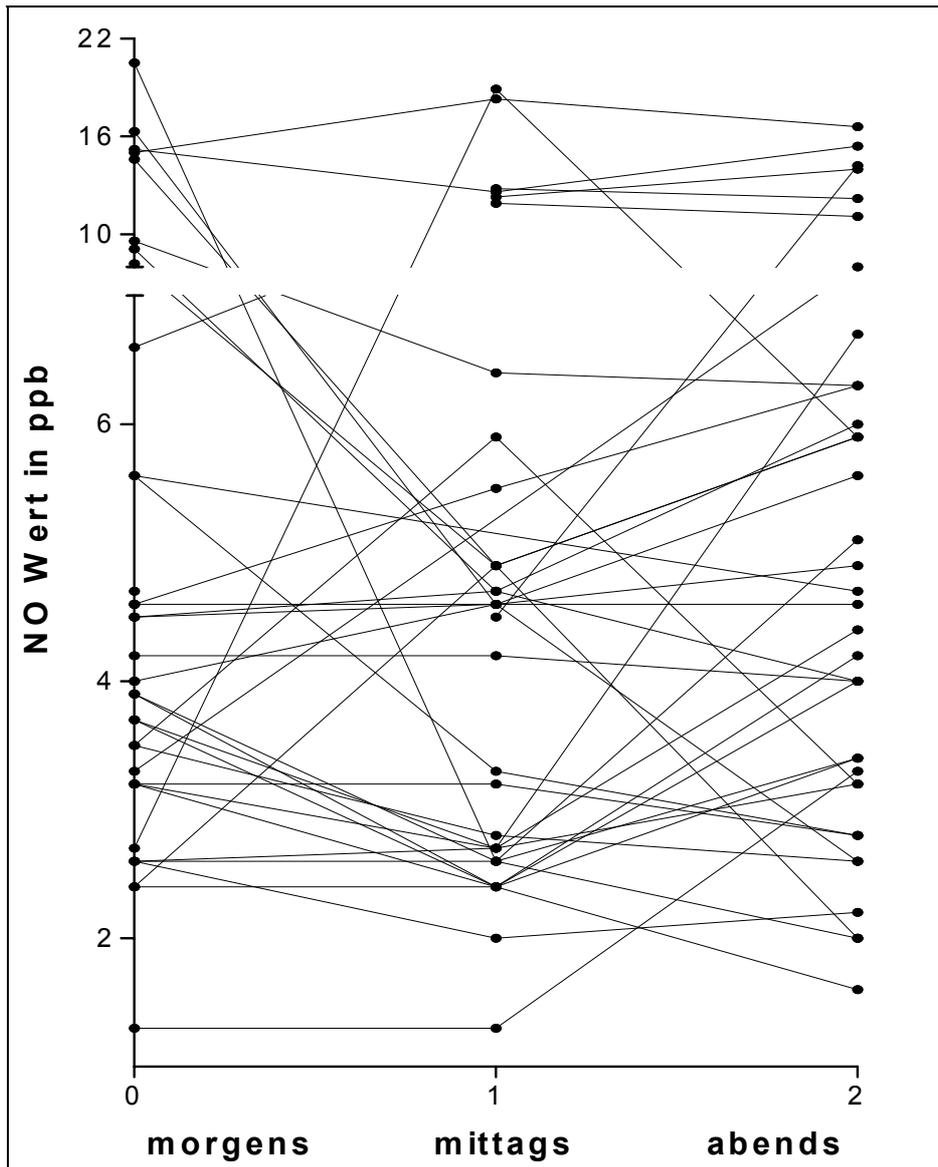


Abbildung 31 Darstellung aller NO-Werte in ppb sämtlicher Probanden. Die Werte, die am gleichen Tag gemessen wurden, sind jeweils durch Linien verbunden

Abschließend wurden zusätzlich noch sämtliche Einzelwerte aller Kinder dargestellt (Abbildung 32 - 37), um zu verdeutlichen, dass die NO-Konzentration unabhängig von der Tageszeit der Messung ist.

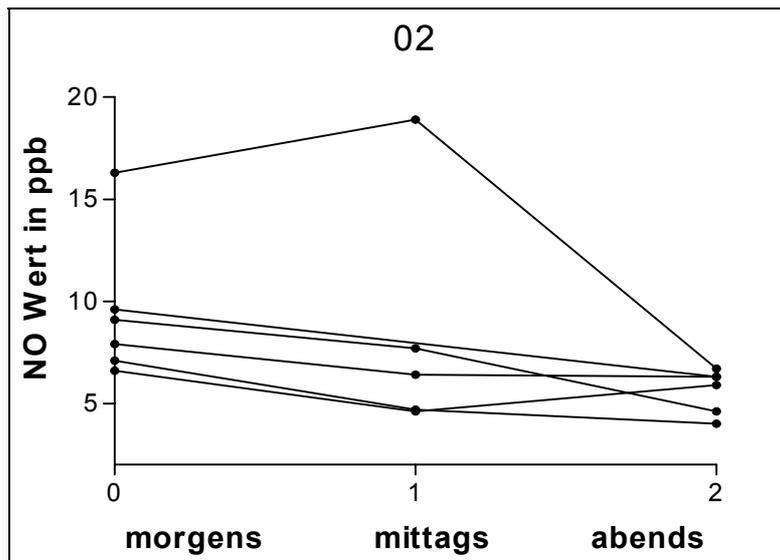


Abbildung 32 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 02, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

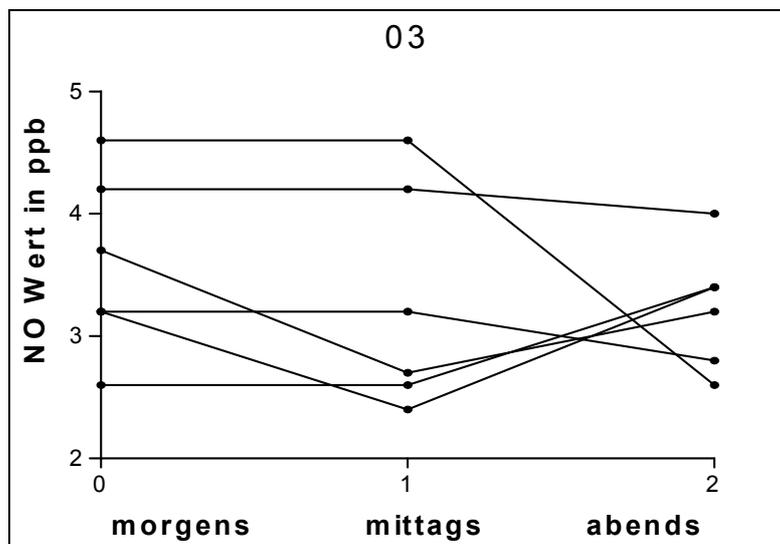


Abbildung 33 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 03, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

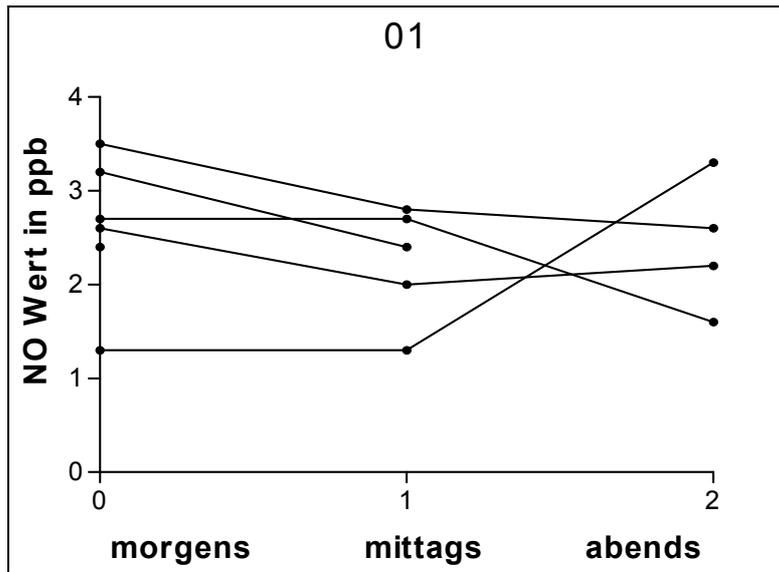


Abbildung 34 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 01, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

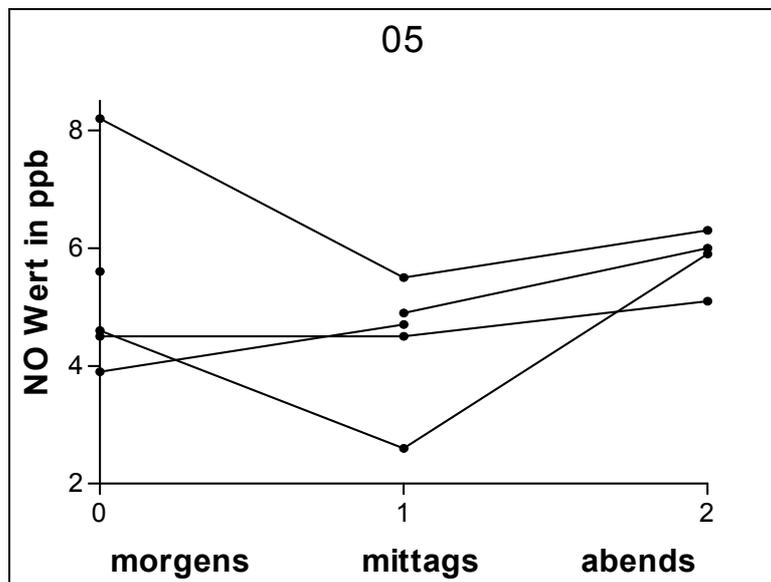


Abbildung 35 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 05, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

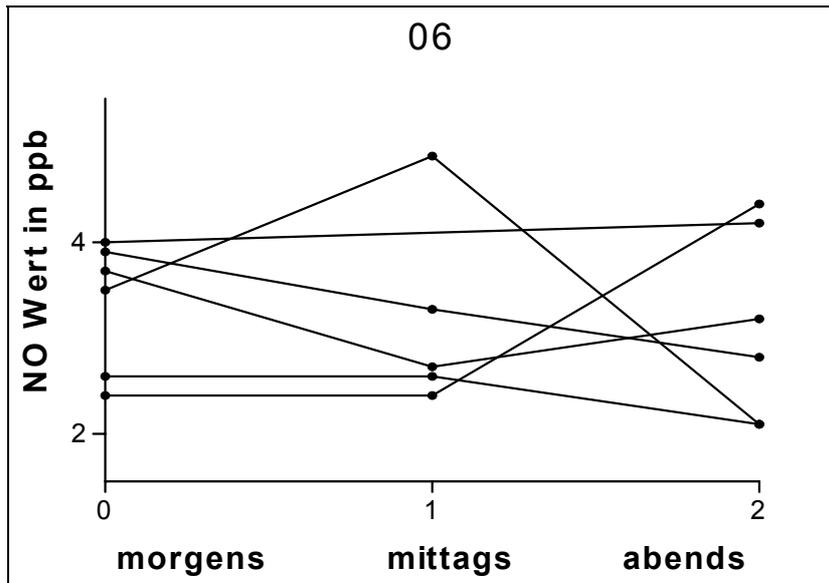


Abbildung 36 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 06, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

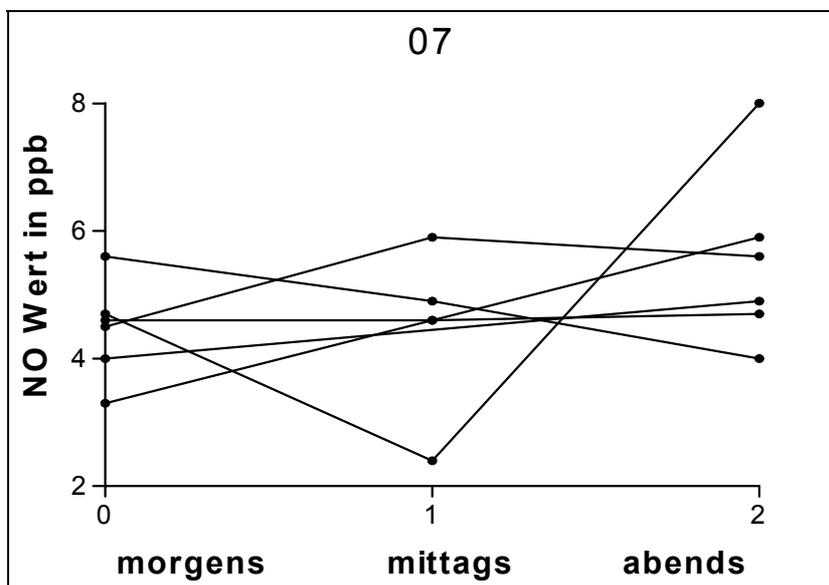


Abbildung 37 Darstellung der oralen NO-Konzentrationen des Probanden 07, aufgeteilt in morgendliche, mittägliche und abendliche Messwerte. Die Werte der einzelnen Tage sind jeweils durch Linien verbunden

Bei allen Kindern wurden Tests durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Mittelwertvergleiche zwischen morgens, mittags und abends statistisch signifikant unterscheiden. Bei zwei Kindern zeigt der statistische Test nach Friedman einen

signifikanten Unterschied (p von Proband 04 = 0,024; p von Proband 05 = 0,0046) zwischen morgens, mittags und abends (siehe auch Abbildung 30 und Abbildung 35), bei allen anderen Probanden gab es keine statistisch signifikante Differenz festzustellen. Die beiden Kinder hatten folgende Mittelwerte der NO-Konzentrationen in ppb :

Nummer	morgens	mittags	abends
04	19	14	14
05	5,4	4,4	5,8

3.2.3. NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Ausatemflüssen

Die Messung der NO-Konzentrationen bei verschiedenen Ausatemflüssen konnte die Theorie bestätigen, dass die Höhe des NO-Wertes vom Expirationsfluß abhängig ist. Dabei ergaben sich bei drei unabhängig voneinander mit verschiedenen Probanden durchgeführten Untersuchungen folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 21 und Abbildung 38)

Tabelle 21 Orale NO-Konzentrationen in ppb bei den entsprechenden Ausatemflüssen (k.M. = keine Messung)

Expirationsfluß	10 ml/s	20 ml/s	45 ml/s	86 ml/s	184 ml/s	237 ml/s
32 Kinder	k.M.	k.M.	16 (11 - 24)	11 (7,4 - 14)	6,7 (4,5 - 8)	5,5 (4,3 - 7,1)
13 Kinder	k.M.	19 (14 - 24)	12 (8,3 - 13)	9,2 (7,1 - 9,9)	5 (5 - 5,5)	5,5 (4,9 - 6,2)
20 Kinder	33 (24 - 40)	17 (12 - 22)	9,7 (7,6 - 13)	6,6 (4,9 - 8,8)	3,8 (2,9 - 6)	k.M.

