Aus dem Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

Vergleichende Analyse biologischer Alterungsmarker bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD)

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Tanja Lucke (geb. Schramm)

aus Forchheim

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Rudolf A. Jörres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Jürgen Behr
	Apl. Prof. Dr. Albrecht Bergner
	Prof. Dr. Winfried Lange
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	29.07.2015

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Vergleichende Analyse biologischer Alterungsmarker bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD)

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 04.08.2015 Tanja Lucke

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Tanja Lucke (geb. Schramm)
Geburtsdaten:	26.07.1986 in Forchheim
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Carmen Schramm
	Dr. Ullrich Schramm

Schulbildung

1992 – 1996	Volksschule Heroldsbach (Grundschule)
1996 – 1997	Volksschule Heroldsbach (Hauptschule)
1997 – 2006	Herder-Gymnasium Forchheim
	Abschluss: Abitur, Juni 2006

Studium

2006 – 2010	Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen
November 2010 - April 2011	Praktische Ausbildung an der University of Florida, College of Pharmacy
Mai 2011 - Oktober 2011	Praktische Ausbildung in der Rathausapotheke am Marienplatz, München
Dezember 2011	Abschluss: 3. Staatsexamen, Erlangung der Approbation zum Apotheker

Beruflicher Werdegang

Januar 2012 – März 2013	Apothekerin in der Rathausapotheke am Marienplatz, München
Seit März 2012	Tätigkeit als Wissenschaftlerin am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin

Meinen Eltern und meinem Mann Matthias

Abkürzungsverzeichnis

µl: Mikroliter
6MWD: 6-Minuten-Gehtest
Abb: Abbildung
ABI: Knöchel-Arm-Index
AGE: Advanced Glycation End Products
Albd: Primer für Albumin in 5'-3'-Richtung
Albu: Primer für Albumin-Gegenstrang in 5'-3'-Richtung
BIA: Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI: Body-Mass-Index
BODE: Errechnet aus Körpergewichtsindex (BMI), Einschränkung der Lungenfunktion (Obstruktion), Luftnot (Dyspnoe) und körperlicher Leistungsfähigkeit (Exercise Capacity)
bp: Basenpaare
CAT: COPD-Assessment-Test
cm: Zentimeter
COPD: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
COSYCONET: German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network
CRP: C-reaktives Protein
Ct (=Cq) =Cycle Threshold; Schwellenwert, bei der das Signal der PCR sich erstmalig deutlich vom Hintergrund abhebt
CT: Computertomographie
DemTect: Demenz-Detektions-Test
dl: Deziliter
DNA: Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
E: Effizienz
ECLIPSE: Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGKS: Europäische Gemeinschaft für Kohle und Stahl
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Emphysem pred.: vorhergesagtes Emphysem (Emphysem predicted)
ERV: Exspiratorisches Reservevolumen
FEV_1: Forciertes Einsekundenvolumen (Forced Expiratory Volume in the first second)
FVC: Forcierte Vitalkapazität (Forced Vital Capacity)
GC: Guanin und Cytosin
GLI: Global Lung Initiative
GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HbA1c: Glykohämoglobin

HDL: High Density Lipoprotein
IC: Inspiratorische Kapazität
ITGV: Intrathorakales Gasvolumen
IVC: Inspiratorische Vitalkapazität
J: Jahr
Kap: Kapitel
kg: Kilogramm
kPa: Kilopascal
l: Liter
LDL: Low Densitiy Lipoprotein
m: Meter
ml: Milliliter
MMP: Matrix-Metallo-Proteinase
MMQPCR: Monochrome Multiplex Quantitative PCR
mMRC: modified Medical Research Council
n.s.: nicht signifikant
N.suralis: Nervus suralis
n: Fallzahl
NF-κB: Nukleärer Faktor Kappa B
ng: Nanogramm
NL: Nasolabiale Falten
nm: Nanometer
nM: Nanomolar
NTC: Non-Template-Control
p: Signifikanzwert
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
PNP: Polyneuropathie
PO: Periorbitale Falten
PWV: Pulswellengeschwindigkeit (Pulse Wave Velocity)
qPCR: quantitative real-time PCR
Quart1: erstes Quartil
Quart3: drittes Quartil
R: Korrelationskoeffizient
R_0: Referenz-Widerstand
R^2: Bestimmtheitsmaß
RAGE: AGE-bindender Rezeptor (Receptor for Advanced Glycation Endproducts)
R_{max}: Maximaler Widerstand

ROS: Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
R_s: Korrelationskoeffizient nach Spearman
RV: Residualvolumen
SCG: Single Copy Gene
SD: Standardabweichung
sec: Sekunde
SOD: Superoxid-Dismutase
SOP: Standard Operating Procedure
SQ: Starting Quantity
sReff: Effektiver Atemwegswiderstand
sRtot: Spezifischer Atemwegswiderstand
T&go: Timed-up-and-Go-Test
Tab: Tabelle
telc: Primer des Telomer-Produkts des Gegenstranges in 3'-5'-Richtung
telg: Primer des Telomer-Produkts in 3'-5'-Richtung
TLC: Totale Lungenkapazität (Total Lung Capacity)
TLCO: CO-Diffusionskapazität (Transfer Factor of the Lung for Carbon Monoxide (CO))
TRFL: Telomere Restriction Fragment Length
T/S Ratio: Messwert der Telomerenlänge (T) durch Messwert des Single Copy Gene (S)
UV-Bestrahlung: Bestrahlung mit Licht ultravioletter Wellenlänge
VA: Alveoläres Volumen
VOC: Flüchtige Kohlenwasserstoffen (Volatile Organic Compounds)
WHO: Weltgesundheits-Organisation (World Health Organisation)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8
1.1 COPD 8
1.2 COPD und Komorbiditäten 10
1.3 COPD, Biomarker im Blut, Haut, Elektronische Nase 12
1.3.1 COPD und Biomarker im Blut 12
1.3.2 COPD und Hautalterung 16
1.3.3 COPD und Elektronische Nasen 17
1.4 COSYCONET (German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network) 18
2 Fragestellung 20
3 Methoden 21
3.1 Beschreibung COSYCONET 21
3.1.1 Einschlusskriterien 21
3.1.2 Ausschlusskriterien 21
3.1.3 Befragung 22
3.1.4 Funktionsmessungen 22
3.2 Rekrutierung 26
3.3 Fotografische Aufnahmen der Haut und deren Auswertung 28
3.4 Alterungsmarker im Blut 30
3.4.1 Etablieren der Telomeren-Messung nach Cawthon 30
3.4.1a Probenentnahme bzw. Aufreinigung der Proben 30
3.4.1b Prinzip der Messung der Telomerenlänge nach Cawthon (monochrome multiplex quantitative PCR (MMQPCR)) 30
3.4.1c Versuche mit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad 33
3.4.1d Versuche mit selbsthergestelltem Master- nach Cawthon 2009 42
3.4.1e Versuche mit HOT FIREpol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX) 53
3.4.2 Messung der Telomeren 59
3.4.3 LL-37 60
3.4.4 Advanced Glycation End Products (AGE) 62
3.5 Neurologische Untersuchungen 63
3.5.1 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit und der Amplitude des *N.suralis* 63
3.5.2 Messung des Vibrationsempfindens mittels Rydel-Seiffer-Stimmgabel 64

3.5.3 Messung der Oberflächensensitivität mittels Semmes-Weinstein Monofilament . 65
3.6 Emphysemscore ... 65
3.7 Elektronische Nase ... 66
3.8 Datenauswertung ... 70
4. Ergebnisse ... 72
4.1 Basischarakteristika der Kohorte ... 72
4.1.1 Anthropometrische Daten ... 72
4.1.2 Lungenfunktionsdaten ... 74
4.1.3 Zusätzliche funktionelle Daten und Fragebogendaten ... 77
4.2 Polyneuropathie ... 81
4.3 Hautalterung als phänomenologischer Marker ... 86
4.4 Marker des Alterns im Blut ... 90
4.5 Standardlaborparameter ... 91
4.6 Korrelationen mit Alterungsmarkern und Emphysemscore ... 97
4.6.1 Telomeren ... 98
4.6.2 Advanced Glycation End Products (AGE) ... 104
4.6.3 LL-37 ... 109
4.6.4 Marker der Hautalterung ... 111
4.6.5 Lungenfunktion und Emphysemscore ... 115
4.7 Beziehungen der Alterungsmarker zu weiteren klinischen Kenngrößen ... 118
4.7.1 Biologische Alterungsmarker versus Blutparameter ... 118
4.7.2 Alterungsmarker versus Adipositas ... 120
4.7.3 Alterungsmarker versus Emphysemscore ... 122
4.8 Multivariate Analysen der Alterungsmarker ... 123
4.8.1 Emphysemscore, Bauchumfang und Telomeren ... 123
4.8.2 Emphysemscore, Bauchumfang und BMI ... 124
4.8.3 Emphysemscore, Bauchumfang, BMI und Altersdifferenz ... 125
4.8.4 Emphysemscore, LL-37 und Altersdifferenz ... 127
4.8.5 Emphysemscore, Diffusionskapazität und Ganzkörperplethysmographie ... 129
4.8.6 Zusammenfassende Analyse des Emphysemscores ... 129
4.8.7 COPD-Klassen und Alterungsmarker ... 130
4.8.8 Komorbiditäten versus biologische Alterungsmarker ... 133

4.9 Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel 136
4.10 Zusammenfassende Tabellen 141
4.11 Ergebnisse der Elektronischen Nase 143
5 Diskussion 145
5.1 Vergleich der Patientencharakteristika mit bekannten Daten 146
5.2 Ergebnisse der Alterungsmarker 147
5.2.1 Assoziationen mit den AGEs im Serum 148
5.2.2 Assoziationen mit LL-37 im Plasma 151
5.2.3 Assoziationen der Telomerenlänge von Blutleukozyten 152
5.2.4 Parameter der Hautalterung des Gesichts 158
5.2.5 Polyneuropathie 160
5.2.6 Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel 161
5.2.7 Elektronische Nase 162
5.2.8 Synopsis und Wertung der Befunde dieser Studie 163
6 Zusammenfassung 165
7 Anhang 167
7.1 Fragebögen 167
7.2 Funktionelle Messungen (nicht relevant für das Verfassen der Dissertation) 181
7.3 Standardkurven/Schmelzprofile der Telomerenlängenbestimmung 185
7.4 Abbildungsverzeichnis 191
7.5 Tabellenverzeichnis 195
7.6 Literaturverzeichnis 196
8 Danksagung 204

1 Einleitung

1.1 COPD

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist definiert als vermeidbare und behandelbare Erkrankung, die durch eine dauerhafte, nicht vollständig reversible Einschränkung des Luftstromes charakterisiert ist. Üblicherweise handelt es sich um einen progredienten Krankheitsverlauf, der mit einer übermäßigen Entzündungsreaktion des Lungengewebes auf schädigende Partikel oder Gase (hauptsächlich Zigarettenrauchen) in Verbindung gebracht wird [1]. Verschiedene Studien beschreiben die COPD weltweit als die vierthäufigste Todesursache (z.B. [2]; Abb. 1.1), wobei angenommen wird, dass die Erkrankung bis spätestens 2020 in der Rangliste auf Platz 3 rücken wird (z.B. [3]).