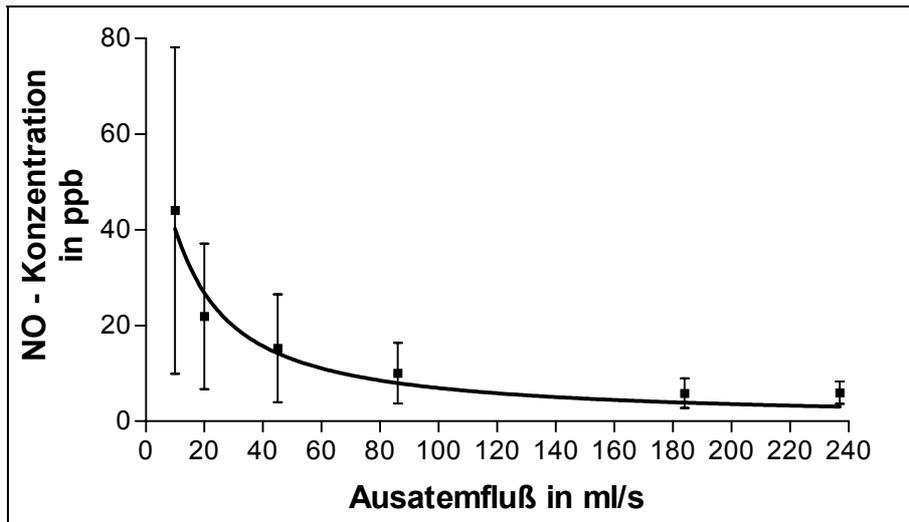


Abbildung 38 Darstellung der oralen NO-Konzentration in ppb in Abhängigkeit des Ausatemflusses angegeben ist jeweils Median und 5.-95.Perzentile

3.3. Nitrit

3.3.1. Referenzwerte

3.3.1.1. 117 Kinder

Die Nitritkonzentration im Exhalat der Kinder betrug 3,17 (2,63 – 3,82) μM , $n = 109$.

Die Nitritwerte waren normalverteilt (siehe Abbildung 39).

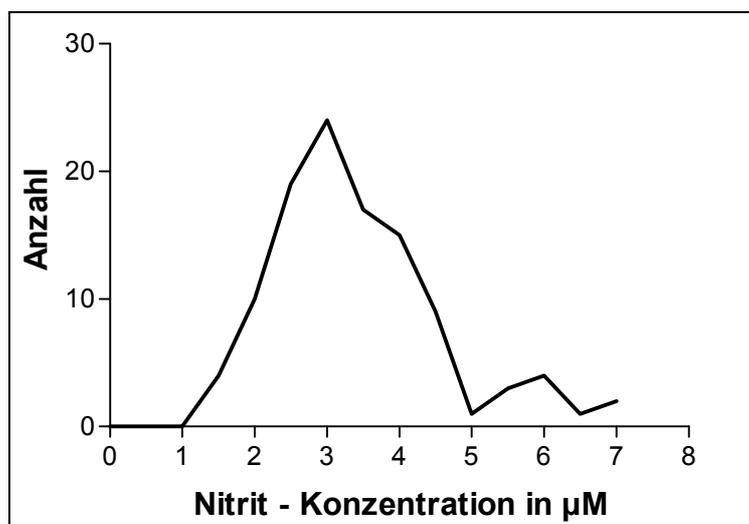


Abbildung 39 Darstellung der Verteilung der Nitritkonzentration

Um zu prüfen, ob der Gehalt an Nitrit im Kondensat der Kinder von der Tageszeit der Sammlung abhängig ist, wurde die Uhrzeit mit der Nitritkonzentration verglichen. Es ist keine Korrelation festzustellen (siehe Abbildung 40).

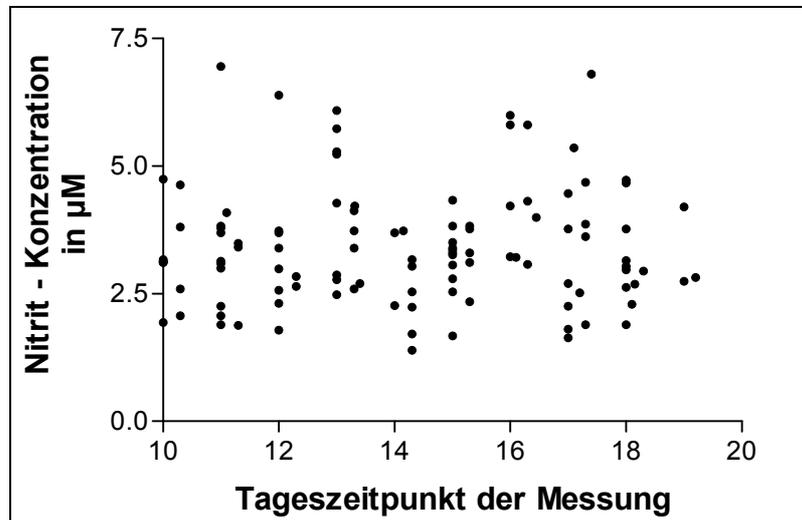


Abbildung 40 Vergleich der Nitritkonzentration in μM und der Tageszeit der Messung

3.3.1.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Um zu überprüfen, ob verschiedene Faktoren wie Alter, Lungenfunktion (FEV1, MEF25), Geschlecht, Familienanamnese, Pricktestergebnis, saisonale Symptome oder Rauchexposition einen Einfluss auf die Nitrit-Konzentration haben, wurde eine Multivariante Regressionsanalyse mit den o.g. Variablen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22 Ergebnisse der Multivarianz-Regressions-Analyse für die angegebenen Variablen und ihrem Einfluss auf den gemessenen Nitrit-Wert. Der Einfluss der Variablen ist als zweiseitiger p-Wert angegeben.

	p-Wert der Multivarianzanalyse		Anzahl und Alter der Kinder in Jahre
Alter	0,76	Alter	108; 11,3
FEV1	0,61	FEV1	108; 11,3
MEF25	0,67	MEF25	108; 11,3
Geschlecht	0,62	Männlich	53; 11,1
		Weiblich	55; 11,8
Familienanamnese	0,35	Negativ	72; 12,1
		Positiv	36; 10,3
Pricktest	0,002	Negativ	57; 11,5
		Positiv	51; 11,5
Saisonale Symptome	0,35	Negativ	89; 11,3
		Positiv	19; 12,2
Rauchen	0,52	Negativ	94; 11,4
		Positiv	14; 11,8

3.4. Korrelation von NO, Nitrit und H₂O₂

Zunächst wurde orales NO bei einem Expirationsfluß von 184 ml/s und die H₂O₂-Konzentration untersucht. Man sieht klar, dass diese beiden Entzündungsparameter nicht im Verhältnis zueinander stehen (siehe Abbildung 41).

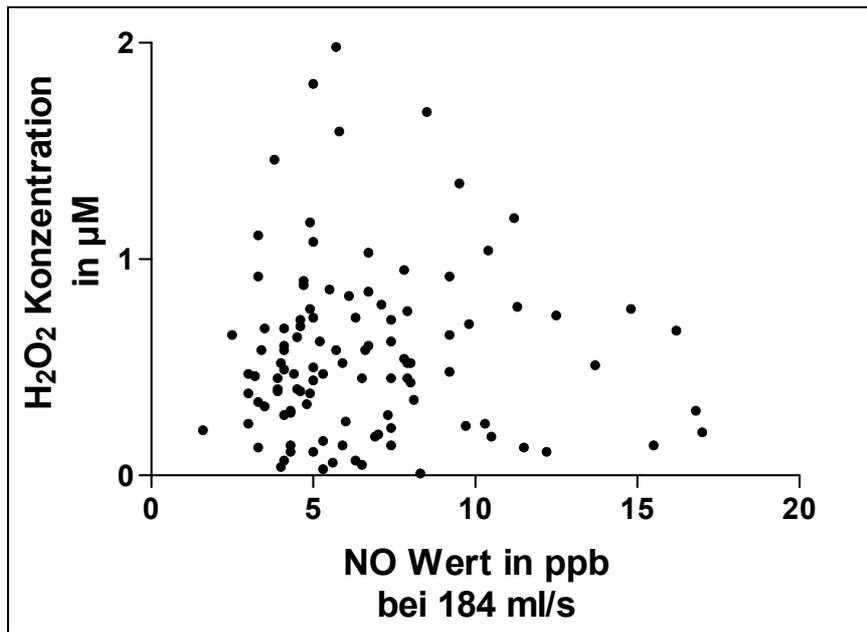


Abbildung 41 Darstellung der oralen NO-Konzentration in ppb und der H₂O₂-Konzentration in µM

Da H₂O₂ im Kondensat gemessen wurde, das auf nasalem Weg gesammelt war, wurde auch nasales NO mit H₂O₂ verglichen. In Abbildung 42 sieht man, dass auch hier keine Korrelation besteht.

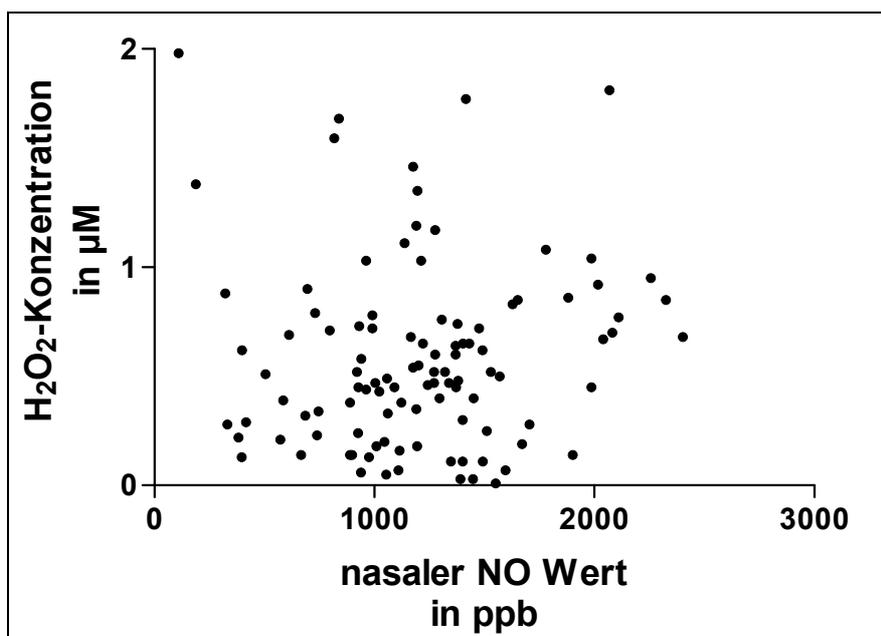


Abbildung 42 Darstellung der nasalen NO-Konzentration in ppb und der H₂O₂-Konzentration in µM

Analog zu H_2O_2 ist auch bei Nitrit keine Korrelation mit oralem NO (siehe Abbildung 43) oder nasalem NO (siehe Abbildung 44) festzustellen.

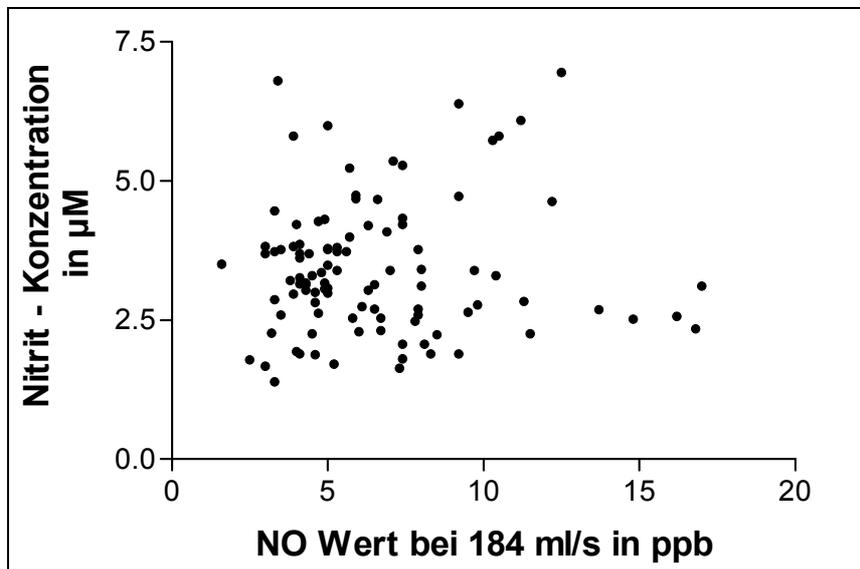


Abbildung 43 Vergleich der Nitritkonzentration in μM und der oralen NO-Konzentration in ppb

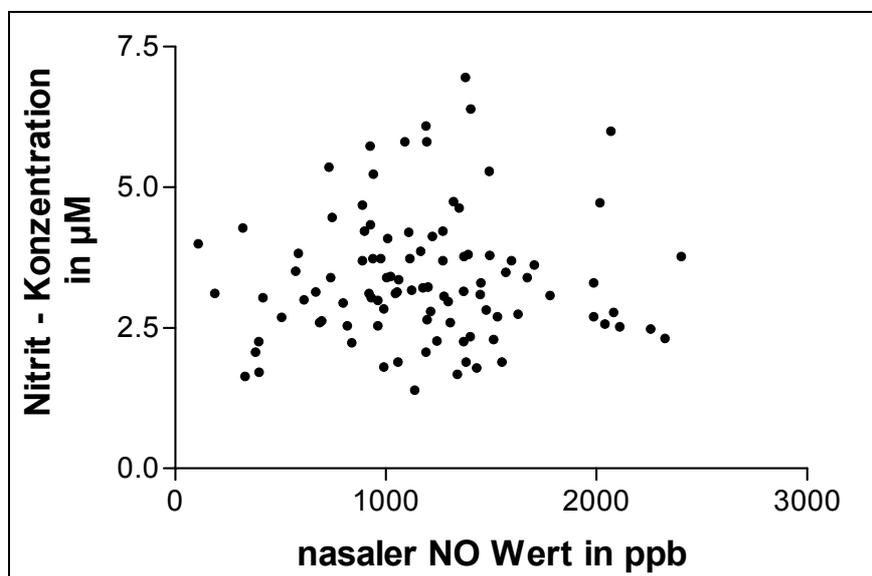


Abbildung 44 Vergleich der Nitritkonzentration in μM und der nasalen NO-Konzentration in ppb

Auch zwischen H_2O_2 und Nitrit im Exhalat konnte kein Zusammenhang gefunden werden (Abbildung 45), was durch ein Korrelationskoeffizienten r von 0,0075 bei einem p von 0,94 nach Pearson bestätigt wurde.