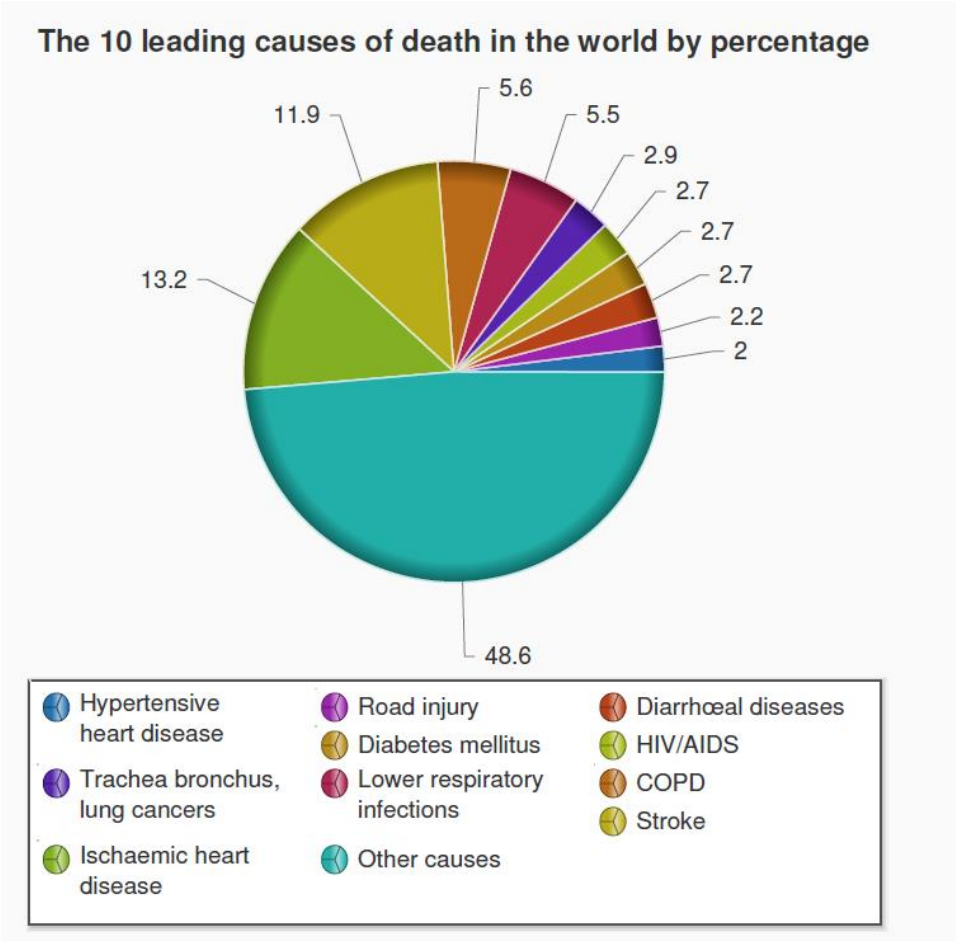
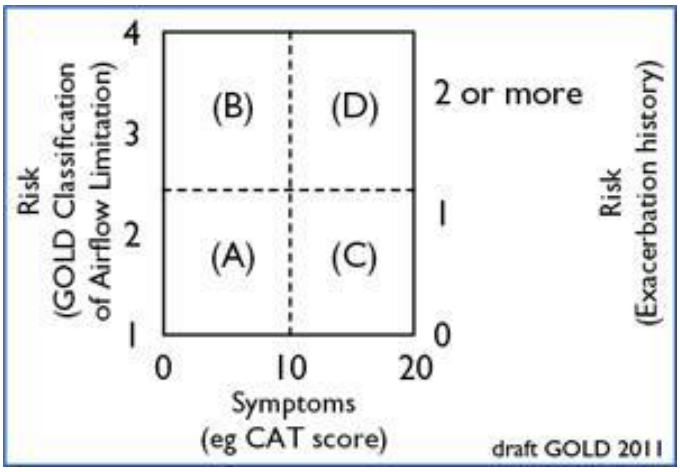


Abb. 1.1: Rangliste der häufigsten Todesursachen weltweit, WHO [4]

Die Spirometrie mit der Messung der forcierten Vitalkapazität (FVC) und dem forcierten Einsekundenvolumen (FEV_1) stellt die Basis der objektiven Darstellung der Atemflussbehinderung dar. Das Vorliegen einer obstruktiven Ventilationsstörung wird anhand des postbronchodilatatorischen Quotienten aus dem forcierten Einsekundenvolumen FEV_1 und der forcierten Vitalkapazität FVC (FEV_1/FVC, Tiffeneau-Index) beurteilt. Eine Verringerung des Tiffeneau-Index auf weniger als 70% ist für eine Obstruktion charakteristisch, da der Strömungswiderstand der Atemwege erhöht ist [1].

Die Einteilung der COPD in Schweregrade kann einerseits über das Ausmaß der Lungenfunktionsstörung vorgenommen werden, andererseits können das Auftreten von Symptomen und die Häufigkeit akuter Verschlechterungen (Exazerbationen) zu einer erweiterten Klassifizierung beitragen. Für die ursprüngliche Einteilung in die GOLD-Stadien 1 bis 4 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [5]) wurden bislang vorrangig Einschränkungen des FEV_1 herangezogen. Als leichtgradige Obstruktion (GOLD 1) bezeichnet man bei eingeschränktem Tiffeneau-Wert eine Limitation der forcierten Einsekunden-kapazität von weniger als 20%, d.h. der Prozentwert des FEV_1 bezogen auf den individuellen Sollwert beträgt 80% oder mehr. Eine mittelschwere Obstruktion (GOLD 2) umfasst den Bereich FEV_1 %Soll von $\geq$50% bis <80%. Darauf folgt der schwere Erkrankungszustand (GOLD 3), der durch die Werte FEV_1 %Soll $\geq$ 30% bis < 50% charakterisiert wird. Patienten mit einem FEV_1 %Soll von weniger als 30% oder weniger als 50% und einer zusätzlichen respiratorischen Globalinsuffizienz sind in die Gruppe der am schwersten Erkrankten einzuordnen (GOLD 4). Das frühere Stadium GOLD 0 (Risikopatienten) ist charakterisiert durch das Vorliegen der Symptome chronischer Husten und Sputumproduktion, bei noch normalen Werten der Spirometrie, insbesondere des Tiffeneau-Wertes. GOLD 0 wird in den aktuellen Klassifikationen nicht mehr als COPD-Stadium aufgeführt [1], jedoch wurden in die COSYCONET-Studie, die als Basis der vorliegenden Studie fungierte, gezielt auch solche Patienten aufgenommen.

Seit 2011 wird die COPD aufgrund der Vielschichtigkeit nicht mehr ausschließlich mittels der Lungenfunktionsprüfung, sondern auch im Hinblick auf Symptome und Exazerbationen beurteilt [6]. Die ehemaligen GOLD-Kriterien, basierend auf den Ergebnissen der Spirometrie, spielen nach wie vor eine wichtige Rolle, werden jedoch um entweder den COPD-Assessment-Test (CAT) oder einen Symptom Fragebogen (mMRC, modified Medical Research Council) sowie um die Exazerbationsfrequenz erweitert (Abb. 1.2).



A) Niedriges Risiko, wenig Symptome
GOLD 1-2
0-1 Exazerbation pro Jahr
mMRC 0-1 oder CAT <10

B) Niedriges Risiko, vermehrt Symptome
GOLD 1-2
0-1 Exazerbation pro Jahr
mMRC ≥ 2 oder CAT ≥10

C) Hohes Risiko, wenig Symptome
GOLD 3-4
≥ 2 Exazerbation pro Jahr
mMRC 0-1 oder CAT <10

D) Hohes Risiko, vermehrt Symptome
GOLD 3-4
≥ 2 Exazerbation pro Jahr

Abb. 1.2: Risikoeinschätzung der COPD gemäß den aktualisierten GOLD-Kriterien [6]

1.2 COPD und Komorbiditäten

Die Komplexität der COPD zeigt sich insbesondere in den häufig zu findenden Assoziationen mit weiteren Begleiterkrankungen. COPD-Patienten stellen eine sehr inhomogene Gruppe dar, wie dies in vielen Studien gezeigt werden konnte (z.B. [7]). Innerhalb einer gegebenen Schweregradeinteilung weisen die Patienten im Hinblick auf Symptome (Atemnot, Husten, Sputumproduktion), Exazerbationshäufigkeit, körperliche Leistungsfähigkeit und den allgemeinen Gesundheitszustand deutliche Unterschiede auf (z.B. [8]).

Komorbiditäten sind definiert als die Koexistenz anderer Krankheiten zusammen mit der Haupterkrankung [6]. Sie beschränken sich bei der COPD keineswegs auf Patienten im fortgeschrittenen Stadium, sondern werden gleichermaßen in den Subgruppen mit unterschiedlich ausgeprägten Funktionseinschränkungen bzw. Schweregraden gefunden (z.B. [7, 9]). Komorbiditäten können ihrerseits den Schweregrad der Erkrankung beeinflussen und sind mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert [10, 11]. In der Analyse der ECLIPSE-Kohorte beispielsweise wurde eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate von COPD-Patienten mit kardiovaskulären Beschwerden oder Diabetes beschrieben. Ferner beeinflusst die Anzahl an Begleiterkrankungen die Mortalität [12].

Neben Herz-/Kreislauferkrankungen und Diabetes kommen Erkrankungen wie Osteoporose, Mangelernährung mit Muskelschwund, metabolischen Störungen, psychischen Auffälligkeiten, kognitiven Beeinträchtigungen, Lungenkrebs, Anämie und Nierenfunktionsstörungen eine wichtige Rolle zu [9, 11, 12].

Die Prävalenz von Komorbiditäten bei COPD-Patienten ist auffallend hoch. Eine US-Studie konnte zeigen, dass 32,7% der untersuchten COPD-Patienten eine weitere Komorbidität aufwiesen und 39% sogar unter zwei oder mehr Begleiterkrankungen litten [13]. Im Hinblick auf sowohl die Gesamtmortalität, als auch speziell auf die kardiale Mortalität bei Rauchern und ehemaligen Rauchern, stellt bereits die Lungenfunktion alleine einen guten, unabhängigen Prädiktor dar [14]. Vermutlich ermöglicht FEV_1 nicht nur die Beurteilung von Veränderungen der Lunge, sondern reflektiert darüber hinaus strukturelle Prozesse, die mit einer biologischen Alterung der Lunge sowie des Gesamtorganismus einhergehen. Hinsichtlich der Assoziation mit der Mortalität war die Lungenfunktion etablierten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie BMI, Serum-Cholesterin oder Blutdruck als weniger beinflussbarer Prädiktor überlegen. Gleichwohl sind diese Faktoren wesentlich an der Entstehung eines metabolischen Syndroms beteiligt, das nicht selten zusammen mit einer COPD auftritt [14, 15]. Einige Daten weisen darauf hin, dass systemische Entzündungsreaktionen COPD-Patienten anfälliger machen für die Entwicklung einer Insulinresistenz und die daraus resultierenden metabolischen Störungen [16]. Umgekehrt sieht man innerhalb von COPD-Kollektiven einen Verlust an Körpergewicht gemessen anhand des BMI oder eine Veränderung der Körperzusammensetzung, die durch eine Reduktion der fettfreien Masse bzw. Muskelmasse charakterisiert ist. Mittels bioelektrischer Impendanzanalyse (BIA) lassen sich diese Veränderungen nachweisen [17]. Ferner ist eine COPD oft mit einem signifikanten Verlust an Knochenmasse oder einer Osteoporose assoziiert, unabhängig vom Gebrauch von Corticosteroiden oder dem Rauchverhalten [18, 19].

Viele der genannten Erkrankungen sind typischerweise Erkrankungen des höheren Lebensalters. Parallel damit werden Koordinationsfähigkeit und funktionelle Balance durch eine COPD ungünstig beeinflusst [20]. In diesem Kontext könnte auch eine Polyneuropathie eine Rolle spielen. Sowohl Studien an Tieren als auch Untersuchungen an Menschen belegen einen Zusammenhang zwischen Polyneuropathie und Lebensalter [21, 22]. In vergleichenden Studien von Patienten mit und ohne COPD wurde eine höhere Prävalenz der Erkrankung bei COPD-Patienten gefunden [23]. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Atemwegserkrankung und Polyneuropathie sich sowohl auf die Lebensqualität als auch die körperliche Belastbarkeit auswirkt [24]. Die Frage eines möglichen Zusammenhangs

zwischen vorzeitiger biologischer Alterung und Polyneuropathie ist derzeit ungeklärt, daher wird sie in der vorliegenden Arbeit ebenfalls adressiert.

Des Weiteren stehen chronische Erkrankungen wie COPD häufig in Beziehung zu Depressionen und Angststörungen, welche wiederum das Risiko der stationären Aufnahme ins Krankenhaus (Hospitalisierung) aufgrund der COPD erhöhen [25]. Der Gesamtzustand, abhängig vom Schweregrad der Erkrankung und der Exazerbationsfrequenz, ist mit Einschränkungen der Lebensqualität der Patienten assoziiert [26].

Aufgrund der Erkenntnis, dass Multimorbidität mit einer schlechteren Prognose [10] und erhöhten Behandlungskosten einhergeht [27], ist auch bei der COPD eine detaillierte Analyse der Komorbiditäten, ihrer Schweregrade und ihres zeitlichen Auftretens in Verbindung mit der Erkrankung der Lunge Gegenstand von Studien inklusive der Nationalen COPD-Kohorte COSYCONET [7, 28]. In verschiedenen Arbeiten wurden Cluster von Patienten mit wenig Komorbiditäten identifiziert, oder ein kachektisches Muster verbunden mit Osteoporose und Muskelschwäche, oder eine Häufung der COPD mit kardiovaskulären Veränderungen, ferner ein metabolischer Phänotyp und eine Gruppe mit psychologischen Auffälligkeiten [8, 29, 30].

1.3 COPD, Biomarker im Blut, Haut, Elektronische Nase

1.3.1 COPD und Biomarker im Blut

Ein wichtiger Faktor neben klinischen Manifestationen ist die Messung von Biomarkern, die darauf abzielen, entweder organbezogene Störungen oder eine systemische Entzündung nachzuweisen. Bisherige Daten bestätigen das Bestehen einer systemischen Entzündung bei Patienten mit COPD [31] sowie einen Zusammenhang zwischen systemischer Entzündung und einer Verschlechterung der Lungenfunktion [32]. Allerdings ist im Allgemeinen die Assoziation mit der systemischen Entzündung schwach und von großer Variabilität geprägt. Für die vorliegende Arbeit, deren Fokus auf der Evaluation verschiedener Alterungsmarker bei Patienten mit COPD liegt, ist von zentraler Bedeutung, dass Marker chronischer Entzündung teilweise auch als Marker einer biologischen Alterung gelten [33]. Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, dass chronische Erkrankungen wie die COPD mit einem vorzeitigen biologischen Altern einhergehen [34, 35]. Im Folgenden werden diejenigen, etablierten oder putativen, Alterungsmarker vorgestellt, die in dieser Arbeit analysiert

wurden. Zu Erkrankungen, die häufig mit Alterung sowie chronischen Entzündungsprozessen assoziiert werden, zählen neben der COPD andere, wie zum Beispiel Morbus Alzheimer oder Erkrankungen des Herzkreislauf-Systems [36-39]. Die Beziehung zwischen COPD, systemischer Entzündung und kardiovaskulären Erkrankungen ist auch deswegen von Bedeutung, weil Patienten oftmals nicht unmittelbar an der Lungenerkrankung, sondern aufgrund kardiovaskulärer Komplikationen versterben [40].

Telomerenlänge

Telomere sind Endkappen von Chromosomen und bestehen aus einer repetitiven DNA-Sequenz (5‘-3‘ TTAGGG), deren Funktion der Schutz der Chromosomen vor enzymatischem Abbau und die Wahrung der Stabilität darstellt. Während jeder Zellteilung verkürzen sich diese Endkappen bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Telomerenlänge eine kritische Länge unterschreitet (Hayflick-Limit); dies führt zur Seneszenz der Zelle oder zum Zelltod. Während dieser Prozess auch während des „normalen“ Alterns stattfindet, führt erhöhter oxidativer Stress [41], unabhängig von der Quelle, in einer Zelle zum beschleunigten Verlust von Telomeren. Die Telomerenlänge wurde vielfach als Marker des biologischen Alters und chronischer Entzündungsprozesse in Blutleukozyten verwendet [42, 43].

Antimikrobielles Peptid LL-37

Ein Biomarker, der sowohl mit Entzündung und Infektion als auch mit Telomerendysfunktion in Verbindung gebracht wird, ist LL-37. Es handelt sich hierbei um ein antimikrobielles Peptid des angeborenen Immunsystems aus der Klasse der Cathelicidine, das eine Abwehrfunktion gegen Bakterien, Viren, Pilze und andere Mikroorganismen besitzt [44]. Darüber hinaus fungiert LL-37 als Mediator während Infektionen, der neben chemotaktischen Eigenschaften auch die Proliferation von Epithelzellen fördern kann und einen stimulierenden Effekt auf die Freisetzung von Cytokinen ausübt [45].

Eine erhöhte Konzentration des Peptids in verschiedenen Biomaterialien konnte auch mit einer erhöhten Entzündungsaktivität in Verbindung gebracht werden. Außerdem gibt es eine Korrelation mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Triglyzeriden oder invers mit dem HDL-Cholesterol. Diese beiden Parameter gelten als bedeutsam in der Pathogenese der Atherosklerose [44, 46]. Bedeutung wird dem LL-37 in der Pathogenese der COPD insoweit beigemessen, dass eine Erhöhung seiner Konzentration zum Aufrechterhalten der Entzündung in der Lunge und dem Remodelling beitragen könnte, zwei Faktoren, die bei der

COPD eine wichtige Rolle spielen [47]. Eine positive Korrelation zwischen einem erhöhten LL-37-Spiegel und einer Steigerung der Schleimproduktion und Sekretion wurde gezeigt und wirkt sich auf die Symptome aus [48]. Als Biomarker für die Krankheitsaktivität und das Fortschreiten der Erkrankung könnte LL-37 interessant sein, zumal eine negative Korrelation zwischen der Proteinkonzentration und der Lungenfunktion, körperlichen Belastbarkeit und dem allgemeinen Gesundheitsstatus gezeigt wurde [47].

Neuere Arbeiten assoziieren LL-37 ebenfalls mit der biologischen Alterung; daher wurde dieses Peptid in der vorliegenden Arbeit gemessen. Unterschiedliche Konzentrationen an LL-37 konnten u.a. bei Telomerase-Knock-out-Mäusen (Mäuse, in denen gezielt kürzere Telomeren erzeugt wurden), sowie beim Menschen in Korrelation mit der Telomerendysfunktion bzw. dem Gesundheitszustand gezeigt werden [49].