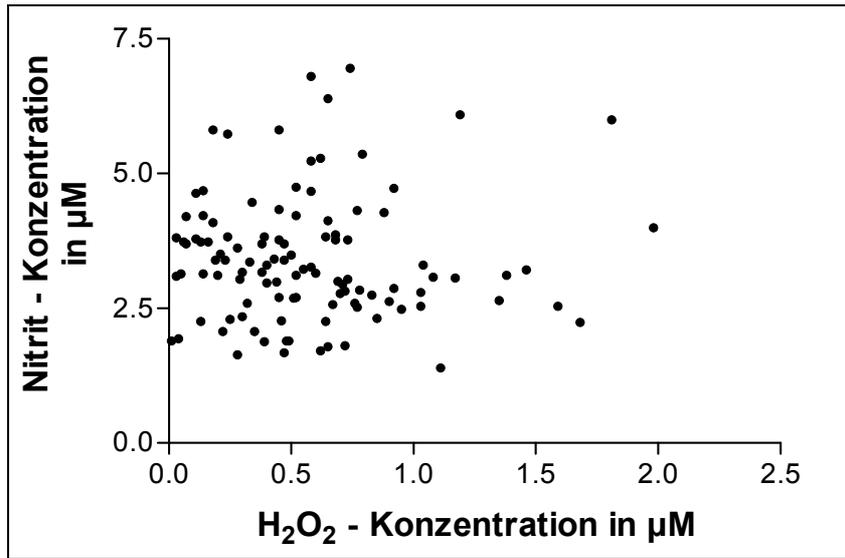


Abbildung 45 Vergleich der Nitritkonzentration in μM und der H_2O_2 -Konzentration in μM

4. Diskussion

4.1. H₂O₂

4.1.1. Sammelmethode des Exhalates

4.1.1.1. Absaugsystem

Die Sammelmethode mit dem neu eingeführten Absaugsystem funktionierte insgesamt hervorragend.

Bei der Kühlfalle musste man darauf achten, dass die Eisbeutel entsprechend lange vorgekühlt waren, da sich bei einigen Vorversuchen mit einer Gesamtsammeldauer von bis zu acht Stunden täglich die Kühlfalle gegen Ende etwas erwärmte und dadurch dann nicht mehr ganz so viel Exhalat gesammelt werden konnte. Nachdem dies bemerkt wurde, arbeiteten wir mit mehreren Kühlfallen, so dass konstante Sammelbedingungen herrschten.

Die Sammlung mit Ein- und Ausatmung durch die Nase wurde von den Probanden als sehr angenehm empfunden, da sie sich nicht darauf konzentrieren mussten, sondern einfach normal atmen konnten.

Bei Mundeinatmung und Nasenausatmung mussten sich die Probanden hingegen etwas mehr konzentrieren. Ein- und Ausatmung durch den Mund machte teilweise Schwierigkeiten. Aufgrund der kleinen Öffnung, in die sie hineinatmen sollten, ging ein großer Teil der Ausatemluft vorbei. Bei zu naher Haltung der Schlauchöffnung am Mund konnte leicht Speichel in den Schlauch geraten.

4.1.1.2. System mit Hineinatmen

Insgesamt funktionierte die Sammelmethode des Systems mit Hineinatmen nicht so gut wie die Methode mit dem Absaugsystem. Dies lag an folgenden Faktoren :

- ⇒ große Oberfläche der Schlauchinnenseite (es sammelte sich ein Teil des Exhalates dort)
- ⇒ die Probanden mussten gegen einen recht hohen Widerstand ausatmen, was zur Hyperventilation führte und nicht selten zu leichtem Schwindel nach einer gewissen Sammeldauer. Ein Proband musste sogar den Versuch abbrechen, da er sich unwohl fühlte.
- ⇒ es war ein hohes Maß an Konzentration erforderlich

⇒ Zudem kann die Hyperventilation der Probanden zu einer respiratorischen Alkalose und einer daraus folgenden Verfälschung der gemessenen Werte in der Ausatemluft führen. Die Oberfläche der Schlauchinnenseite konnte nicht verkleinert werden, da sonst der Widerstand des Schlauches weiter gestiegen wäre.

Vergleich der Sammelsysteme

Da es praktisch unmöglich ist, ein Sammelsystem zu konstruieren, bei dem beide Seiten dicht sind, hat man zum einen ein System, das am Mund abgedichtet ist (hier System mit Hineinatmen) und die Öffnung auf Seite der Sammelgefäße liegt. Dabei müssen die Probanden gegen einen Widerstand ausatmen, jedoch wird primär die gesamte Ausatemluft in die Kühlfalle geleitet.

Zum anderen kann man ein System bauen, das an der Ausatemstelle, an der das Exhalat gesammelt wird, nicht dicht ist (hier Absaugsystem), was zur Folge hat, dass nicht das gesamte ausgeatmete Exhalat in die Schläuche geleitet wird. Dafür kann die Ausatemluft passiv angesaugt werden und muss nicht von den Probanden aktiv in den Schlauch gepustet werden.

Wenn man beide Systeme vergleicht, kann man feststellen, dass das neue Absaugsystem dem System mit Hineinatmen weit überlegen ist. Die Sammlung von Exhalat an einer so großen Anzahl von Kindern und v.a. auch bei teilweise sehr jungen Kindern wäre ohne das Absaugsystem nicht möglich gewesen. Aber auch für Erwachsene stellt das neue System eine wesentliche Vereinfachung der Exhalatsammlung dar, da ohne große Anstrengung und Aufmerksamkeit geatmet werden kann. Die Probanden sind sogar in der Lage, nebenher z.B. etwas zu lesen.

Ein weiterer sehr großer Vorteil des neuen Systems ist, dass eine durch die respiratorische Alkalose verursachte Verfälschung der Werte in der Ausatemluft nicht befürchtet werden muss, da die Probanden eine normale Ruheatmung durchführen. Zwar atmet man beim Absaugsystem gegen den Sog der Pumpe (bei unserem Modell lag die Pumpleistung bei 11,5 ml/s) ein, dies ist jedoch nur bei einem Probanden negativ aufgefallen, da sich eine Öffnung der Sauerstoffbrille kurzfristig an der Nasenschleimhaut festgesaugt hat.

Wie die Versuche ergeben haben, lagen keine Unterschiede in der H_2O_2 -Konzentration oder in der gewonnenen Menge Exhalat pro Zeit vor, womit gezeigt werden konnte, dass beide Systeme vergleichbar sind.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Vorteile des Absaugsystems:

- ⇒ normale ruhige Nasenatmung möglich
- ⇒ keine Ausatmung gegen Widerstand, keine Hyperventilation
- ⇒ geringe Konzentration erforderlich
- ⇒ Nebenbeschäftigung (z.B. lesen) möglich

Gerade im Kinderbereich stellt die neue Sammelmethode mit dem Absaugsystem das Mittel der Wahl dar, wenn man unkompliziert Exhalat in der Ausatemluft von Patienten gewinnen möchte. Der Einsatzbereich dieser Sammelmethode erstreckt sich über das Kleinkind sogar bis hin zum Säugling, bei denen mit dem System mit Hineinatmen keine Sammlung durchgeführt werden kann.

4.1.2. Vorversuche zur Methode

4.1.2.1. Sammelmethode

Umgebungsluft

Die Sammlungen der Umgebungsluft wurden durchgeführt, um herauszufinden, wie hoch die H_2O_2 -Konzentration in der Luft ist und ob das Exhalat evtl. durch angesaugte Raumluft verunreinigt werden könnte.

Zur Sammlung von Luft über längere Zeit lässt sich feststellen, dass die Menge an Wasser, die dabei kondensiert wird, natürlich von mehreren Faktoren abhängt:

- ⇒ Luftfeuchtigkeit der Umgebungsluft
- ⇒ Menge angesaugter Luft pro Zeit, entspricht dem Ansaugdruck der Pumpe
- ⇒ Temperatur der Kühlfalle

Bei den durchgeführten Sammlungen der Umgebungsluft stellte anfänglich v.a. die Temperatur der Kühlfalle ein Problem dar, da sich die Eiskiste, in der die Sammelgefäße aufbewahrt waren, nach einer gewissen Zeit erwärmte. Drei Sammlungen wurden jedoch mit einer Kühlfalle durchgeführt, die über die gesamte Zeit die gleiche Temperatur gehalten hat, und auch bei diesen Sammlungen wurde kein Kondensat gefunden.

Die Menge angesaugter Luft war konstant, da immer mit Maschinen gleicher Pumpleistung gesammelt wurde.

Die Luftfeuchtigkeit der Umgebungsluft lag immer im Bereich der Luftfeuchtigkeit, die auch während der Probandensammlungen bestand (siehe 1.1.3.).

Die mittlere Menge H_2O_2 , die bei den Kindern gesammelt wurde, betrug $1,365 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$. Dieser Wert ergibt sich aus folgender Rechnung:

$(91 \mu\text{l} / \text{min} \text{ mittlere Exhalatmenge}) \times (30 \text{ min} \text{ mittlere Sammelzeit}) = 2730 \mu\text{l} \text{ mittlere Menge Exhalat pro Sammelzeit.}$

$(0,52 \mu\text{M} \text{ mittlere } \text{H}_2\text{O}_2\text{-Konzentration}) \times (2730 \text{ mittlere Menge Exhalat pro Sammelzeit}) = 1,365 \mu\text{mol} \text{ mittlere Menge } \text{H}_2\text{O}_2.$

Im Vergleich dazu war die Menge H_2O_2 , die einmal bei einer Sammlung der Umgebungsluft angefallen war, mit $0,078 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ (= $1 / 17$ der mittleren H_2O_2 -Menge bei den Probanden) so gering, dass sie keinen entscheidenden Einfluss auf die H_2O_2 -Konzentration haben kann.

Zudem wurde bei Sammlungen der Umgebungsluft die ganze Zeit über die Umgebungsluft direkt angesaugt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass man mit Sauerstoffbrille in der Nase und normaler Atmung entsprechende Ausatemluftflüsse in die Schläuche bzw. Einatemunterdrücke auf die Schläuche erzeugt, kann man davon ausgehen, dass die Umgebungsluft auf keinen Fall in einer solchen Menge angesaugt wird, dass man befürchten muss, dass aus der Umgebungsluft angesaugtes H_2O_2 die Messungen verfälscht.

Vergleich beider Nasenlöcher

Bei Sammlung mit nur einem Nasenloch lag die Menge des gesammelten Exhalates bei 57% der Menge bei Sammlung mit beiden Nasenlöchern. Die geringe Erhöhung gegenüber der theoretisch zu erwartenden 50% kann durch folgende Faktoren verursacht werden :

- ⇒ geringgradige Nasenseptumdeviation der Probanden und dadurch bedingt nicht genau gleich hohe Ausatemflüsse bei beiden Nasenlöchern
- ⇒ Unterschiede bei der Atmung, z.B. höheres Atemminutenvolumen bei bestimmten Versuchen
- ⇒ geringe Ungenauigkeiten bei Sammlung des Exhalates wie unterschiedliche Kühltemperatur der Gefäße oder Pipettierfehler

Nachdem die Sammlung mit abgedichteten Nasenlöchern das 2,65-fache an Exhalat gegenüber der Menge mit normaler Sauerstoffbrille ergibt, kann man nur vermuten, dass bei der Sammlung mit nicht abgedichteten Nasenschläuchen in etwa 40% der möglichen Exhalatmenge gesammelt wird.

Theoretisch lässt sich dazu folgende Rechnung aufstellen :

bei einem durchschnittlichen Atemminutenvolumen (AMV) eines Menschen von 360 l / h und einer relativen H₂O-Luftfeuchte bei 37 °C von 0,049 g / l ergibt sich eine Wasserabatemung von 17,6 ml H₂O pro Stunde.

Abzüglich 1,9 ml H₂O, die aufgrund der relativen Luftfeuchte bei 0 °C dem Kühlsystem wieder entweichen, ergibt sich ein potentielles Sammelvolumen von 15,7 ml H₂O / h.

Das mittlere Sammelvolumen der jugendlichen Probanden lag mit 5,4 ml H₂O / h bei 34 % der rechnerischen Maximalmenge und stimmt in etwa mit den 40 % überein, die mit abgedichteten Nasenschläuchen bei Erwachsenen erzielt wurden.

Die Vermutung, dass die H₂O₂-Konzentration unabhängig von dem Anteil der abgesaugten Ausatemluft ist, wurde durch die Versuche bestätigt.