Advanced Glycation End Products (AGE)

Bei der Maillard-Reaktion, bekannt aus der Lebensmittel-Branche, handelt sich um die nichtenzymatische Glykation einer freien Aminogruppe von Aminosäuren oder Peptiden mittels eines reduzierenden Zuckers [50]. Dabei entstehen Advanced Glycation End Products (AGE). Diese chemische Strukturveränderung von Proteinen kann deren Funktionsverlust bedeuten, ferner kann auch der proteolytische Abbau behindert sein, was in einer möglichen Akkumulation dieser Produkte resultiert [51]. Als wahrscheinlich gilt, dass durch AGEs verschiedene Signaltransduktionskaskaden (Abb. 1.3) aktiviert werden und zu erhöhtem oxidativen Stress in der Zelle oder Entzündungsreaktionen beitragen. Diese Wege führen häufig über die Aktivierung des nuclear factor-kappa Beta (NF-κB) zu einer erhöhten Transkription weiterer entzündungsrelevanter Marker [52].

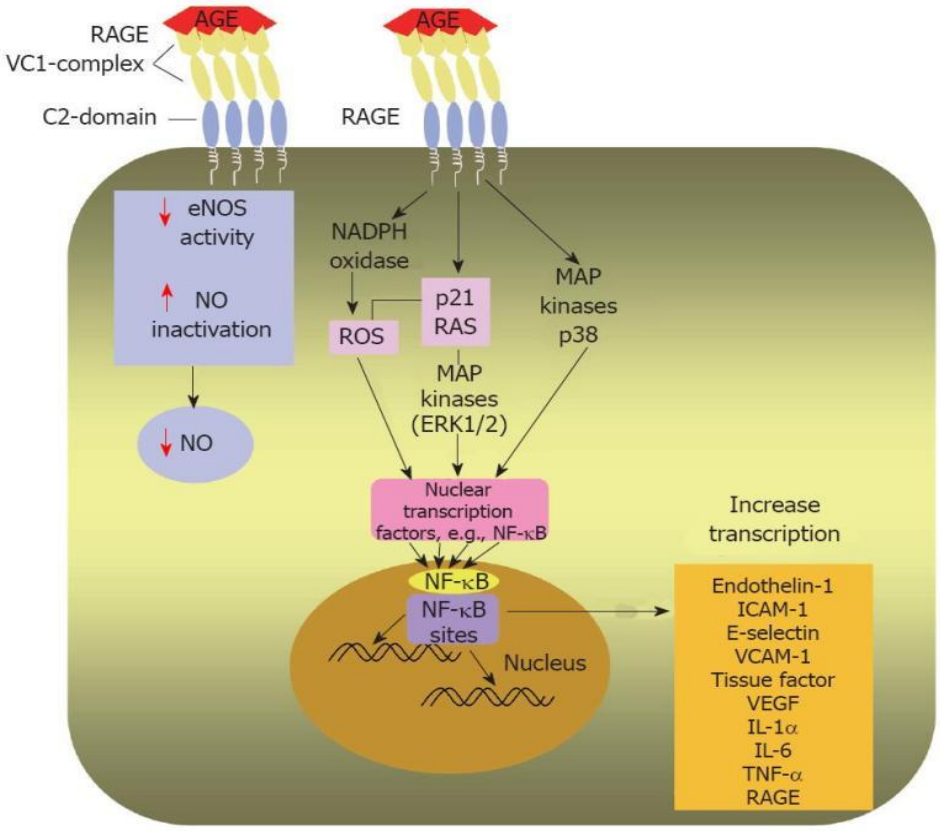


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade durch Bindung von Advanced Glycation End Products (AGE) an seinen zellständigen Rezeptor (RAGE) [53]. Diese Abbildung soll primär die Komplexität der Regulation verdeutlichen, die zu analysieren allerdings nicht der Gegenstand dieser Arbeit war, die sich mit den Beziehungen verschiedener Marker zueinander beschäftigte. Zu den verwendeten Abkürzungen siehe die angegebene Literaturstelle.

Zusammenhänge zwischen chronischer Entzündung und biologischem Alter liegen auch hier nahe, zumal im Drosophila-Modell AGEs als Biomarker der Alterung nachgewiesen wurden [54] und bei vielen altersabhängigen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson erhöhte Konzentrationen nachweisbar sind [51].

AGEs bzw. erhöhte Expression des AGE bindenden Rezeptors (RAGE) wurde ebenfalls mit der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung in Verbindung gebracht [55]. Im Maus-Modell mit bedingter Überexpression des RAGE im Lungengewebe konnte gezeigt werden, dass eine Vermehrung des Rezeptors zu einer Entzündung der Lunge und Zerstörung von Lungenparenchym führte [55]. Beide Merkmale sind kennzeichnend in der Pathogenese und Progression der COPD. Besonders die Zerstörung des Strukturproteins Elastin ist an der Entstehung eines Emphysems beteiligt [56]. Seine Zerstörung kann durch eine veränderte Expression des Proteins Matrix-Metallo-Proteinase-9 (MMP-9) hervorgerufen werden, AGEs

wiederum beeinflussen die Synthese von MMP-9 in Makrophagen über die Aktivierung von NF-κB in dosisabhängiger Konzentration [57].

Auf der Basis dieser Arbeiten erschien es sinnvoll, AGEs bei Patienten mit COPD zu messen. Derzeit liegt nur eine Arbeit vor, die AGEs und die Rezeptoren der AGEs (RAGE) in Gewebeschnitten aus Operationsresektaten zwischen Patienten mit und ohne COPD verglichen hat [58]. In der vorliegenden Arbeit wurden stattdessen Blutproben genommen, wie dies auch in Arbeiten zu anderen Erkrankungen der Fall war [59, 60].

1.3.2 COPD und Hautalterung

Bedeutend scheint ebenso die Erkenntnis, dass für AGEs ein schädigender Effekt auf Zellen anderer Gewebe, wie beispielsweise der Haut, gezeigt wurde. So wurde eine durch UV-Bestrahlung induzierte Hautalterung bei erhöhten Konzentrationen an AGEs beschleunigt, zum einen über eine Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies (oxidativer Stress; ROS) [61], zum anderen direkt durch eine AGE-RAGE-Komplexbildung und eine daraus resultierende Imbalance zwischen Aufbau und Abbau von extrazellulärer Matrix [62]. Ebenso wie AGE selbst, ist auch der Rezeptor wichtiger Bestandteil der Kaskade und kann die Transkription des Entzündungsfaktors NF-κB stimulieren. Diese Rezeptoren findet man in großer Anzahl in der menschlichen Haut; Bestrahlung von Hautzellen mit UV-Licht verstärkt die Expression [63]. Als wichtigste Faserproteine der extrazellulären Matrix sind Kollagen und Elastin zu nennen, deren Glykation zu veränderten biomechanischen Eigenschaften und funktionellen Einschränkungen der Haut führt, sowie zur längeren Persistenz gealterter Zellen [64-66]. Umbau- und Abbauprozesse der Strukturproteine werden von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) beeinflusst, weswegen diesen Enzymen eine entscheidende Rolle in der Fehlregulierung beigemessen wird.

Elastische Fasern sind nicht nur wichtiger Bestandteil der Matrix der Haut, sondern ebenfalls essentielle Strukturbildner der Lunge und von Blutgefäßen [67]. Erhöhte AGE-Konzentrationen konnten sowohl während des Alterungsprozesses, als auch bei Patienten mit Diabetes in verschiedenen Gewebearten festgestellt werden [68].

Zigarettenrauchen stellt eine exogene Quelle für AGEs dar. AGE-Konzentrationen im Gewebe von Rauchern waren höher als bei Nichtrauchern [69, 70]. Assoziationen wie diese dienen als Grundlage der Hypothese, dass alterungsassoziierten Veränderungen der Haut und der Lunge bei Rauchern ähnliche Ursachen zugrunde liegen [71]. Ferner besteht eine Assoziation

zwischen Arterienversteifung und Emphysem [72], die in einem Abbau von Elastin in den Gefäßwänden von Blutgefäßen oder der Lunge begründet liegen könnte [73]. Der systemische Abbau von Elastin durch Proteolyse (MMP) ist möglicherweise ein gemeinsamer Mechanismus, der zu frühzeitiger Alterung der Lunge, Gefäße und der Haut führt [73].

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine starke Faltenbildung der Gesichtshaut mit einem schlechteren FEV_1 sowie COPD bzw. Lungenemphysem einhergeht [74]. Die Hautalterung kann wenig invasiv oder sogar nichtinvasiv erfasst und mittels validierter Scores wie beispielsweise dem Daniell-Score [75] oder neueren Scores [76-82] beurteilt werden. Eine starke Faltenbildung im Gesicht von Rauchern könnte womöglich auf eine Prädisposition für eine COPD hinweisen [74].

1.3.3 COPD und Elektronische Nasen

Als vielversprechendes, nichtinvasives Verfahren gilt oft der Einsatz von Elektronischen Nasen. Hierbei soll ein Gerät herangezogen werden, um den Gehalt der Ausatemluft an flüchtigen Kohlenwasserstoffen (VOCs) zu analysieren [83]. Verschiedene Erkrankungen, sowohl der Lunge (Lungenkrebs, Asthma, COPD) als auch anderweitige (Diabetes, Herzversagen), konnten bereits mittels Elektronischer Nasen detektiert und teilweise innerhalb der untersuchten Gruppen differenziert werden [84-88]. Sowohl die Detektion bestimmter Biomarker, als auch das Erfassen von Profilen („Breathprints“) sind möglich [89, 90]. Beide Ansätze wurden genutzt, um COPD-Patienten von Gesunden zu unterscheiden oder innerhalb der COPD-Patienten Subtypen abzugrenzen. Diese Unterscheidungen sowie die Erkenntnis, dass Ausatem-Profile als Biomarker für systemische Veränderungen sowie Veränderungen der Lunge dienen könnten, unterstreichen einen möglichen diagnostischen Wert derartiger nichtinvasiver Messungen [90]. Systemische Entzündungsreaktionen und unentdeckte Komorbiditäten sind für den klinischen Status des Patienten wichtig, können jedoch oft mit den verfügbaren Mittel in der Routine nicht ausreichend abgeklärt werden. Interessante Phänotypen, wie der Exazerbations-Typ oder der Sputum-positive Eosinophile Patient (Steroid-Resistenz), konnten mittels Elektronischer Nasen bereits identifiziert werden [91].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig untersucht, inwieweit die Ausatemprofile, die mit einem verbreiteten Typ von Elektronischer Nase gewonnen wurden, in Beziehung zu Markern der biologischen Alterung stehen.