Mehrere Sammelgefäße

Vergleich der H₂O₂-Konzentration im 1. und 2. Gefäß

Die H₂O₂-Konzentration im 2. Sammelgefäß ist deutlich erhöht, die gesammelte Menge jedoch weitaus niedriger als im 1. Gefäß. Vermutlich kondensiert ein relativ größerer Teil des Exhalates bereits im ersten Gefäß, sodass hier ein höherer Anteil an Kondensat gesammelt und die H₂O₂-Konzentration entsprechend niedriger ist. Diese Tatsache lässt sich nicht durch unterschiedliche Gefrierpunkte von H₂O (0°C) und H₂O₂ (-0,4°C) erklären, sodass diesen Überlegungen in weiteren Versuche noch nachgegangen werden könnte, um zu belegen, dass die Menge an Exhalat im ersten Gefäßen um den gleichen Faktor erhöht ist wie die Konzentration an H₂O₂ im zweiten Gefäß.

4.1.2.2. Messmethode

Vergleich von mit und ohne Enzymen eingefrorenem Kondensat bei - 70° C

Eine mittlere Veränderung von - 3,5 % gegenüber - 20 % ist ausreichend gewesen, um die Entscheidung zu fällen, in Zukunft bei allen Sammlungen die Enzyme sofort hinzuzugeben und dann erst einzufrieren.

Gerade die hohe Variabilität bei Messungen mit nach dem Auftauen hinzugegebenen Enzymen ist für Normwertbestimmungen nicht zufriedenstellend, auch wenn Jöbsis et al. berichteten, dass H₂O₂ in eingefrorenem Zustand bei - 20° C recht konstant sei. So wurde von dieser Arbeitsgruppe Exhalat von 5 Probanden in 4 Aliquots aufgeteilt, von einem wurde

sofort, bei den anderen nach entsprechender Zeit im eingefrorenen Zustand die H_2O_2 -Konzentration bestimmt. Dabei wurde bei einer H_2O_2 -Konzentration von $0,13 \pm 0,03 \mu\text{M}$ nach 48 Stunden $0,11 \pm 0,02 \mu\text{M}$, nach einer Woche $0,12 \pm 0,05 \mu\text{M}$ und nach einem Monat $0,13 \pm 0,02 \mu\text{M}$ gemessen (Jobsis et al.; 1998a).

Anzumerken ist, dass die Standardabweichungen der einzelnen Messungen doch erheblich sind und bei diesen niedrigen Konzentrationen gerade nach zwei Tagen (was unserem Versuchszeitraum entsprechen würde) auch Veränderungen von - 15 % auftraten.

Stabilität von H_2O_2 im Exhalat bei - 70° C nach Zugabe der Reaktionsenzyme

Die Ergebnisse sind insofern zufriedenstellend, da man sicher sein kann, dass bei einer Einfrierdauer von nicht mehr als drei Tagen die H_2O_2 -Konzentration nicht um wesentlich mehr als 10 % vom Ausgangswert schwankt. Auch bei diesen Messreihen stimmen die Ergebnisse nicht mit denen von Jöbsis et al. (Jobsis et al.; 1998b) überein, da bei uns eindeutig eine stärkere Schwankung mit längerer Einfrierdauer festzustellen war.

Wichtig ist die Stabilität von H_2O_2 im eingefrorenen Zustand insofern, als dass man dadurch die Möglichkeit hat, nur eine Standardkurve für mehrere Exhalatmessungen aufzustellen und nicht an jedem Sammeltag die H_2O_2 -Konzentration messen muss, bzw. eine Standardkurve erstellen muss.

Stabilität von H_2O_2 im Sammelgefäß ohne Zugabe von Enzymen

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 im Exhalat stabil ist und sich nicht verflüchtigt. Interessanterweise ist die H_2O_2 -Konzentration nicht nur konstant geblieben, sondern erhöhte sich sogar relativ rapide. Für dieses Phänomen konnten wir keine Erklärung finden, eine technische Ungenauigkeit oder ein menschlicher Messfehler kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Erhöhung über viele Versuche hinweg festgestellt werden konnte.

Stabilität der eingefrorenen Enzyme

Aufgrund der Versuche kann man davon ausgehen, dass die Enzyme bei - 20° C stabil sind.

Stabilität von H₂O₂ im Sammelgefäß mit Zugabe von Enzymen

Nach Zugabe der Enzyme stieg die H₂O₂-Konzentration in den Sammelgefäßen selbst bei Lagerung im Dunklen mit der Zeit an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass entweder die Reaktion von H₂O₂ mit Meerrettich-Peroxidase und para-Hydroxyphenylacetatsäure einige Zeit abläuft, bis sie zum Stillstand kommt, oder das fluoreszierende Produkt durch andere Stoffe verunreinigt wurde.

Da jedoch auch ohne Zugabe von Enzymen die H₂O₂-Konzentration im Sammelgefäß zunahm (bis auf einen Ausreißer war die Zunahme ohne Enzyme in etwa der mit Enzymen entsprechend), liegt es wohl nicht daran, dass die Reaktion sehr lange braucht bis sie zum Stillstand kommt. Zum einen wurde das Exhalat in einer reaktionsunfreundlichen Umgebung von 4° C und Dunkelheit aufbewahrt. Zum anderen war die starke Zunahme der Extinktion auch nach 45 Minuten Reaktionsdauer noch festzustellen.

Auch bei Belassen der Reagenzien unter dem Fluorometer und einer Dauermessung über eine bestimmte Zeit konnte immer eine Zunahme der Extinktion gemessen werden, sowohl bei Exhalat als auch bei der Erstellung der H₂O₂-Standardkurven.

Insgesamt muss man sagen, dass diese Zunahme der Extinktion ein sehr unbefriedigende Konstante bei der Erstellung von Normwerten darstellt. Bei unseren Versuchen sind wir zwar immer nach dem gleichen Schema und Zeitablauf vorgegangen, sodass Messfehler - sollten sie aufgetreten sein - systematisch wurden. Aufgrund der Tatsache, dass diese Zunahme der H₂O₂-Konzentration auch in anderen Laboren aufgetreten ist, müsste man die genauen Sammel-, Einfrier- und Messbedingungen allerdings für alle Kliniken und Labore standardisieren, um die entsprechenden H₂O₂-Konzentrationen untereinander vergleichen zu können.

Panus et al. konnten nachweisen, dass 50 % der Fluoreszenz bei H₂O₂-Messungen unabhängig von zugegebener Meerrettich-Peroxidase war. Da H₂O₂ alleine mit pHPA keine Exktinktionsänderung im Fluorometer erzeugen konnte, kamen die Autoren zum Schluss, dass noch eine stärker oxidativ wirkende Substanz für die Änderung verantwortlich sein könnte (Panus et al.; 1993b).

Interessanterweise war die Zunahme der Konzentration bei vorgefertigten H₂O₂-Standards noch um einiges höher als bei den Exhalatproben. Dadurch lassen sich vielleicht auch die teilweise sehr niedrigen H₂O₂-Werte bei einzelnen Arbeitsgruppen bzw. die Unterschiede sogar innerhalb einer Arbeitsgruppe erklären, wie es Tabelle 23 zeigt.

Tabelle 23 Übersicht über einige bisher veröffentlichten H₂O₂-Konzentrationen

Studie	mittlere H ₂ O ₂ -Konzentration (µM)	n Anzahl der Werte
(Antczak et al.; 1997c)	0,00001	10
(Nowak et al.; 1996b)	0,00005	27
(Kietzmann et al.; 1993)	0,04	10
(Jobsis et al.; 1997c)	0,13	93
(Dohlman et al.; 1993b)	0,25	11
(Loukides et al.; 1998b)	0,26	25
(Horvath et al.; 1998a)	0,27	35

Folgerungen aus den Vorversuchen für die Messmethodik

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sammlungen und Methoden zum Einfrieren von Exhalat und anschließende Messungen von H₂O₂ wurden auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. D.h. falls es durch Ungenauigkeiten verschiedenster Art oder durch falschen Versuchsaufbau zu unkorrekten Ergebnissen der H₂O₂-Konzentration gekommen ist, liegt hier ein systematischer Fehler vor, da alle Messungen mit diesem Fehler durchgeführt wurden. Da die in dieser Arbeit aufgeführten Sammel- und Messmethoden inzwischen zum Standard an unserer Klinik geworden sind, kann man die Werte untereinander gut vergleichen.

Nicht eindeutig zu erklären sind die Unterschiede zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen mit der gleichen Methode, bzw. sogar unterschiedliche Werte innerhalb einer Arbeitsgruppe über die Zeit (Jobsis 1996, 1997, 1998).

Insgesamt stellt sich die Frage, ob die gesamte Fragestellung mit Einfrieren, Auftauen des Exhalates, vor oder nach dem Einfrieren mit Enzymen versetzen etc. überhaupt notwendig ist bzw. warum man nicht einfach die H₂O₂-Konzentration sofort bestimmt. Dazu kann man sagen, dass die Erstellung einer Standardkurve relativ zeitaufwendig ist und es praktisch nicht möglich ist, an jedem Tag, an dem Exhalat gesammelt wurde eine neue Standardkurve zu erstellen. Aufgrund der Extinktionsunterschiede bei der Erstellung der Standardkurve

zwischen den einzelnen Messtagen (siehe 3.1.1.3) ist es jedoch erforderlich, an jedem Messtag eine eigene Kurve zu erstellen.

4.1.2.3. Reproduzierbarkeit

H₂O₂-Standardkurven

Es stellt sich die Frage, weshalb die Extinktionswerte zwischen den einzelnen Standardkurven so stark variieren (ein 1,5 µM H₂O₂-Standard hat an einem Tag einen gleich hohen Extinktionswert wie an einem anderen Tag ein 0,5 µM H₂O₂-Standard).

Dafür könnten folgende Faktoren in Frage kommen :

- ⇒ unterschiedliche Enzymwirksamkeit
- ⇒ Pipettierfehler
- ⇒ Messgeräteschwankungen zwischen den einzelnen Tagen
- ⇒ Ungenauigkeiten in der Vorgehensweise (z.B. Messung erst 4 Minuten nach Enzymzugabe und nicht 1 Minute)
- ⇒ Veränderung der vorgefertigten H₂O₂-Stammlösung
- ⇒ Beeinflussung der Reaktion durch andere Substanzen im Exhalat wie z.B. Nitrit
- ⇒ Beeinflussung der Reaktion durch Substanzen in der Umgebungsluft, die mit dem Exhalat reagieren könnten

Eine unterschiedliche Enzymwirksamkeit kann aufgrund der Vorversuche ausgeschlossen werden. Ebenso ist eine Veränderung der H₂O₂-Stammlösung auszuschließen, da die Konzentration nicht mit der Zeit kleiner wurde.

Da sehr genau und nach einem festen Schema gearbeitet wurde, können gröbere Pipettierfehler und Ungenauigkeiten in der Vorgehensweise ebenso vernachlässigt, jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Daher kann man annehmen, dass es zum einen einfach zu fluorometerbedingten Extinktionsschwankungen kommen kann, zum anderen das an verschiedenen Tagen unterschiedlich hohe NO in der Umgebungsluft vielleicht eine größere Rolle spielt als bisher angenommen (siehe unten und vgl. Abb. 66).

Inter - Assay - Koeffizient

Ein mittlerer Inter-Assay-Koeffizient von 31 % stellt eine recht hohe Ungenauigkeit dar. Aufgrund der Unterschiede zwischen den einzelnen Standardkurven kann man jedoch nicht mit Sicherheit behaupten, dass diese hohe Schwankung in der H_2O_2 -Konzentration selbst bei denselben Probanden H_2O_2 als Entzündungsmarker untauglich werden lässt. Man sollte allerdings sehr gewissenhaft abklären, wodurch genau diese Schwankung zustande kommt, bevor man H_2O_2 als Entzündungsparameter für klinische Test verwendet. Wie schon unter 3.1.1.2. Messmethode aufgeführt wurde, kamen bei anderen Arbeitsgruppen nicht nur ähnliche, sondern sogar noch stärkere Schwankungen vor.

Hinzuzufügen ist noch, dass der Inter-Assay-Koeffizient nicht bei allen Probanden so hoch war, vier Probanden liegen mit einem Koeffizient von 10 - 15 % in einem völlig normalen Bereich.

Intra - Assay - Koeffizient

Der Intra-Assay-Koeffizient ist mit einem mittleren Wert von 6,5 % als akzeptabel anzusehen. Dieser Wert war nicht nur bei der Bestimmung der Extinktion von Standardwerten so niedrig, sondern in der Regel auch bei der Messung von Exhalat.

4.1.3. Versuche zum Sammelsystem und zur Art der Atmung

4.1.3.1. Vergleich des Einflusses der Stelle der Exhalatentnahme

Wie zu erwarten war, hat der Ort der Exhalatentnahme (Nase verglichen mit Mund) als auch die Sammelmethode (Absaugen verglichen mit Hineinatmen) unter normalen Bedingungen keinen größeren Einfluss auf die H_2O_2 -Konzentration. Dies könnte sich jedoch durch pathologische Bedingungen wie z.B. einen Infekt der Atemwege ändern.

Wichtig ist, dass beim Sammelsystem mit Hineinatmen bei Mund- und Nasenatmung zwei Wertepaare als Ausreißer gestrichen wurden, da die Extinktion der Werte bei Nasenatmung außerhalb des messbaren Bereichs lagen, was eine H_2O_2 -Konzentration von mindestens $6,0 \mu\text{M}$ zur Folge gehabt hätte. Man kann nur vermuten, dass bei diesen Versuchen Speichel, der bekanntermaßen hohe Konzentrationen an H_2O_2 enthält, mit in die Sauerstoffbrille gelangt war.

4.1.3.2. Rolle der Einatmung

Die H_2O_2 -Konzentration ist erwartungsgemäß unabhängig von der Einatmung. Es wäre sehr erstaunlich, wenn eine andere Art der Einatmung eine Mehrproduktion oder Freisetzung von H_2O_2 zur Folge hätte.

Bei diesen Versuchen ist jedoch bemerkenswert, dass bei Mundausatmung und System mit Hineinatmen im Vergleich zu Nasenausatmung und Absaugsystem immer eine höhere H_2O_2 -Konzentration aufgetreten war. Dies ist umso erstaunlicher, als fast alle Versuche der gleichen Probanden am selben Tag durchgeführt wurden.

Als einzige Erklärung für dieses ungewöhnliches Ergebnis kann man nur die unterschiedliche Art der Exhalatsammlung anführen (siehe dazu auch 3.1.1. Sammelsystem), auch wenn die Versuche zum Vergleich zwischen Sammelsystem und System mit Hineinatmen keinen Unterschied zwischen den Sammelsystemen zeigen konnten. Es könnte weiterhin spekuliert werden, dass eine unterschiedliche Anfeuchtung der Atemluft und damit frühere oder spätere Wasserdampfsättigung sich auch auf den Gehalt an H_2O_2 im Exhalat auswirkt.

4.1.3.3. Menge Exhalat pro Zeit

Man kann davon ausgehen, dass die Art der Einatmung keinen Einfluss auf die ausgeatmete Menge Exhalat pro Zeit hat, da keine signifikanten Unterschiede zwischen Nase- und Mundeinatmung existierten.

Bei der Ermittlung der Referenzwerte wurden die Kinder dennoch dazu angehalten, möglichst durch die Nase zu atmen, damit eine einheitliche Methode über die gesamte Versuchsreihe durchgehalten wurde. Allerdings wurden die Versuche aufgrund der oben beschriebenen Tatsache nicht abgebrochen, wenn ein Kind mal durch den Mund eingeatmet hatte.

4.1.4. Referenzwerte

4.1.4.1. 117 Kinder

Es ist für die mögliche zukünftige Verwendung im klinischen Gebrauch sehr bedeutungsvoll, dass die H_2O_2 -Konzentration nicht vom Alter und vom Tageszeitpunkt der Sammlung abhängig ist, da man so über alle Altersgruppen hinweg Vergleiche anstellen kann und sehr flexibel während eines ganzen Tages Exhalat der Kinder sammeln kann, somit nicht auf eine bestimmte Tageszeit angewiesen ist.

Da H_2O_2 z.B. bei Asthmatikern erhöht ist (Jobsis et al.; 1997a) wäre es in diesem Zusammenhang sehr interessant, ob dabei eine zirkadiane Rhythmik festzustellen ist, ob etwa im Laufe der Nacht, während der Asthmatiker meist eine Verschlechterung der Lungenfunktion zeigen, auch eine Erhöhung der H_2O_2 -Werte zu messen ist.

An einigen Tagen war die H_2O_2 -Konzentration stark erniedrigt gegenüber den anderen Sammeltagen. Dafür kommen prinzipiell folgende Fehlerquellen in Betracht :

- ⇒ Vorbereitung der Sammlung (Kühlung der Sammelgefäße, Art der verwendeten Sauerstoffbrillen, Behandlung der Sammelgefäße - v.a. abgesättigt bzw. nicht abgesättigt, Art der Sammelgefäße)
- ⇒ Sammlung an sich (Art und Dauer der Sammlung, Umgebungsbedingungen)
- ⇒ Behandlung des gesammelten Exhalates (unterschiedliche Zeit bis zum Einfrieren, Einfrieren bei anderen Temperaturen, Ausfall des Tiefkühlgefäßes)
- ⇒ Messmethode der H_2O_2 -Konzentration (verwendete Enzyme, Pipettierfehler, Erstellung der Standardkurve, zeitliche Durchführung der Messung)
- ⇒ Beeinträchtigung des fluorometrischen Signals durch andere Substanzen

Fehler bei der Sammlung und Messung können als relativ unwahrscheinlich angesehen werden, da dies über 140 mal durchgeführt wurde und vermutlich nicht an einigen Tagen genau gleich falsch gemacht wurde. Daher muss man spekulieren, dass die fluorometrische Reaktion durch bestimmte Störquellen beeinträchtigt werden kann.

Gegen eine direkte Reaktion von H_2O_2 mit NO spricht die Arbeit von Ischiropoulos et al. (Ischiropoulos et al.; 1996). Allerdings konnte diese Arbeitsgruppe auch zeigen, dass Peroxynitrit und NO die Bestimmung von H_2O_2 beeinträchtigen können, da NO mit

Compound I und/oder II der Reaktion von H_2O_2 , Meerrettich-Peroxidase und pHPA reagieren kann. So kann es bei erhöhter Anwesenheit von NO während der Messungen zu niedrigeren H_2O_2 -Konzentrationen kommen.

Aufgrund dieser Vermutung wurde die H_2O_2 -Konzentration mit der NO-Konzentration der Umgebungsluft verglichen, die bei einer Untergruppe von 102 Kindern an den jeweiligen Sammeltagen gemessen wurde. Es konnte im Spearman-Test eine signifikante ($p < 0,0001$) negative Korrelation beider Werte festgestellt werden mit einem Korrelationskoeffizienten $r = -0,50$ ($-0,638$ - $-0,336$; $n = 102$). Obwohl es leicht zu negativen Korrelationen kommen kann, zeigt Abbildung 46, dass die Werte in gewisser Weise abhängig voneinander sind.

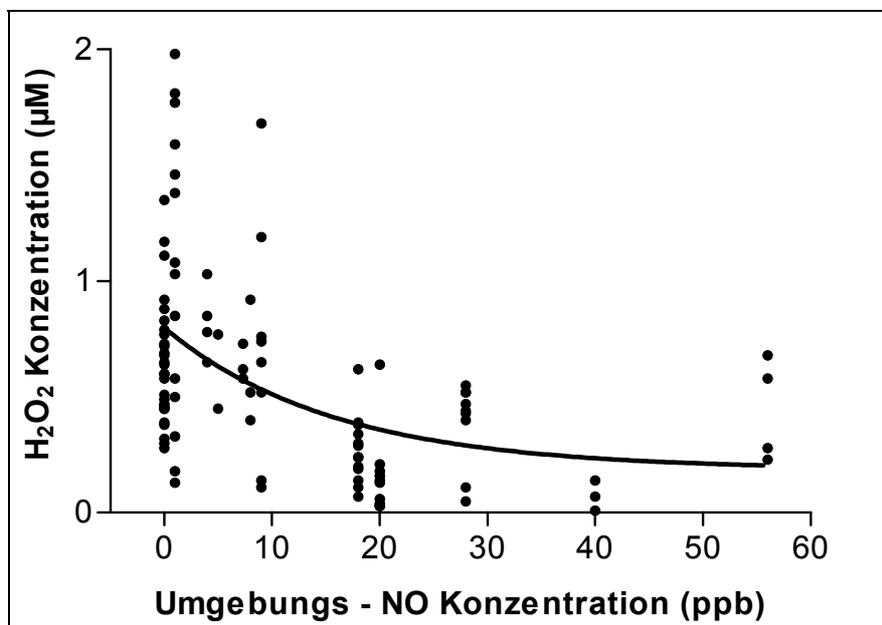


Abbildung 46 Darstellung der Korrelation zwischen der H_2O_2 -Konzentration in μM und des Gehaltes von NO in der Umgebungsluft gemessen in ppb

Somit könnte als Quelle des Störfaktors der Reaktion von H_2O_2 mit Meerrettich-Peroxidase und pHPA die erhöhte NO-Konzentration in der Umgebungsluft in Frage kommen. Dies zeigt auch signifikante Unterschied der H_2O_2 -Konzentration zwischen Tagen mit einer NO-Konzentration in der Umgebungsluft von mehr als 10 ppb und Tagen von weniger als 10 ppb (Mann-Whitney p-Wert $< 0,0001$). So ergibt sich an Tagen mit erhöhtem NO in der Umgebung eine H_2O_2 -Konzentration von $0,23$ ($0,12$ - $0,41$; $n = 39$) ppb gegenüber $0,65$ ($0,46$ - $0,9$; $n = 63$) ppb bei einem Umgebungs-NO von weniger als 10 ppb (siehe Abbildung 47).

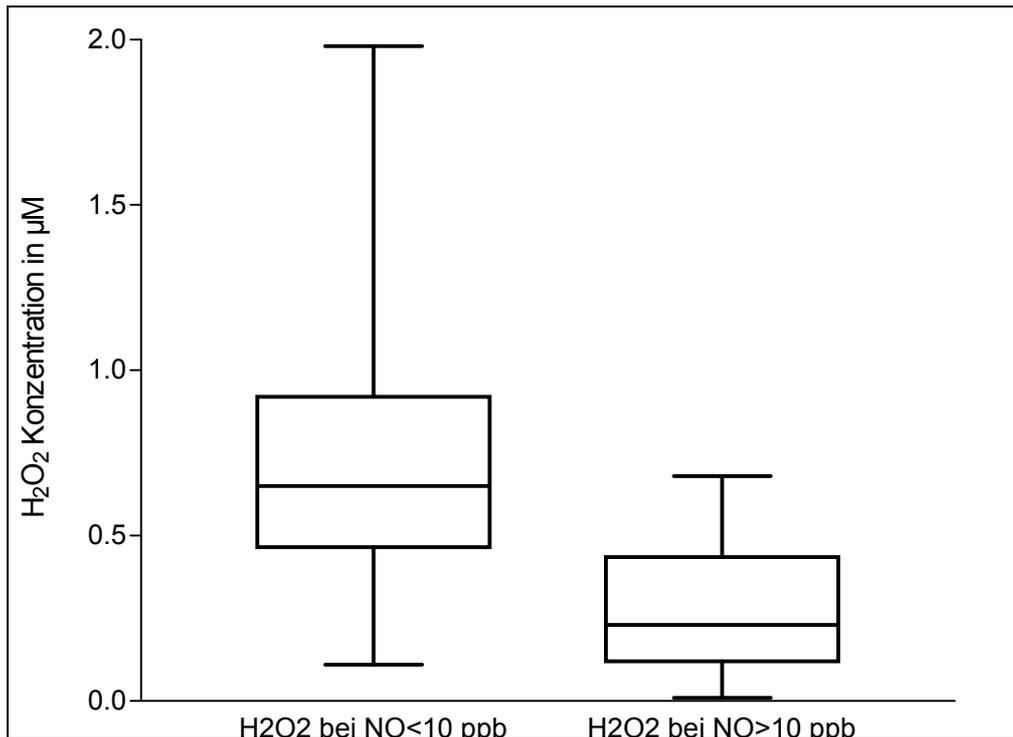


Abbildung 47 H₂O₂-Konzentration in µM bei einer NO Konzentration in der Umgebungsluft von weniger als 10 ppb bzw. mehr als 10 ppb

Da dieser Zusammenhang durch weitere Experimente noch genauer geklärt werden muss, wurden die Daten unabhängig vom Umgebungs-NO alle in die Auswertung zur Referenzwertbestimmung bzw. zur Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung genommen.

4.1.4.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Da H₂O₂ als ein Marker für Entzündungsprozesse gilt (Kharitonov et al.; 2001), wurde untersucht, ob auch bei gesunden Kindern eine Korrelation zwischen der H₂O₂-Konzentration und der atopischen Veranlagung festzustellen ist. Wie Tabelle 15 zu entnehmen ist, konnte jedoch gezeigt werden, dass bei unseren gesunden Probanden keine der möglichen Faktoren die H₂O₂-Konzentration beeinflusst.

Antczak et al. konnten z.B. eine enge inverse Korrelation zwischen der H₂O₂-Konzentration und der Lungenfunktion von Asthmatikern nachweisen ($r = -0,63$; $p < 0,05$ bei FEV₁-Bestimmung und $r = -0,52$; $p < 0,05$ bei Peak Flow Messung (Antczak et al.; 1997b)). Wir konnten diese an Asthmatikern erhobenen Daten bei gesunden Kindern nicht bestätigen. Damit kommen wir zum gleichen Ergebnis wie Dohlman et al., die auch bei Asthmatikern

keine statistische Korrelation zwischen Lungenfunktionstests und der H₂O₂-Konzentration gefunden haben (Dohlman et al.; 1993a).

Da die Lungenfunktion ein weithin anerkannter Parameter der Atemwegswerte ist und unsere Untersuchungen mit einer vergleichsweise hohen Probandenzahl (115 vs. 21 bei Antczak und 22 bei Dohlman) durchgeführt wurden, kann man schließen, dass eine Enge der kleinen Atemwege bei Gesunden nicht mit erhöhten H₂O₂-Konzentrationen einhergeht. Dies schließt nicht aus, dass bei inflammatorischen Atemwegserkrankungen wie Asthma der Anfall reaktiver Sauerstoffspezies einen Einfluss auf die H₂O₂-Konzentration in der Ausatemluft hat.

4.1.4.3. Exhalat der Kinder

Die Menge Exhalat, die pro Zeit von den Probanden gewonnen werden konnte, zeigt eine signifikante Altersabhängigkeit. In einer weiteren Untersuchung bei 25 Kleinkindern unter 6 Jahren konnte von unserer Arbeitsgruppe die Altersabhängigkeit der Menge Exhalat pro Zeit auch bei noch jüngeren Probanden gezeigt werden (Griese et al.; 2001). Ab einem gewissen Alter sollte die Menge Exhalat pro Zeit konstant bleiben, denn sobald das Atemminutenvolumen der Probanden über die Pumpleistung steigt oder zumindest konstant bleibt, müsste rein theoretisch die Pumpe immer die exakt gleiche Menge an Exhalat absaugen. Aufgrund von epidemiologischen Daten nimmt man an, dass ab einem Alter von ca. 7 Jahren das Atemminutenvolumen konstant bei ca. 9 l/min liegt (Zapletal et al.; 1987). Daher wäre ab diesem Alter keine Zunahme der Menge Exhalat pro Zeit mehr zu erwarten. Die bei uns klar zu beobachtende Linearität auch bei über 10-jährigen (Abbildung 17), kann zum einen durch einige einzelne Ausreißerwerte im hohen Alter bedingt, zum anderen auch auf sammelmethode Variabilitäten zurückzuführen sein (siehe auch 4.1.2.1.).

Dass keine Abhängigkeit zwischen der Exhalatmenge und dem Tageszeitpunkt besteht, zeigt, dass die Menge an abgeatmetem Exhalat über den Tag verteilt konstant bleibt. In der Tat wäre es erstaunlich, wenn sich hier eine tageszeitliche Verteilung finden ließe.

Außerdem kann mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die H₂O₂-Konzentration nicht mit der gesammelten Menge Exhalat korreliert, was auch schon für die orale Sammelmethode von der Gruppe um Sznajder gezeigt werden (Sznajder et al.; 1989).