1.4 COSYCONET (German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network)

Marker entzündlicher Prozesse oder vorzeitiger Alterung könnten ebenso wie Komorbiditäten dazu beitragen, COPD-Patienten in Subgruppen einzuteilen, sind allerdings noch weit von der tatsächlichen Implementierung in die Diagnostik entfernt [29, 92]. Die genauere Phänotypisierung von Patienten mit COPD scheint jedoch sinnvoll, um eine zielgerichtete Therapie und eine bessere Vorhersage der Erkrankung zu ermöglichen [93]. Dies kann in der Breite nur mittels klinisch praktikabler Methoden erfolgen. Die Nationale COPD-Kohorte COSYCONET, die in 30 Studienzentren in Deutschland etabliert wurde und longitudinal verfolgt wird, hat das Ziel, eine umfassende Analyse der Komorbiditäten und des Krankheitszustandes von Patienten mit COPD zu leisten. Der Schwerpunkt liegt zum einen auf einer genauen Phänotypisierung der Patienten, zum anderen auf einer Analyse des zeitlichen Verlaufs der Lungenerkrankung und der Komorbiditäten sowie ihrer potentiellen Interaktionen. Es ist klar, dass eine derartige Analyse nur mit Hilfe einer sehr großen Kohorte erfolgen kann; aus diesem Grunde wurden bis Ende 2013 insgesamt 2741 Patienten in COSYCONET eingeschlossen.

Neben dem umfassenden Standardprogramm von Messungen war es den Studienzentren möglich, eigene zusätzliche Messungen zu implementieren, um mit Hilfe der lokalen Subkohorten eigene Fragestellungen zu bearbeiten. Im Studienzentrum LMU München wurde die Frage verfolgt, welche Assoziationen eine Reihe von Markern der biologischen Alterung untereinander sowie mit klinischen Charakteristika der Patienten aufweisen. Diese Fragen schienen mit einem Datensatz von bis zu n=127 Patienten der lokalen Kohorte beantwortbar. Diese lokale Kohorte wurde unter der Federführung der Abteilung für Pneumologie (Prof. Dr. Rudolf Maria Huber, Leiter der Sektion Pneumologie Innenstadt u. Thorakale Onkologie) sowie dem Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin (PD Dr. Rudolf A. Jörres, Prof. Dr. Dennis Nowak) aufgebaut, in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Kardiologie (Dr. Philip Jung, PD Dr. Dr. Hae-Young Sohn). Das Standardmessprogramm von COSYCONET auf der einen Seite, sowie die im Folgenden beschriebenen besonderen Messungen auf der anderen Seite inklusive der molekularbiologischen und biochemischen Analysen waren der Gegenstand dieser Doktorarbeit. Hierbei konnte auf Vorarbeiten von seitens Frau Dipl.-Biol. Marietta Truger

und Herrn Dr. Stefan Karrasch, die die Studie im Zentrum LMU München implementiert hatten, zurückgegriffen werden. Die Messungen mit der Elektronischen Nase wurden von Frau CTA Angelika Kronseder in enger Absprache mit dem restlichen Untersuchungsablauf erstellt und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Auf der Basis der vorstehend beschriebenen Überlegungen zu verschiedenen Alterungsmarkern wurde in der LMU-Subkohorte speziell die Telomerenlänge von Blutleukozyten sowie die Konzentrationen von AGEs und LL-37 im Blut gemessen, ferner die Hautalterung des Gesichtes anhand von Fotos erfasst. Das Vorliegen eines Emphysems wurde entweder anhand von CTs des Thorax beurteilt, die aus klinischen Gründen erstellt worden waren, oder anhand einer Vorhersagefunktion, die für den Gesamtdatensatz von COSYCONET errechnet worden war. Als Komorbidität wurde speziell die Polyneuropathie mit einem erweiterten Satz von Messparametern untersucht, da hierfür keine Informationen in Hinsicht auf Alterungsmarker vorlagen. Gleiches galt für die Messung mit Hilfe einer Elektronischen Nase, ebenfalls mit dem Fokus auf einer potentiellen Assoziation mit Alterungsmarker.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war, dass in ihr Daten gewonnen werden sollten, die für die künftige Planung von COSYCONET bedeutsam waren. COSYCONET beinhaltet nämlich als eine der Fragestellungen die Analyse einer (vorzeitigen) biologischen Alterung, jedoch werden dazu in der Gesamtkohorte derzeit nur Blutproben für die Telomeren-Analyse gesammelt. In der vorliegenden Studie sollte daher auch eruiert werden, welche anderen potentiellen Marker einer biologischen Alterung zum einen aussagekräftig, zum anderen praktikabel waren. Daher werden die Ergebnisse dieser Arbeit derzeit (Februar 2015) auf ihre Übertragbarkeit auf die Gesamtkohorte geprüft. Die Messung der Polyneuropathie, die in dieser Arbeit an der Subkohorte der LMU aufgebaut wurde, wurde bereits zu einem Teil in das Untersuchungsprogramm der Gesamtkohorte überführt.

2 Fragestellung

Auf der Basis der vorstehenden Überlegungen hatte die vorliegende Untersuchung folgende Fragen zum Gegenstand.

1. In welcher Beziehung stehen die biologischen Alterungsmarker der Telomerenlänge von Blutleukozyten und der Konzentration von AGEs und LL-37 im Blut zu den klinischen Charakteristika der Patienten, insbesondere dem Schweregrad der COPD sowie dem Vorliegen eines Emphysems?

2. Findet sich ein Zusammenhang zwischen den phänomenologischen Markern der Hautalterung und dem Schweregrad einer COPD oder dem Vorliegen eines Lungenemphysems?

3. Wie sind die Korrelationen zwischen den genannten molekularen bzw. biochemischen Alterungsmarkern und dem phänomenologischen Marker der Hautalterung und hängen diese Korrelationen von Charakteristika der COPD bzw. Komorbiditäten ab?

4. Gibt es im Rahmen der Möglichkeiten, die durch einen Stichprobenumfang von n≤127 gegeben sind, Komorbiditäten, die mit den genannten Alterungsmarkern in Beziehung stehen? Zeigen die Messgrößen der Polyneuropathie einen Zusammenhang mit den verschiedenen Alterungsmarkern?

5. Sind die verschiedenen Alterungsmarker mit den Profilen ausgeatmeter, flüchtiger Kohlenwasserstoffe assoziiert, die nichtinvasiv mit Hilfe einer Elektronischen Nase gemessen werden?

3 Methoden

3.1 Beschreibung COSYCONET

Die COSYCONET-Studie (German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network) beschäftigt sich mit dem Einfluss systemischer Manifestationen und Komorbiditäten auf den klinischen Zustand und Verlauf bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung.

Um Informationen über sowohl den aktuellen Zustand der Patienten als auch über den Verlauf zu erhalten, unterzogen diese sich bei einer initialen Visite sowie zwei Folgevisiten 6 und 18 Monate nach Einschluss einer Reihe von Funktionstests und Befragungen. Diese bildeten neben der Lungenfunktion den Zustand des Herz-Kreislauf-Systems, den metabolischen und mentalen Status sowie die körperliche Leistungsfähigkeit ab. Zusätzlich wurden aus Blutproben Marker der systemischen Entzündung und der Alterung bestimmt. Klassische Laborparameter (Fette, Blutzucker u.Ä.), sowie ein Blutbild und organspezifische Marker wurden direkt im Kliniklabor analysiert.

Für den Einschluss/Ausschluss eines Patienten in die Studie mussten die folgenden Aufnahmekriterien erfüllt sein.

3.1.1 Einschlusskriterien

1) männlich oder weiblich
2) Mindestalter 40 Jahre
3) Diagnose einer COPD gemäß den GOLD-Leitlinien (oder wenn eine der Fragen des Aufnahmefragebogens nach chronischem Husten/Bronchitis bejaht werden konnte)
4) schriftliches Einverständnis vor Einschluss
5) Fähigkeit, die Anforderungen des Studienprotokolls physisch und geistig zu erfüllen
6) voraussichtlich verfügbar über die Studiendauer von 18 Monaten und bereit zu insgesamt mindestens 3 Visiten

3.1.2 Ausschlusskriterien

1) Zustand nach lungenchirurgischem Eingriff (z.B. Lungenvolumenreduktion um mehr als die Hälfte der Lunge, Lungentransplantation)

2) Patienten mit bekannten Tumorerkrankungen der Lunge
3) Mittel- bis schwergradige Exazerbation in den letzten 4 Wochen vor Einschluss (orale Corticosteroide, Antibiotika und/oder Krankenhausaufnahme erforderlich)
4) Unfähigkeit zu gehen oder die Zielsetzung des Projektes zu verstehen

Im Folgenden wird der Untersuchungsablauf der ersten Visite genauer beschrieben. Weitere Details finden sich in den SOPs der COSYCONET-Studie.

3.1.3 Befragung

1) Anamnese/Vitalparameter (Liste häufiger Komorbiditäten, Familienanamnese, Raucheranamnese, Inanspruchnahme von Gesundheitsleistungen)
2) Demographie (Basisdaten, Beruf, vorangegangene Exposition, Berufskrankheiten)
3) Medikation (aktuelle Medikation und Einnahmemodalitäten, Medikationshistorie)
4) Atemnot (mMRC – modified Medical Research Council)
5) Beurteilung der COPD (CAT – COPD Assessment Test)
6) Lebensqualität (SGRQ 18 – St George's Respiratory Questionnaire, EQ-5D – EuroQol)
7) Körperliche Aktivität (IPAQ – International Physical Activity Questionnaire)
8) Angst (PHQ-D – Patient Health Questionnaire)
9) Osteoporose (FRAX – Fracture Risk Assessment Tool)

Das Abfragen der Komorbiditäten erfolgte mittels strukturierten Fragebogens (siehe Anhang 7.1). Ebenso verhielt es sich für alle weiteren Befragungen sowie die Erhebung der Raucheranamnese (siehe Anhang 7.1). Für die vorliegende Arbeit waren neben der Anamnese, der Medikationshistorie und der Raucheranamnese insbesondere der CAT und der mMRC-Fragebogen von Bedeutung. Diese finden sich ebenfalls im Anhang (siehe Kap. 7.1).