Als Schlussfolgerung zu den Versuchen mit H₂O₂ ist nochmals die noch nicht standardisierte Meßmethode hervorzuheben, die teilweise für die unterschiedlichen Ergebnisse von einzelnen Arbeitsgruppen verantwortlich ist. Daher ist gerade bei der Sammel- und Messmethode noch

einiges zu standardisieren, bevor man die H₂O₂-Konzentration oder andere in Ausatemexhalat gemessene Parameter in der klinischen Praxis einsetzen kann. Ein erster Schritt in diese Richtung bei Kindern ist z.B. die Einführung einer sehr angenehmen und leicht durchführbaren Sammelmethode.

Die Behandlung des gesammelten Exhalates und die Vorgehensweise bei der Messung von H₂O₂ hingegen scheint momentan nicht für die klinische Praxis geeignet zu sein.

4.2. NO

4.2.1. 117 Kinder

4.2.1.1. Referenzwerte

Wie Silkoff et al. schon 1997 zeigen konnten (Silkoff et al.; 1997d), ist die Höhe des erreichten NO-Plateaus vom oralen Ausatemfluss abhängig (siehe auch 3.2.3. NO - Konzentration bei unterschiedlichen Ausatemflüssen). An der eindeutigen Korrelation zwischen den NO-Werten verschiedener Ausatemflüsse kann diese Hypothese auch bei unseren Versuchen nachvollzogen werden.

Die Ergebnisse der NO-Bestimmungen bei den Kindern lagen im Bereich der Erwartungen, wie Tabelle 24 verdeutlicht, in der einige bisher in der Literatur beschriebenen NO-Konzentrationen aufgeführt sind, die beim endexpiratorischen NO - Plateau gemessen wurden (deshalb sind mehrere umfangreiche Studien nicht mit aufgenommen, da dort Messungen des NO - Peak - Wertes vorgenommen wurden). Zu beachten ist dabei jedoch, dass die Höhe des endexpiratorischen NO wie oben beschrieben vom Ausatemfluss abhängt, und sich bei diesem noch kein Standard durchsetzen konnte.

Tabelle 24 Übersicht über einige bisher veröffentlichten NO-Konzentrationen

Arbeitsgruppe	Jahr der Veröffentlichung	NO-Mittelwert ± SEM (ppb)	Anzahl der Probanden
(Artlich et al.; 1996)	1996	7,2 ± 1,0	n = 17
(Baraldi et al.; 1999)	1999	8,7	n = 159
(Dotsch et al.; 1996b)	1996	3,0 ± 2,5	n = 37
(Nelson et al.; 1997)	1997	5,0	n = 21
(Silvestri et al.; 1999a)	1999	4,0 ± 0,5	n = 22

Oral und nasal gemessenes NO stehen nicht in Korrelation zueinander. Dies zeigt, dass oral gemessenes NO bei dieser Art der Untersuchungsbedingungen nicht von NO aus den paranasalen Luftwegen beeinflusst wird. Um ein NO-Plateau zu halten, muss nämlich das Gaumensegel den Hypopharynx dicht abschließen. Dadurch dass man die NO-Werte am Ende der Ausatmung misst, stellt man sicher, dass sämtliches Gas, das aus dem Sinusbereich in die Mundhöhle eingedrungen war, bereits ausgeatmet wurde. So lässt sich auch der höhere NO-Wert zu Beginn der Ausatmung erklären. Zudem wird durch die Unabhängigkeit zwischen nasalem und oralem NO bewiesen, dass beide Parameter einen unterschiedlichen Ursprungs- und Entstehungsort haben.

Da bei den Messungen der H₂O₂-Konzentration eine negative Korrelation mit den NO-Werten der Umgebungsluft nachgewiesen wurde, wurde ein möglicher Einfluss des Umgebungs-NO auf die endexpiratorische NO-Konzentration untersucht. In der Literatur findet man dazu Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen. So konnten drei verschiedene Gruppen zeigen, dass der endexpiratorische NO-Wert bei erhöhtem Umgebungs-NO ansteigt (Baraldi et al.; 1998a; Corradi et al.; 1998b; Steerenberg et al.; 1999) und sie empfahlen daher, NO-Messungen nur bei Umgebungswerten von weniger als 35 ppb durchzuführen (Corradi et al.; 1998a). Andere Arbeitsgruppen wiederum fanden keine Korrelation zwischen den NO-Werten der Umgebungsluft und der Ausatemluft (Gomez et al.; 1998; Piacentini et al.; 1998). Diese etwas widersprüchlichen Resultate könnten zum einen durch Unterschiede in der

Messmethode bedingt sein, zum anderen wurden in manchen Studien extrem hohe Umgebungs-NO-Werte von bis zu 430 ppb gemessen (Baraldi et al.; 1998b). Bei unseren Messungen lag das Umgebungs-NO mit bis zu 60 ppb zwar vergleichsweise niedrig, wir konnten absolut keine Korrelation mit dem oralen endexpiratorischen NO-Wert feststellen (Abbildung 48). Durch diese Ergebnisse und die Empfehlungen der anderen oben erwähnten Gruppen kann man schlussfolgern, dass bis zu einem Umgebungs-NO von etwa 50 ppb kein Einfluss auf die NO-Messungen zu erwarten ist.

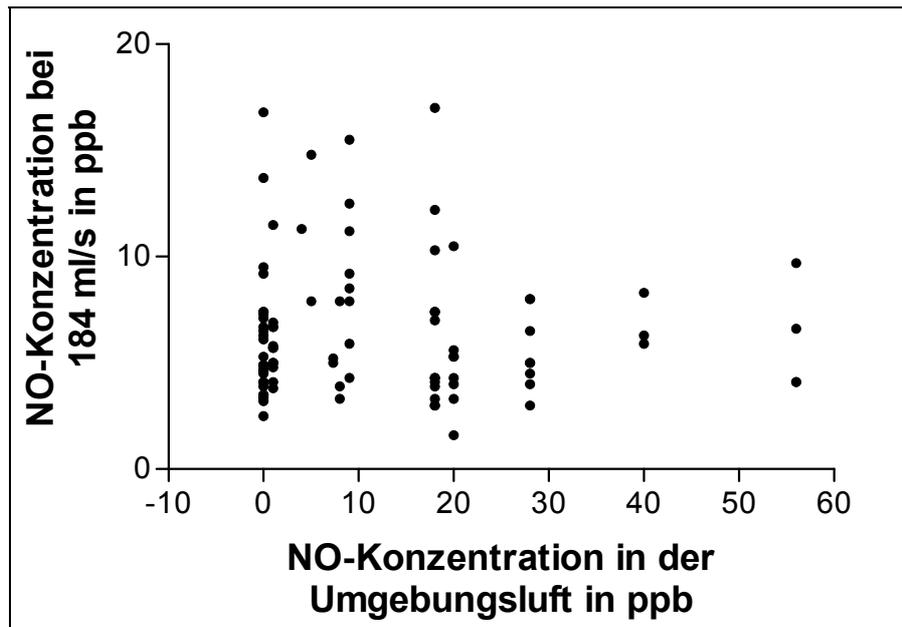


Abbildung 48 Vergleich der oralen NO-Konzentration bei 184 ml/s und der NO-Konzentration der Umgebungsluft in ppb

4.2.1.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Zur Abhängigkeit der oralen end-expiratorischen NO-Konzentration von verschiedenen Faktoren existieren eine Reihe von Studien, sogar bei gesunden Probanden. Die klare Korrelation von NO und dem Alter der Kinder, die wir fanden (siehe

Tabelle 17), wurde auch von zwei anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Dinarevic et al.; 1996; Franklin et al.; 1999b), deren Probanden jedoch nicht älter als 11 bzw. 13 Jahre alt waren. Somit konnten wir diese Erkenntnisse auch auf Kinder bis zu 18 Jahre ausweiten. Diese Altersabhängigkeit hat ihre Hauptursache wohl in der Änderung im Lungenvolumen mit dem Alter, wie schon von Franklin et al. vermutet wurde (Franklin et al.; 1999a). Wir konnten zeigen, dass v.a. der mit dem Alter zunehmende bronchiale NO-Anteil für diese Korrelation verantwortlich ist, wohingegen der alveoläre NO-Anteil relativ konstant bleibt (Philipp et al.; 2002).

Es liegen einige Studien vor, die einen Unterschied in der NO-Konzentration zwischen gesunden Atopikern und Nicht-Atopikern zeigen konnten. In einer Studie von 30 Kleinkindern unter 2 Jahren zeigten Wildhaber et al signifikant höhere NO-Werte bei Kindern mit einer positiven Familienanamnese (Wildhaber et al.; 1999). Moody et al fanden einen Zusammenhang zwischen NO-Konzentrationen mit Pricktestergebnissen (Moody et al.; 2000) und Franklin et al konnten in einer großen – unserer vergleichbaren – Studie eindeutig zeigen, dass bei gesunden Kindern mit zwei oder mehr positiven Pricktestergebnissen die NO-Konzentration mit 20,1 ppb signifikant gegenüber Kindern mit einem (10,9 ppb) oder keinem positiven Pricktestergebnis (7,2 ppb) erhöht ist (Franklin et al.; 1999c). Wir fanden keine Abhängigkeit der NO-Werte vom Hautpricktest und hatten im Vergleich zu Franklin et al eine wesentlich homogenere Aufteilung der Gruppen (57 vs. 50 Kinder bei uns und 116 vs. 24 vs. 17 Kinder bei Franklin). Außerdem unterschieden sich nicht nur die Zusammensetzung und die Allergene des Pricktestes erheblich, sondern auch die Probanden waren bei den einzelnen Studien verschiedener ethnischer und sozioökonomischer Herkunft. Unsere Untersuchung hatte zudem genügend mathematische Power ($\alpha < 0,01$), um den fast dreifachen Unterschied, den Franklin et al fanden, festzustellen, wenn er in unserer Probandengruppe vorhanden gewesen wäre.

Unsere Ergebnisse in Bezug auf die Unabhängigkeit der NO-Werte von der Lungenfunktion stehen im Einklang mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die ebenso keine Korrelation zwischen NO und FVC bzw. FEV1 finden konnten – sowohl bei Asthmatikern als auch bei Gesunden (Dotsch et al.; 1996a; Silvestri et al.; 1999b).

4.2.2. Variabilität der NO-Konzentrationen

Die Medianwerte aller Kinder sind mit morgens 4,5 ppb, mittags 4,6 ppb und abends 4,7 ppb nicht verschieden.

Dies widerspricht den Ergebnissen von Coulston et al. (Coulston et al.; 1998) die an 7 gesunden Probanden zeigten, dass die morgendliche NO-Konzentration mit $11,4 + 1,2$ ppb gegenüber der mittäglichen und abendlichen NO-Konzentration ($6,2 + 0,5$ ppb bzw. $6,0 + 0,6$ ppb) signifikant erhöht ist. Ebenso konnten Georges et al. 1998 zeigen, dass bei 10 Asthmatikern die oral exhalierte NO-Konzentration während der Nacht (10 pm und 4 am) statistisch signifikant gegenüber der NO-Konzentration am Tag erhöht war (Georges et al.; 1999). Allerdings haben beide Arbeitsgruppe ihre Messungen nicht bei exakt definierten Ausatemflüssen vorgenommen, sodass die Ergebnisse nur schwer interpretierbar sind.

Silkoff et al. stellten wie wir fest, dass es zwar tageszeitliche Schwankungen der NO-Konzentration gibt (intraday variation ca. 10 %), man jedoch nicht davon ausgehen kann, dass die NO-Werte zu einer bestimmten Tageszeit konstant erhöht sind (Silkoff et al.; 1997a).

Der hohe Variationskoeffizient bei allen Probanden - besonders morgens - wird fast ausschließlich durch die sehr hohen Werte von Proband 04 verursacht. Dies könnte auf individuelle, nicht näher bekannte Besonderheiten zurückzuführen sein. Sobald dieser Proband herausgenommen wird, normalisiert sich die Schwankungsbreite der NO-Werte.

Der zwar signifikante Unterschied bei Proband 05 wird teilweise durch die magere Anzahl von Versuchswerten (abends wurden z.B. nur vier Messungen durchgeführt) verursacht und ist daher nicht sehr aussagekräftig. Wichtig für die Beurteilung der Ergebnisse ist jedoch, dass die Kinder alle sehr kooperativ waren und die Messungen hervorragend durchführen konnten. Wie man besonders gut am Probanden 02 sehen kann, kommt es nicht nur innerhalb eines Tages zu Variationen des NO-Gehaltes in der Ausatemluft, sondern auch zwischen verschiedenen Tagen.

Dies ist v.a. bedeutsam bei der Interpretation von Behandlungserfolgen der Steroideinnahme bei Asthmapatienten mithilfe der NO-Konzentration. So konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass die NO-Werte der Kinder nicht nur während eines Tages schwanken können, sondern es bei einzelnen auch zwischen verschiedenen aufeinanderfolgenden Tagen zu teils starken Unterschieden kommen kann.

Da die NO-Konzentrationen bei den von uns gemessenen gesunden Kindern relativ niedrig sind, führen NO-Unterschiede von 2 - 3 ppb zu Änderungen von teils mehr als 100 %. Man kann dies natürlich so nicht auf kranke Patienten übertragen, deren NO-Werte wesentlich höher liegen, weshalb dann Schwankungen von einigen ppb nur recht geringe prozentuale Änderungen nach sich ziehen. Deshalb wäre es interessant, z.B. bei Asthmatikern über

mehrere Tage hinweg zu untersuchen, ob die NO-Konzentrationen in absoluten ppb-Werten oder in prozentualen Anteilen schwanken.

4.2.3. NO-Konzentrationen bei unterschiedlichen Ausatemflüssen

Trotz der teilweise von der Probandengruppe abhängigen unterschiedlichen Medianwerte bei den einzelnen Ausatemflüssen tritt eine durchgehende Korrelation der NO-Konzentrationen zu den Expirationsflüssen auf. Diese von uns gefundene Korrelation bestätigt die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen in Bezug auf die Flussabhängigkeit der NO-Werte. So wurde schon 1997 von Silkoff et al. eine bis zu 35-fache Erhöhung der NO-Konzentration bei abnehmendem Ausatemfluss beschrieben (Silkoff et al.; 1997b), und Kroesbergen et al. konnten diese Beobachtungen ebenfalls bestätigen (Kroesbergen et al.; 1999).

4.3. Nitrit

4.3.1. Messmethode

Da sowohl der Nitrit- als auch der Nitratassay kommerziell vertrieben werden, sollte man annehmen, dass die Standardkurve einfach und verlässlich erstellt werden kann. Für die Nitratbestimmung ist uns dies jedoch trotz mehrfacher Wiederholung nicht gelungen. Da ein Zusammenhang zwischen der NO-Konzentration in der Ausatemluft und der Nitritkonzentration im Exhalat bestehen könnte, wäre es wünschenswert, einen Assay aufzustellen, der eine zuverlässige Bestimmung auch der Nitratwerte garantiert. Somit könnte man dieser Frage nachgehen und weitere Untersuchungen dazu durchführen.

4.3.2. 117 Kinder

4.3.2.1. Referenzwerte

Die von uns gemessenen Nitritwerte ($3,17 \mu\text{M}$) sind gut vergleichbar mit den bisher in der Literatur veröffentlichten Werten. Balint et al. fanden Werte von $3,2 \mu\text{M}$ in gesunden Erwachsenen (Balint et al.; 2001b), Ho et al. maßen mit $0,36 \mu\text{M}$ etwas niedrigere Werte (Ho

et al.; 1998a). Wir konnten außerdem die Unabhängigkeit der Nitritwerte von der Tageszeit der Messung nachweisen.

Um – wie zuvor bei der Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration – eine mögliche Beeinflussung der Nitritwerte durch hohes Umgebungs-NO auszuschließen, wurde die Nitritkonzentration im Exhalat mit der NO-Konzentration in der Umgebungsluft verglichen. Wie in Abbildung 49 zu sehen ist, kann jedoch keine Korrelation festgestellt werden.

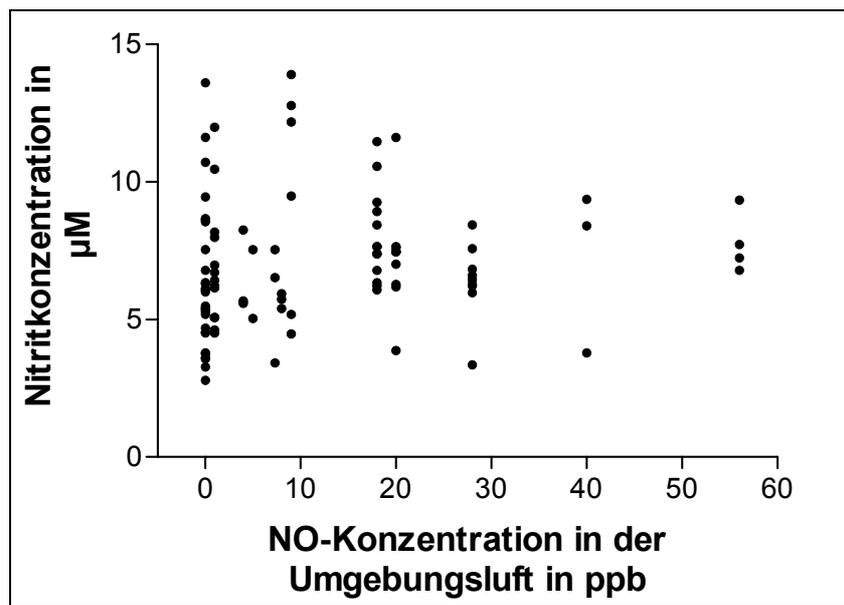


Abbildung 49 Vergleich zwischen der Nitritkonzentration in μM und dem NO-Gehalt der Umgebungsluft in ppb

4.3.2.2. Beeinflussbarkeit durch atopische Veranlagung

Obwohl Nitrit schon 1995 als Marker für Asthma, insbesondere bei akuten Exazerbationen vorgeschlagen wurde (Hunt et al.; 1995), konnten wir keine Korrelation zwischen den Nitritwerten und der Lungenfunktion, der Familienanamnese oder saisonaler Symptome feststellen. Auch wurde – im Gegensatz zu NO – keine Altersabhängigkeit der Nitritwerte gefunden. Zwar ergab sich ein positiver Einfluss des Pricktestergebnisses auf die Nitritwerte, mangels vergleichbaren Studien in der Literatur ist dieser Einfluss jedoch schwer einzuordnen. Wir konnten allerdings die Ergebnisse von Balint et al. bestätigen, die ebenso

wie wir keine dauerhafte Erhöhung von Nitrit im Exhalat von Rauchern gefunden haben (Balint et al.; 2001a).

4.4. Korrelation von NO, Nitrit und H₂O₂

Wir konnten bei gesunden Kindern – ebenso wie Horvath et al bei Asthmatikern (Horvath et al.; 1998b) - keine Korrelation zwischen nasalem oder oralem NO und H₂O₂ feststellen. Dies deutet darauf hin, dass beide Parameter unabhängig voneinander sind, d.h. sie vermutlich unterschiedliche Entstehungswege haben. Bei der Freisetzung von H₂O₂ spielen z.B. Alveolarmakrophagen und Eosinophile eine Rolle (Cluzel et al.; 1987a; Motojima et al.; 1992b) und ein Bezug zwischen erhöhtem H₂O₂ und aktivierten Neutrophilen konnte gezeigt werden (Wielders et al.; 1998). Die Synthese von NO über NOS in Eptihelzellen wird hingegen durch verschiedene inflammatorische Zytokine reguliert (Barnes; 1995). So lässt sich auch erklären, warum die H₂O₂-Konzentration von Rauchern erhöht ist (Nowak et al.; 1996a), und die NO-Konzentration bei Rauchern stark erniedrigt gegenüber nichtrauchenden Probanden ist (Persson et al.; 1994b).

Trotz der Tatsache, dass NO in den Atemwegen zu Nitrat metabolisiert wird (Grasemann et al.; 1997a), und Nitrit ein Metabolisierungsprodukt von Nitrat ist, wurde in unseren Versuchen kein Zusammenhang zwischen NO und Nitrit festgestellt. Kürzlich wurde sogar hypothetisiert, dass erhöhtes NO bei Asthmatikern von einem NO_x-Reservoir stammen könnte und durch Atemwegsübersäuerung entsteht. Umso wichtiger wäre es gewesen, zu überprüfen, ob NO mit Nitrat korreliert. Es konnte jedoch keine Nitrat-Standardkurve erstellt werden.

5. Zusammenfassung

Für die Untersuchung von Atemwegserkrankungen wird vermehrt nach nicht-invasiven diagnostischen Methoden und Alternativen zur Bronchiallavage gesucht, da es gerade bei Kindern wünschenswert wäre, den Krankheitsverlauf möglichst schonend zu kontrollieren, um frühzeitig mit einer adäquaten Behandlung zu beginnen.

Seit einigen Jahren existieren daher mehrere Studien über die Messung von Stickoxid (NO) in der Ausatemluft, aber auch zur Bestimmung von Nitrit und H₂O₂ im Atemkondensat als nicht-invasive Entzündungsparameter. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass NO bei Asthmatikern durch Aktivierung verschiedener NO-produzierender Zellen vermehrt gebildet und abgeatmet wird, wie auch H₂O₂ im Atemkondensat bei Asthmatikern erhöht ist. Ein höherer Nitritlevel im Atemkondensat konnte bei Mukoviszidosepatienten festgestellt werden. Allerdings gibt es kaum Daten von einer größeren Probandengruppe gesunder Kinder, die als Vergleich gegenüber den unterschiedlichen Krankheitsgruppen enorm wichtig wären.

Daher wurden in dieser Arbeit bei 117 gesunden Kindern im Alter von 4-18 Jahren Referenzwerte für NO in der Ausatemluft sowie für H₂O₂ und Nitrit im Atemkondensat erstellt. Bei allen Kindern wurde zusätzlich eine Anamnese, ein Allergie-Pricktest und eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt, um sie anhand ihrer atopischen Vorbelastung in verschiedene Gruppen zu unterteilen und zu vergleichen, welchen Einfluss diese atopischen Vorbelastungen auf die Konzentration der Entzündungsparameter haben.

Bei sieben dieser Kinder wurde an sechs aufeinanderfolgenden Tagen dreimal täglich die NO-Konzentration bestimmt, um intraindividuelle Schwankungen und die Tageszeitvariabilität beurteilen zu können.

Zudem wurde eine neue Sammelmethode des Atemkondensates auf ihre Praxistauglichkeit getestet, bei der die Probanden nicht wie bisher durch den Mund ausatmen, sondern die Luft durch eine Sauerstoffbrille bei Ruheatmung abgesaugt wird. Um diese Sammelmethode mit den bisher existierenden Methoden zu vergleichen und die Vorgehensweise bei der Sammlung des Exhalates sowie der Messung von H₂O₂ zu optimieren, wurden Vorversuche an 22 gesunden Erwachsenen durchgeführt.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die optimalste Sammlung von Atemkondensat mit zwei hintereinander geschalteten Gefäßen nahezu komplett erfolgen kann, wobei sowohl die Menge an gesammeltem Exhalat als auch die Konzentration von H₂O₂ unabhängig von der Art der Ein- und Ausatmung waren.

Bei der fluorometrischen Bestimmung von H₂O₂ im Kondensat zeigten die Versuche, dass man das für die Reaktion benötigte Substrat para-Hydroxyphenylacetatsäure und das Enzym Meerrettich-Peroxidase sofort zum gesammelten Exhalat begeben sollte, da die dann gebildeten Reaktionsprodukte im Gegensatz zum nicht umgesetzten H₂O₂ für mehrere Tage bei -70°C gelagert werden können. Die H₂O₂-Konzentration in der Ausatemluft der Kinder betrug 0,52 (0,28 - 0,75) µM; n = 116. Die gesammelte Menge Exhalat betrug 91 (80 - 100) µl/min und war unabhängig vom Alter der Kinder und von der Tageszeit der Sammlung.

Die orale NO-Konzentration in der Ausatemluft bei einem Expirationsfluss von 184 ml/s betrug 5,7 ppb (4,3 - 7,9 ppb); n = 107. Die nasale NO-Konzentration war 1200 ppb (930 - 1400 ppb); n = 105. Die NO-Konzentration war auch unabhängig von der Tageszeit der Sammlung, es konnte jedoch mit höherem Lebensalter der Kinder ein Ansteigen der Konzentration beobachtet werden. Bei der sechstägigen Messreihe von sieben Kindern konnte keine signifikante zirkadiane Rhythmik festgestellt werden. Der durchschnittliche Variationskoeffizient von 25,9 % zeigt jedoch eine hohe intraindividuelle Schwankungsbreite. Außerdem konnte die schon vorher bekannte Abhängigkeit der NO-Konzentration vom Ausatemfluss auch in unseren Versuchen bestätigt werden.

Die Nitritkonzentration im Exhalat der Kinder betrug 3,17 (2,67 – 3,82) µM, n = 109.

Es konnte eine Altersabhängigkeit der gesammelten Menge Exhalat pro Zeit gefunden werden. Außerdem war die NO-Konzentration auch vom Lebensalter, nicht jedoch von der Lungenfunktion oder den Ergebnissen des Pricktestes abhängig. Bis auf zwei weitere Einflussfaktoren (saisonale Symptome für NO und Pricktest für Nitrit), waren die Höhe der Konzentrationen von NO, H₂O₂ und Nitrit ansonsten unbeeinflusst von der eigenen und familiären atopischen Vorbelastung der Kinder, vom Alter und vom Geschlecht.

Es konnte keine Korrelation zwischen NO, H₂O₂ oder Nitrit festgestellt werden. Bei der Untersuchung, welchen Einfluss die NO-Konzentration auf die Höhe der NO- oder H₂O₂-Konzentration hat, wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Umgebungs-

NO und der H₂O₂-Konzentration festgestellt, wohingegen die NO-Konzentration in der Ausatemluft unabhängig von der NO-Konzentration in der Umgebungsluft war.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte neuartige Methode zur Sammlung von Exhalat eignet sich hervorragend, Atemkondensat nicht-invasiv, sicher und angenehm zu sammeln, was gerade im Kleinkindbereich bisher nicht möglich war. Zusammen mit den anderen bei dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen ist dies ein weiterer Schritt auf dem Weg, entzündliche Atemwegserkrankungen nicht-invasiv zu diagnostizieren bzw. zu überwachen.