Die Dokumentation der aktuellen Medikation erfolgte mit Hilfe eines strukturierten Erfassungsbogens (siehe Anhang 7.1). Um sicherzustellen, dass die verordneten Medikamente und deren Stärke mit den Angaben der Patienten übereinstimmten, waren die Patienten dazu angehalten, bei jeder Visite alle Packungen der eingenommenen Medikamente mitzubringen.

3.1.4 Funktionsmessungen

1) Anthropometrie (Größe, Gewicht, Bauchumfang, Oberschenkelumfang)

2) Post- bronchodilatative Ganzkörperplethysmographie
3) Post-bronchodilatative forcierte Spirometrie
4) Post-bronchodilatative CO-Diffusionskapazität
5) Blutdruck/Knöchel-Arm-Index
6) 6-Minuten-Gehtest
7) Timed-up-and-Go-Test
8) Kognitive Beeinträchtigung (DemTect)
9) Bioimpedanz
10) Blutgase (pO_2, pCO_2, pH, BE)
11) Blutentnahme
12) Ruhe-EKG
13) Ruhe-Echokardiographie

Im Folgenden werden die Messungen genau beschreiben, die für die Datenauswertung und das Verfassen dieser Arbeit wichtig erschienen. Messungen, die zwar durchgeführt aber für die Datenauswertung dieser Arbeit unerheblich waren, finden sich im Anhang Kap. 7.2.

Anthropometrie

Für die Messung des Körpergewichtes benötigte es eine geeichte Körperwaage. Der Patient wurde gebeten, vor der Messung schwere Kleidungsstücke und die Schuhe abzulegen. Die Messung der Körpergröße erforderte eine Messlatte. Der Patient stand zum Erfassen der Größe aufrecht und hielt den Kopf gerade. Die Parameter Größe und Gewicht wurden zur Berechnung des Body-Mass-Index (BMI) herangezogen.

Die Messung der Taille/des Bauchumfangs erfolgte im Stehen und mit freiem Oberkörper unter zu Hilfenahme eines Maßbandes. Die Messung des Umfangs erfolgte an der schmalsten Stelle zwischen dem untersten Rippenbogen und dem oberen Rand des Beckenknochens. Die Messung des Hüftumfangs erfolgte ebenfalls mittels Maßband. Zur Messung wurde das Band an der stärksten Stelle der Hüfte angelegt und zwar auch im unbekleideten Zustand. Der Quotient aus Taille zu Hüfte wird im medizinischen Bereich als Waist-to-Hip Ratio bezeichnet und beschreibt die Verteilung des Körperfetts auf Taille und Hüfte.

Lungenfunktion

Die Durchführung der Ganzkörperplethysmographie und Ruhespirometrie dienten der Bestimmung verschiedener statischer Lungenvolumina und des Atemwegswiderstandes (gemessene Parameter s.u.). Verwendet wurde das Gerät *MasterLab* der Firma Erich Jaeger. Es wurde vor jeder Messung kalibriert. Bevor ein Proband zur Funktionsprüfung in die Messräume der Lungenfunktion gebeten wurde, erfolgte eine Bronchodilatation, mit kombinierter Inhalation von 400 µg Salbutamol und 80 µg Ipratropiumbromid. Zwischen der Messung und der Dilatation lagen mindestens 30 Minuten und höchstens 2 Stunden. Die eigentliche Messung wurde gemäß der ERS/ATS Guidelines durchgeführt [94]. Bei den gemessenen Parametern handelte es sich um den totalen Atemwegswiderstand (sRtot), den effektiven Atemwegswiderstand (sReff), das Intrathorakale Gasvolumen (ITGV), das Exspiratorische Reservevolumen (ERV), die Inspiratorische Vitalkapazität (IVC), die Totale Lungenkapazität (TLC), das Residualvolumen (RV) und die Inspiratorische Kapazität (IC).

Die forcierte Spirometrie und die Bestimmung der Fluss-Volumen-Kurve im Anschluss an die Ruhespirometrie dienten der Charakterisierung der Atemwegsobstruktion. Hierzu kam das Gerät *MasterScreen* der Firma Erich Jaeger zu Einsatz. Auch hier erfolgte die Messung gemäß den ERS/ATS Guidelines [95]. Notiert wurden die Parameter Forcierte Vitalkapazität (FVC) und Forciertes Einsekundenvolumen (FEV_1).

Das Messen der Diffusionskapazität der Lunge für das Gas CO (Kohlenmonoxid; TLCO) diente der Messung des Sauerstoffaufnahmevermögens der Lunge. Es wurde überprüft, wie gut CO aus der Einatemluft ins Blut übertreten konnten. Als Messgerät diente der *MasterScreen Diffusion* der Firma Erich Jaeger. Die Messung erfolgte ebenfalls postbronchodilatotorisch, und ebenfalls wurden die entsprechenden Guidelines befolgt [96]. Erfasst wurden die Parameter Transferfaktor für CO (TLCO) und das Alveolarvolumen (VA).

Knöchel-Arm-Index

Die Bestimmung des Knöchel-Arm-Index (Ankle-Brachial-Index (ABI)) diente der nicht invasiven Erfassung möglicher vaskulärer Veränderungen. Es wurde das Gerät VASCASSIST der Firma Isymed GmbH benutzt. Der Patient musste die Oberarme sowie Unterschenkel freimachen und sich sodann auf eine Liege legen. Nach 10-minütiger Ruhepause wurden die dem Patienten passenden Manschetten angelegt. Die Markierungen befanden sich dabei jeweils direkt über den Arterien, also den Oberarmarterien und Knöchelarterien. Die

Manschetten pumpten sich automatisch auf und erfassten die Systole, Diastole und Herzrate in den vier Extremitäten. Der Knöchel-Arm-Index wurde vom Gerät errechnet und als Messwert notiert, genau wie die Einzelwerte. Durch erneutes Aufpumpen der Manschetten konnte das Gerät in einem zweiten Schritt die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) bestimmen.

6-Minuten-Gehtest

Der 6-Minuten-Gehtest (6MWD) diente der Evaluation der körperlichen Leistungsfähigkeit und ist Bestandteil der Berechnung des BODE Scores (Body mass index, airflow Obstruction, Dyspnea and Exercise capacity). Durchgeführt wurde der Test auf einem ruhigen Gang. Die Gehstrecke von 30m Länge war an Start und Ende markiert. Der Patient wurde in die korrekte Durchführung instruiert und durfte vor Beginn einige Minuten ruhen. Gehhilfen sowie das Mitführen von Sauerstoff waren erlaubt und wurden vom Untersucher notiert. Vor und nach dem Test sollte der Patient das Ausmaß der Atemnot anhand der BORG Skala von 0-10 einschätzen (0=überhaupt keine Atemnot, 10=maximale Atemnot). Diese Werte, sowie die Gehstrecke in [m] nach 6-minütiger Gehzeit wurden notiert.

Timed-Up-and-Go-Test

Der Timed-Up-and-Go (T&go) Test hat seinen Ursprung in der Geriatrie als einfacher Mobilitätstest zur Beurteilung der Beweglichkeit bzw. des Körpergleichgewichts. Benötigt wurden ein Stuhl mit Armlehnen sowie ein ruhiger Gang, in dem eine Strecke von 3m gut sichtbar markiert werden konnte. Der Stuhl stand direkt auf Höhe einer der beiden Markierungen. Der Patient wurde aufgefordert, auf Kommando aufzustehen, zur zweiten Markierung zu gehen, zu wenden und erneut Platz zu nehmen. Es wurde im Vorfeld erläutert, dass dies so schnell wie möglich erledigt werden sollte. Die benötigte Zeit wurde mittels Stoppuhr erfasst und notiert. Der schnellste aus drei Versuchen wurde gewertet.

DemTect

Der Demenz-Detektion-Test (DemTect) sollte helfen, kognitive Beeinträchtigungen des Patienten zu erkennen. Es handelt sich um ein validiertes Befragungsinstrument, welches einer standardisierten Durchführung und Auswertung bedarf. Der Fragebogen, sowie die verwendeten Umrechnungs- und Auswertungstabellen findet sich im Anhang (Kap. 7.1).

Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte mittels Punktion einer oberflächlichen Vene. In der Regel handelte es sich hierbei um die Ellenbeugenvene, in einigen Fällen wurden auch andere Venen punktiert. Es wurde einmalig eine Flügelkanüle gelegt und anschließend wurden über zwei verschiedene Abnahmesysteme mehrere Röhrchen entnommen. Für das Labor des Klinikums wurden EDTA und Heparin-Röhrchen benötigt. Für die Biomaterialbank der Studie bedurfte es EDTA-Blut, Citrat-, Serum-, P100 und PAXgene-Röhrchen. Die Blutproben wurden direkt nach der Entnahme gemischt und wie in Standard Operating Procedures (SOPs) vorgeschrieben weiterbehandelt. Für die gegenwärtige Studie waren nur die Klinikums-Werte von Interesse. Es erfolgte die Bestimmung der folgenden Laborwerte: Kreatinin Blut [mg/dl], Harnsäure [mg/dl], Harnstoff-N [mg/dl], Kreatinin Urin [mg/dl], Gesamtcholesterin [mg/dl], Triglyzeride [mg/dl], LDL [mg/dl], HDL [mg/dl], CRP [mg/dl], Leukozyten [10^9/l], Erythrozyten [10^12/l], Hämoglobin [g/dl], Hämatokrit [l/l], Thrombozyten [10^9/l], Segmentierte [%], Eosinophile [%], Basophile [%], Monozyten [%], Lymphozyten [%], Glucose [mg/dl], HbA1c [%] und Alpha-1-Antitrypsin [mg/dl].

Alle Fragenbögen und Untersuchungen wurden grundsätzlich in Anlehnung an die Standard Operating Procedures (SOPs) der COSYCONET-Studie durchgeführt. Diese SOPs standen den Studienzentren von Beginn an zur Verfügung und enthalten Beschreibung der Untersuchungsabläufe sehr detailliert.

3.2 Rekrutierung

Als Grundlage für das Patientenkollektiv dienten die im Rahmen der COSYCONET-Studie rekrutierten Patienten. Diese wurden teils über niedergelassene Pneumologen rekrutiert, teils mittels einer Zeitungsanzeige. Ferner wurden Probanden aus der Region, die sich in der Studienzentrale Marburg gemeldet hatten, sowie Probanden aus Selbsthilfegruppen, die auf die Studie aufmerksam geworden waren, in das Projekt aufgenommen. Die Rekrutierungsphase erstreckte sich von September 2011 bis Januar 2014, wobei Patienten vor dem 15.03.2012 von zwei anderen Untersuchern eingeschlossen wurden. Die Daten wurden von den jeweiligen Untersuchern der LMU für weitere Auswertungen überlassen.