6. Literaturverzeichnis

- Alving, K., Weitzberg, E., and Lundberg, J. M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur.Respir.J.* 6: 1368-1370, 1993
- Antczak, A., Nowak, D., Shariati, B., Krol, M., Piasecka, G., and Kurmanowska, Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur.Respir.J.* 10: 1235-1241, 1997b
- Antczak, A., Nowak, D., Shariati, B., Krol, M., Piasecka, G., and Kurmanowska, Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur.Respir.J.* 10: 1235-1241, 1997c
- Antczak, A., Nowak, D., Shariati, B., Krol, M., Piasecka, G., and Kurmanowska, Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur.Respir.J.* 10: 1235-1241, 1997a
- Artlich, A., Hagenah, J. U., Jonas, S., Ahrens, P., and Gortner, L. Exhaled nitric oxide in childhood asthma. *Eur.J.Pediatr.* 155: 698-701, 1996
- Asano, K., Chee, C. B., Gaston, B., Lilly, C. M., Gerard, C., Drazen, J. M., and Stamler, J. S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 10089-10093, 1994
- Balint, B., Donnelly, L. E., Hanazawa, T., Kharitonov, S. A., and Barnes, P. J. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 56: 456-461, 2001a
- Balint, B., Donnelly, L. E., Hanazawa, T., Kharitonov, S. A., and Barnes, P. J. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 56: 456-461, 2001b

- Baraldi, E., Azzolin, N. M., Cracco, A., and Zacchello, F. Reference values of exhaled nitric oxide for healthy children 6-15 years old. *Pediatr.Pulmonol.* 27: 54-58, 1999
- Baraldi, E., Azzolin, N. M., Dario, C., Carra, S., Ongaro, R., Biban, P., and Zacchello, F. Effect of atmospheric nitric oxide (NO) on measurements of exhaled NO in asthmatic children. *Pediatr.Pulmonol.* 26: 30-34, 1998b
- Baraldi, E., Azzolin, N. M., Dario, C., Carra, S., Ongaro, R., Biban, P., and Zacchello, F. Effect of atmospheric nitric oxide (NO) on measurements of exhaled NO in asthmatic children. *Pediatr.Pulmonol.* 26: 30-34, 1998a
- Barnes, P. J. Nitric oxide and airway disease. *Ann.Med.* 27: 389-393, 1995
- Body, S. C., Hartigan, P. M., Shernan, S. K., Formanek, V., and Hurford, W. E. Nitric oxide: delivery, measurement, and clinical application. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 9: 748-763, 1995
- Cluzel, M., Damon, M., Chanez, P., Bousquet, J., Crastes, De Paulet, Michel, F. B., and Godard, P. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 80: 195-201, 1987b
- Cluzel, M., Damon, M., Chanez, P., Bousquet, J., Crastes, De Paulet, Michel, F. B., and Godard, P. Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 80: 195-201, 1987a
- Corradi, M., Pelizzoni, A., Majori, M., Cuomo, A., de', Munari E., and Pesci, A. Influence of atmospheric nitric oxide concentration on the measurement of nitric oxide in exhaled air. *Thorax* 53: 673-676, 1998a
- Corradi, M., Pelizzoni, A., Majori, M., Cuomo, A., de', Munari E., and Pesci, A. Influence of atmospheric nitric oxide concentration on the measurement of nitric oxide in exhaled air. *Thorax* 53: 673-676, 1998b

Coulston, E., Deykiin, A, Yim, E, Langenauer, S, Israel, E, and Drazen, J. M. Diurnal variation in expired nitric oxide in normals. European Respiratory Congress A614: 1998

Dinarevic, S., Byrnes, C. A., Bush, A., and Shinebourne, E. A. Measurement of expired nitric oxide levels in children. *Pediatr.Pulmonol.* 22: 396-401, 1996

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

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

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

Dotsch, J., Demirakca, S., Terbrack, H. G., Huls, G., Rascher, W., and Kuhl, P. G. Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. *Eur.Respir.J.* 9: 2537-2540, 1996a

Dotsch, J., Demirakca, S., Terbrack, H. G., Huls, G., Rascher, W., and Kuhl, P. G. Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. *Eur.Respir.J.* 9: 2537-2540, 1996b

Franklin, P. J., Taplin, R., and Stick, S. M. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159: 69-73, 1999a

Franklin, P. J., Taplin, R., and Stick, S. M. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159: 69-73, 1999b

- Franklin, P. J., Taplin, R., and Stick, S. M. A community study of exhaled nitric oxide in healthy children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159: 69-73, 1999c
- Gaston, B., Drazen, J. M., Loscalzo, J., and Stamler, J. S. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149: 538-551, 1994
- Georges, G., Bartelson, B. B., Martin, R. J., and Silkoff, P. E. Circadian variation in exhaled nitric oxide in nocturnal asthma. *J.Asthma* 36: 467-473, 1999
- Gomez, F. P., Martinez, Palli G., Barbera, J. A., Roca, J., and Rodriguez-Roisin, R. [Measurement of exhaled nitric oxide in healthy subjects]. *Med.Clin.(Barc.)* 111: 1-5, 1998
- Grasemann, H., Ioannidis, I., de Groot, H., and Ratjen, F. Metabolites of nitric oxide in the lower respiratory tract of children. *Eur.J.Pediatr.* 156: 575-578, 1997a
- Grasemann, H., Ioannidis, I., de Groot, H., and Ratjen, F. Metabolites of nitric oxide in the lower respiratory tract of children. *Eur.J.Pediatr.* 156: 575-578, 1997b
- Griese, M., Latzin, P., and Beck, J. A noninvasive method to collect nasally exhaled air condensate in humans of all ages. *Eur.J.Clin.Invest* 31: 915-920, 2001
- Hamid, Q., Springall, D. R., Riveros-Moreno, V., Chanez, P., Howarth, P., Redington, A., Bousquet, J., Godard, P., Holgate, S., and Polak, J. M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 342: 1510-1513, 1993
- Ho, L. P., Innes, J. A., and Greening, A. P. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 53: 680-684, 1998a
- Ho, L. P., Innes, J. A., and Greening, A. P. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 53: 680-684, 1998b

- Horvath, I., Donnelly, L. E., Kiss, A., Kharitonov, S. A., Lim, S., Fan, Chung K., and Barnes, P. J. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158: 1042-1046, 1998a
- Horvath, I., Donnelly, L. E., Kiss, A., Kharitonov, S. A., Lim, S., Fan, Chung K., and Barnes, P. J. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158: 1042-1046, 1998b
- Hunt, J., Byrns, R. E., Ignarro, L. J., and Gaston, B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 346: 1235-1236, 1995
- Hyslop, P. A. and Sklar, L. A. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal.Biochem.* 141: 280-286, 1984
- Ischiropoulos, H., Nelson, J., Duran, D., and Al Mehdi, A. Reactions of nitric oxide and peroxyxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. *Free Radic.Biol.Med.* 20: 373-381, 1996
- Jobsis, Q., Raatgeep, H. C., Hermans, P. W., and de Jongste, J. C. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur.Respir.J.* 10: 519-521, 1997a
- Jobsis, Q., Raatgeep, H. C., Hermans, P. W., and de Jongste, J. C. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur.Respir.J.* 10: 519-521, 1997c
- Jobsis, Q., Raatgeep, H. C., Hermans, P. W., and de Jongste, J. C. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur.Respir.J.* 10: 519-521, 1997b
- Jobsis, Q., Raatgeep, H. C., Schellekens, S. L., Hop, W. C., Hermans, P. W., and de Jongste, J. C. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur.Respir.J.* 12: 483-485, 1998b

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

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

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

Kharitonov, S. A., Robbins, R. A., Yates, D., Keatings, V., and Barnes, P. J. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152: 609-612, 1995a

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

Kharitonov, S. A., Yates, D., Robbins, R. A., Logan-Sinclair, R., Shinebourne, E. A., and Barnes, P. J. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343: 133-135, 1994

Kietzmann, D., Kahl, R., Muller, M., Burchardi, H., and Kettler, D. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* 19: 78-81, 1993

Kroesbergen, A., Jobsis, Q., Bel, E. H., Hop, W. C., and de Jongste, J. C. Flow-dependency of exhaled nitric oxide in children with asthma and cystic fibrosis. *Eur.Respir.J.* 14: 871-875, 1999

- Loukides, S., Horvath, I., Wodehouse, T., Cole, P. J., and Barnes, P. J. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158: 991-994, 1998b
- Loukides, S., Horvath, I., Wodehouse, T., Cole, P. J., and Barnes, P. J. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158: 991-994, 1998a
- Lundberg, J. O. Airborne nitric oxide: inflammatory marker and aerocrine messenger in man. *Acta Physiol Scand.Suppl* 633: 1-27, 1996
- Moody, A., Fergusson, W., Wells, A., Bartley, J., and Kolbe, J. Increased nitric oxide production in the respiratory tract in asymptomatic pacific islanders: an association with skin prick reactivity to house dust mite. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105: 895-899, 2000
- Motojima, S., Fukuda, T., and Makino, S. Effect of eosinophil peroxidase on beta-adrenergic receptor density on guinea pig lung membrane. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 189: 1613-1619, 1992a
- Motojima, S., Fukuda, T., and Makino, S. Effect of eosinophil peroxidase on beta-adrenergic receptor density on guinea pig lung membrane. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 189: 1613-1619, 1992b
- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064, 1992
- Nathan, C. and Xie, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918, 1994
- Nelson, B. V., Sears, S., Woods, J., Ling, C. Y., Hunt, J., Clapper, L. M., and Gaston, B. Expired nitric oxide as a marker for childhood asthma. *J.Pediatr.* 130: 423-427, 1997

- Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Pietras, T., Shariati, B., Bialasiewicz, P., Jeczowski, K., and Kula, P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur.Respir.J.* 9: 652-657, 1996b
- Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Pietras, T., Shariati, B., Bialasiewicz, P., Jeczowski, K., and Kula, P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur.Respir.J.* 9: 652-657, 1996a
- Panus, P. C., Radi, R., Chumley, P. H., Lillard, R. H., and Freeman, B. A. Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 14: 217-223, 1993b
- Panus, P. C., Radi, R., Chumley, P. H., Lillard, R. H., and Freeman, B. A. Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 14: 217-223, 1993a
- Persson, M. G., Zetterstrom, O., Agrenius, V., Ihre, E., and Gustafsson, L. E. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 343: 146-147, 1994b
- Persson, M. G., Zetterstrom, O., Agrenius, V., Ihre, E., and Gustafsson, L. E. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 343: 146-147, 1994a
- Philipp, L., Julia, B., and Matthias, G. Exhaled nitric oxide in healthy children: Variability and a lack of correlation with atopy. *Pediatr.Allergy Immunol.* 13: 37-46, 2002
- Piacentini, G. L., Bodini, A., Vano, L., Zanolla, L., Costella, S., Vicentini, L., and Boner, A. L. Influence of environmental concentrations of NO on the exhaled NO test. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158: 1299-1301, 1998
- Shaul, P. W., North, A. J., Wu, L. C., Wells, L. B., Brannon, T. S., Lau, K. S., Michel, T., Margraf, L. R., and Star, R. A. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J.Clin.Invest* 94: 2231-2236, 1994

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

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

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

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

Silvestri, M., Spallarossa, D., Frangova, Yourukova, V, Battistini, E., Fregonese, B., and Rossi, G. A. Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. *Eur.Respir.J.* 13: 321-326, 1999a

Silvestri, M., Spallarossa, D., Frangova, Yourukova, V, Battistini, E., Fregonese, B., and Rossi, G. A. Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. *Eur.Respir.J.* 13: 321-326, 1999b

Steenenbergh, P. A., Snelder, J. B., Fischer, P. H., Vos, J. G., van Loveren, H., and van Amsterdam, J. G. Increased exhaled nitric oxide on days with high outdoor air pollution is of endogenous origin. *Eur.Respir.J.* 13: 334-337, 1999

Sznajder, J. I., Fraiman, A., Hall, J. B., Sanders, W., Schmidt, G., Crawford, G., Nahum, A., Factor, P., and Wood, L. D. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 96: 606-612, 1989

Wielders, P. L., Dekhuijzen, P. N., Terlouw, S., Steenvoorden, G., Scheepers, P., and Herwarden van, C. Exhaled hydrogen peroxide in relation to cellular composition and total glutathione in induced sputum of COPD patients. *European Respiratory Congress* 1998: 1998

Wildhaber, J. H., Hall, G. L., and Stick, S. M. Measurements of exhaled nitric oxide with the single-breath technique and positive expiratory pressure in infants. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159: 74-78, 1999

Zapletal, A., Samánek, M., and Paul, T. Lung function in children and adolescents :methods, reference values. 1987

7. Anhang

7.1. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Griese für die Bereitstellung des Themas, die ständige fachliche Unterstützung während der Arbeit und v.a. die vielen Ideen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders danken möchte ich außerdem Frau Andrea Schams, die mich in die Laborarbeit eingewiesen hat und mit ihrer freundlichen und angenehmen Art geduldig sämtliche Fehler von mir ertrug und Frau Dr. Julia Beck, an die ich mich während der Arbeit mit sämtlichen Fragen wenden konnte und die mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem danke ich sämtlichen Mitarbeitern im Labor Griese der Forschungsgruppe Lunge und den Mitarbeitern in der Allergieambulanz, die nicht nur durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sondern es mir v.a. ermöglicht haben, während dieser Zeit in einer sehr angenehmen Atmosphäre tätig zu sein.

Natürlich bedanke ich mich bei allen Schwimmkindern, Freunden und Familienangehörigen, die freundlicherweise für mich ausgeatmet haben und auch unerfreuliche Prozeduren wie den Pricktest allesamt sehr geduldig ertragen haben. Ich weiß selbstverständlich, dass ohne Eure Unterstützung die Arbeit niemals in diesem Rahmen hätte durchgeführt werden können.

Meiner journalistisch erfahrenen Oma, Frau Ingeborg Münzing verdanke ich einige wertvolle Tipps zur Verfassung solcher Arbeiten und gute Ideen in Bezug auf die Sprache und Form der Arbeit. Außerdem stand meine Oma mir neben meinen Eltern und meiner Schwester Sabine rund um die Uhr mit Rat, Tat, Trost, Aufmunterung und Ausatemluft zur Verfügung. Dies gilt auch für Sophie Pache, die mir nicht nur bei der Organisation der Messungen sehr viel geholfen hat, sondern mir auch einen wunderbaren Platz am See zur Verfügung gestellt hat, an dem ich einen Großteil der Arbeit schreiben konnte.

7.2. Lebenslauf

Philipp Tobias Latzin

Geburtsdatum: 21. März 1975
Geburtsort: München
Eltern: Dr. Wolf-Dieter Latzin, Diplom-Ingenieur
Stefanie Latzin, geb Münzing, Chemisch-technische Assistentin
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/81-07/85 Grundschule an der Herterichstraße, München
09/85-07/94 Gymnasium Pullach, Pullach im Isartal
07/94 Abitur mit Schwerpunkten Französisch, Mathematik, Ethik und Sport

Studium der Medizin an der LMU München

07/97 Erstes Staatsexamen
04/00 Zweites Staatsexamen
04/02 Drittes Staatsexamen

Famulaturen

10/96 Pathologie, Klinikum Großhadern LMU München
03/97 Gynäkologie und Geburtshilfe, Kreiskrankenhaus Neustadt a. d. Waldnaab
10 u. 11/98 Anästhesie und Pädiatrie, Tauranga Hospital, Neuseeland
02 u. 03/99 Pädiatrie, Childrens Hospital Los Angeles, USA

Praktisches Jahr

12/00-01/01 Innere Medizin, Krankenhaus Schwabing, München, Kardiologie
01/01-03/01 Innere Medizin, Yale University, New Haven, USA, Hämatologie,
Infektiologie
04/01-07/01 Pädiatrie, Kinderklinik an der Lachnerstraße, München
07/01-11/01 Chirurgie, Krankenhaus Neuperlach, München