Insgesamt kamen an der LMU München 151 Patienten für die Studie in Frage, wobei von 127 Probanden zusätzliche Daten erhoben wurden, die für diese Studie relevant sind. Einwilligungserklärungen lagen sowohl für die Gesamtstudie als auch die Substudie vor. Die lokale Studie, die Gegenstand dieser Arbeit ist, wurde von der Ethikkommission der LMU München (Vorsitz: Prof. Dr. Eisenmenger) als unbedenklich befunden. Ebenso wurde das Basisprogramm von COSYCONET von der Ethikkommission der Universität Marburg als unbedenklich befunden und erhielt im Anschluss daran ein positives Votum der Ethikkommission der LMU München.

Visiten

Die Patienten absolvierten während des Zeitraums der Studie in der Regel mehrere Visiten. Nicht zu allen Zeitpunkten konnten alle Untersuchungen durchgeführt werden, sei es aus Gründen des Studienprotokolls oder aus Zeitgründen oder weil Geräte nicht verfügbar waren. Daher mussten Daten verschiedener Visiten miteinander kombiniert werden. Diese Kombination erfolgte so, dass zum einen möglichst viele Daten von einer einzigen Visite Eingang fanden, zum anderen kombinierte Daten einen möglichst geringen Zeitabstand aufwiesen, zum dritten die zu erwartende Stabilität von Parametern über die Zeit berücksichtigt wurde. Für Korrelationen mit den Parametern, die Gegenstand dieser Studie sind, wurden nur einige Untersuchungen aus dem COSYCONET Spektrum herangezogen, die für die Fragestellung besonders bedeutsam waren. Hierbei handelte es sich um die anamnestischen Angaben zu Komorbiditäten und der Medikation, die anthropometrischen Messgrößen BMI, Bauchumfang und Waist-to-Hip Ratio, die Raucheranamnese, den CAT, den mMRC, den DemTect, den Gehtest und den Timed-up-and-Go-Test, die Lungenfunktionsparameter, die Laborparameter, die Werte der ABI-Messung und den BODE-Score.

Als Referenz der Visitenauswahl galt der Zeitpunkt, zu dem die Blutprobe entnommen wurde, die für die Analyse der biologischen Alterungsmarker Verwendung fand. Alle anderen Daten, soweit verfügbar, wurden ebenfalls von dieser Visite genommen. Waren Daten nicht verfügbar, wurden diejenigen vom am nächsten liegenden Zeitpunkt genommen. Mit dieser Vorgehensweise wurde versucht, Marker, bei denen relativ große Variationen von Visite zu Visite nicht auszuschließen sind (z.B. Blutmarker) zum möglichst gleichen Zeitpunkt zur

Verfügung zu haben, hingegen für Marker, die eher über die Zeit stabil sind (z.B. Hautbeschaffenheit) eine gewisse zeitliche Abweichung zuzulassen.

Über die Proben hinaus, die im Rahmen von COSYCONET vorgeschrieben waren, wurden folgende Daten bzw. folgendes Material gesammelt.

1) 2,7 ml EDTA-Blut zur Bestimmung der Telomerenlänge
2) 8,5 ml Blut mit dem Entnahmesystem BD P100™ (Plasmagewinnung) zur Bestimmung des LL-37 (potenzieller Marker für Alterung und Entzündung auf Protein-Ebene)
3) 7,5 ml Blut zur Gewinnung von Serum zur Bestimmung der AGEs
4) Fotografische Aufnahmen von beiden Augenwinkelregionen unter standardisierter Beleuchtung, die semiquantitativ hinsichtlich Faltentiefe und Faltenausdehnung analysiert wurden
5) Neurologische Untersuchungen an den unteren Extremitäten zur Erfassung einer möglichen Polyneuropathie
   - Prüfung der Pallästhesie mittels Rydel-Seiffer-Stimmgabel
   - Prüfung der taktilen Ästhesie mittels Monofilament nach Semmes-Weinstein (Twin-Tip®)
   - Prüfung der Thermästhesie (Twin-Tip® Tip-Therm)
   - Untersuchung der Nervenleitgeschwindigkeit und Amplitude des *N. suralis* mittels NC-stat® DPNCheck (Neurometrix)
6) Analyse der Ausatemluft der Probanden auf ihren Gehalt an flüchtigen Kohlenwasserstoffen (VOCs) mittels Elektronischer Nase Cyranose® C320

Die einzelnen Untersuchungsaspekte werden im Methodenteil noch ausführlich erläutert.

3.3 Fotografische Aufnahmen der Haut und deren Auswertung

Während einer der drei Visiten wurde von den Patienten eine Profilaufnahme bzw. Halbprofilaufnahme erstellt. Fotografiert wurde immer mit derselben Kamera (Sony Cybershot, 10 x Optical Zoom - Zeiss, 10,1 MegaPixel, DSC-H20) und zwar immer unverändert im P-Modus (Programmautomatik). Um standardisierte Aufnahmen zu erhalten, war die Kamera für jedes Foto auf ein höhenverstellbares Stativ montiert. Ferner fand ein indirekter Blitz zwecks möglichst gleichmäßiger Beleuchtung Anwendung. Für die

quantitative Bewertung der Falten erhielt jeder Proband ein 5x5 mm Gittermaß beidseitig auf die Wangen geklebt. Dabei wurde darauf geachtet, dass dadurch keine Falten verdeckt wurden. Die Probanden wurden sowohl von rechts als auch von links abgelichtet.

Trotz der Bemühung, standardisierte Lichtverhältnisse zu schaffen, bestand kein Einfluss auf das durch den Vorhang einfallende Tageslicht, sowie den erfolgten Austausch einer Leuchtröhre im Untersuchungszimmer während des Untersuchungszeitraums. Für die Anpassung wurden eine Autokorrektur der Bilder (JPEG-Format) im Programm Picasa 3 vorgenommen. Die Anwendungsoptionen „Auf gut Glück“ (Ein-Klick-Optimierung für Beleuchtung und Farbe) und „Kontrast“ (Belichtung ohne Auswirkung auf die Farbe optimieren) wurden für jedes Bild herangezogen. Abb. 3.1 dient als Beispiel für die gemachten Fotografien.

Abb. 3.1: Beispielfotografie für die Analysen der Hautbeschaffenheit

Die Hautalterung der Probanden wurde anhand der Aufnahmen geschätzt. Die Auswertung der Fotografien erfolgte verblindet durch Frau Prof. Dr. med. Martina Kerscher (Fakultät für Chemie, Abteilung Biochemie und Molekularbiologie, Fachrichtung Kosmetikwissenschaft, Universität Hamburg), die eine Untersucherin mit langjähriger Erfahrung in dieser Form der Auswertung ist und an der Erstellung entsprechender Empfehlungen beteiligt war [76, 77, 79-82]. Sie schätzte das Alter der Probanden und beurteilte sowohl die nasolabialen (NL), als auch die periorbitalen (PO) Falten (Krähenfuß-Region) und teilte diese in Schweregrade von 0-4 (0=keine Falten; 4=schwere Falten) ein. Hierzu wurden validierte Scores verwendet [76-79, 81, 82]. Die spontane Altersschätzung und die Schweregradeinteilung erfolgten nach ähnlichen Kriterien.

3.4 Alterungsmarker im Blut

3.4.1 Etablieren der Telomeren-Messung nach Cawthon

3.4.1a Probenentnahme bzw. Aufreinigung der Proben

Für die Messung der Telomerenlänge wurde venöses EDTA-Blut entnommen und anschließend bei -80°C kryoasserviert. Das Blut wurde erst unmittelbar vor der geplanten Telomerenlängenmessung aufgetaut und aufbereitet. Zur Aufreinigung der DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit, der Firma Qiagen gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen DNA wurde diese direkt im Anschluss per UV-Spektroskopie vermessen. Akzeptiert wurde die Reinheit der DNA, wenn der Quotient A_{260}/A_{280}, wie im Herstellerprotokoll angegeben, gerundet auf eine Nachkommastelle 1,7 oder mehr betrug. Proben, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden erneut aufgereinigt, bis sie den Anforderungen entsprachen.

3.4.1b Prinzip der Messung der Telomerenlänge nach Cawthon (monochrome multiplex quantitative PCR (MMQPCR))

Cawthon beschrieb 2002 erstmals die Messung der relativen Telomerenlänge mittels qPCR [97]. Die Idee ist, den Faktor zu bestimmen, um welchen das Verhältnis Telomere/Single Copy Gene von der Referenz-DNA abweicht. Die Werte für T (Telomerenlänge) und S (Single Copy Gene) erhält man, indem man eine Standardkurve mittels beliebig gewählter DNA (eine bekannte DNA oder auch Pool-DNA aus verschiedenen bekannten DNA-Proben) durch serielle Verdünnungen erstellt und anschließend betrachtet, welche Menge an Probe anhand der gemessenen Zykluszahl und der Standardkurve (Standardkurven-Methode), berechnet werden kann. In der Regel nutzt man die Gerätesoftware, um diese Werte anhand der Standardkurve automatisch bestimmen zu lassen.

Essentiell für eine präzise Bestimmung der Telomerenlänge ist die Normalisierung der Proben mittels Single Copy Gene (SCG). Als SCG bezeichnet man eine Sequenz, die im haploiden Genom einzigartig ist und somit nur einmal pro Zyklus hochamplifiziert werden kann. Das T/S-Verhältnis bezeichnet demnach die durchschnittliche Telomerenlänge pro Zelle. Beträgt das gemessene T/S-Verhältnis 1, so gibt es keine relativen Längenunterschiede der Telomeren der Referenz-DNA und der unbekannten DNA. Werte kleiner als 1 zeigen im

Verhältnis zur Referenz kürzere Telomeren an, während ein Quotient größer als 1 längere Telomeren vermuten lässt. Auf diese Weise können Vergleiche gezogen werden.

Hinter dem Begriff *monochrome multiplex quantitative PCR* verbirgt sich das Verfahren, mittels quantitativer real-time PCR und nur einem DNA-interkalierenden Farbstoff zwei Zielsequenzen im selben Ansatz zu ermitteln. Im Jahr 2009 beschrieb Cawthon erstmalig diese Methode [98]. Pipettierungenauigkeiten gelten häufig als Grund für inakkurate Bestimmungen. Durch das gemeinsame Vorhandensein der Zielsequenzen (Telomere und SCG) im selben Ansatz kann diese Fehlerquelle effektiv beseitigt werden. Ferner erhöht sich der Durchsatz und die Kosten werden reduziert.

Obligatorisch für die parallele Detektion der Zielsequenzen in einem Versuchsansatz ist, dass eine Sequenz deutlich im Überschuss vorliegt. Für die Amplifikation bedeutet dies, dass sich die überschüssige Sequenz wesentlich früher vom Hintergrund über den Schwellenwert (Ct=Cycle threshold; in den automatisch generierten Standardkurven als Cq bezeichnet (y-Achse)) abhebt und dass sie Fluoreszenzsignale bei früheren Zykluszahlen als die weniger stark vertretene Sequenz generiert. Da es sich bei Telomeren um repetitive Sequenzen (5‘-3‘ TTAGGG) handelt und diese somit im Vergleich zum Single Copy Gene, welches pro haploidem Genom nur einmal vorliegt, wesentlich häufiger generiert werden, sind diese Bedingungen erfüllt.

Um eine Differenzierung der Messsignale erzielen zu können, werden die Produkte bei unterschiedlichen Temperaturen erfasst. Das Signal des ersten Produktes wird bei moderater Temperatur akquiriert, das Signal des zweiten Produktes bei hohen Temperaturen, deutlich oberhalb der Schmelztemperatur des ersten Zielproduktes. Die hohe Temperatur des zweiten Produktes garantiert die Denaturierung des vorher entstandenen Erzeugnisses. Dieses liegt dann wieder einsträngig vor und kann kein Fluoreszenzsignal senden. Überlappungen der Signale sind somit ausgeschlossen.

Hierfür ist es notwendig, die Primer des SCG derart zu gestalten, dass sie hohen Temperaturen standhalten können. Das Platzieren vieler GC(Guanin/Cytosin)-Klammern an den Enden der SCG-Primer ermöglichte eine derartige Konstruktion. Beide Primerpaare waren außerdem so konzipiert, dass jeweils relativ kurze, von der Länge her klar definierte, Zielprodukte entstehen. Hierfür war es insbesondere bei den Telomer-Primern notwendig, Besonderheiten in deren Struktur einzufügen, die das Entstehen nur eines Produktes

bestimmter Länge ermöglichen. Die bisherigen Telomer-Primer konnten an mehrere Stellen der repetitiven Sequenz hybridisieren und verhinderten das Entstehen nur eines, spezifisches Produktes.

Abb. 3.2 illustriert die Telomer-Produktentstehung. Unter dem Kürzel telg versteht man den für das Telomer-Produkt notwendigen Primer in 5‘-3‘-Richtung. Das Pendant des Gegenstrangs wird als telc bezeichnet.

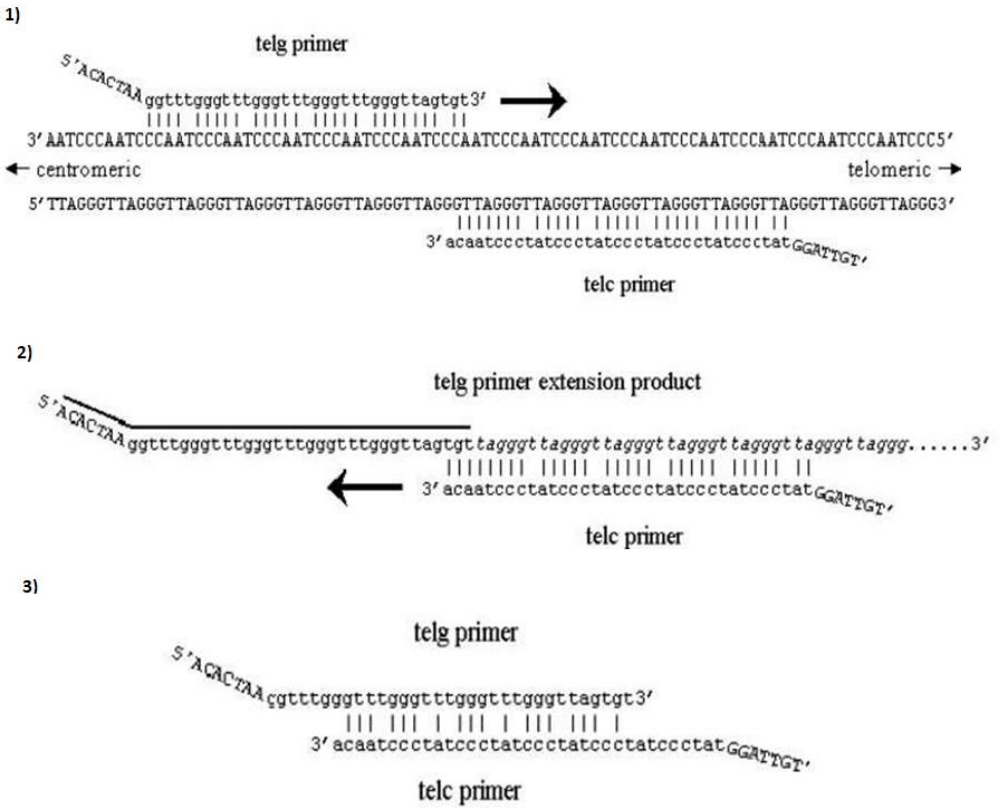


Abb. 3.2: Bindung der Primer an den Telomer-Sequenzen [98]

1) Hybridisierung der Telomer-Primer an genomische DNA
2) Generieren des Produktes mit definierter Länge
3) Hybridisieren der Telomer-Primer aneinander

Im ersten Zyklus hybridisierte telg an die native DNA und startete somit die Replikation. Telc hybridisierte ebenfalls an die DNA, konnte allerdings keine Synthese starten, da am 3’-Ende eine Fehlanpassung (Mispriming) vorlag. Im darauffolgenden Schritt konnte telc an das Verlängerungsprodukt des telg hybridisieren und einzig in der gezeigten Konfiguration die DNA-Synthese starten. Alle anderen Konfigurationen wären erneut durch das bereits

erwähnte Mispriming des telc behindert. Die dicke schwarze Linie oberhalb der Basen in Schritt 2) kennzeichnet den telg-Primer selbst, und die kursiv gedruckten Basen zeigen die in 1) neu synthetisierten Sequenzen an. Die großgedruckten, nicht als Vorlage dienenden Sequenzen an den 5‘-Enden der beiden Primer verhinderten, dass die 3’-Enden des Telomer-PCR-Produktes neue DNA-Synthese innerhalb bereits entstandener Kopien starten konnten. Primer-Dimer Formationen, wie beispielhaft in 3) gezeigt, sollten durch mehrfache Fehlanpassungen verhindert werden. Die 3‘-Enden der Primer sollten sich nach Möglichkeit nicht in eine perfekte 3-Basenpaar (bp) Überlappung anordnen. Als SCG wurde Albumin verwendet.

3.4.1c Versuche mit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad

Für die zunächst verwendeten Messungen wurden die gelisteten Materialien verwendet:

1) SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad
2) Water, nuclease-free, Thermo Scientific
3) Primer telc/telg, Albu/Albd, Eurofins MWG Operon
   Primersequenzen (5‘-3‘):
   telg: acactaaGGTTtGGGTTtGGGTTtGGGTTtGGGTTAGtGT
   telc: tgttaggTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAACa
   Erwartete Produktlänge: 79 Basenpaare
   Albu: CGGCGGCGGGCGGCGCGGGCTGGGCGGaaatgctgcacagaatccttg
   Albd: GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGgaaaagcatggtcgcctgtt
   Erwartete Produktlänge: 98 Basenpaare
4) CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems und CFX Manager Software (3.0) der Firma Bio-Rad

Versuchsblock 1.1

Als erstes wurde versucht, das System mit dem im Labor vorhandenen Mastermix SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix der Firma Bio-Rad zu etablieren. Cawthon verwendete grundsätzlich einen selbst hergestellten Mastermix und daran angepasst das Temperaturprogramm wie 2009 publiziert [98]. Auch die Konzentration der Primer und die Menge an Template-DNA muss jeweils zu dem entsprechenden Versuchsaufbau passen. Für den im aktuellen Ansatz verwendeten Mastermix gab es Herstellerempfehlungen über

Temperatur- und Konzentrationsbereiche von Primern. In Anlehnung an diese Empfehlungen und die Angaben von Cawthon wurde für den ersten Versuch folgendes Set-up kombiniert:

Temperaturprogramm (Abb. 3.3):

1) Hot-Start, zur Aktivierung der DNA-Polymerase; 30 sec und von 95°C
2) Zwei kurze Zyklen relativ niedriger Temperatur (10 sec, 49°C) für effektive Telomer-Primer-Hybridisierung und Verlängerung
3) Amplifikation der Produkte (Schritte 5-9 in Abb. 3.3). Grundsätzlich war jeder Amplifikation eine kurze Denaturierung bei hohen Temperaturen (95°C) vorgeschaltet. Für die Amplifikation des ersten Produktes wurde die optimierte Annealing- (Hybridisierung des Primers an die DNA) und Extension-Temperatur (Verlängerung des Replikationsproduktes) gewählt. Zur Signal-Akquisition wurde die Temperatur auf 74°C angehoben. Dies ist die höchstmögliche Temperatur, bei der das entstandene Amplikon noch nicht schmolz, andere unspezifischen Produkte aber schon. Schritt 8 bei 84°C war notwendig, um das entstandene Telo-Produkt zu schmelzen und den Farbstoff wieder frei zu bekommen für den letzten Schritt. Bei 88°C fanden Annealing und Extension des Albumin-Amplikons statt. Am Ende des Schritts 9 wurde das Signal erfasst. Im Anschluss an die eigentliche Messung wurde grundsätzlich eine Schmelzkurve generiert, um eine Identifikation der entstandenen Produkte vornehmen zu können.

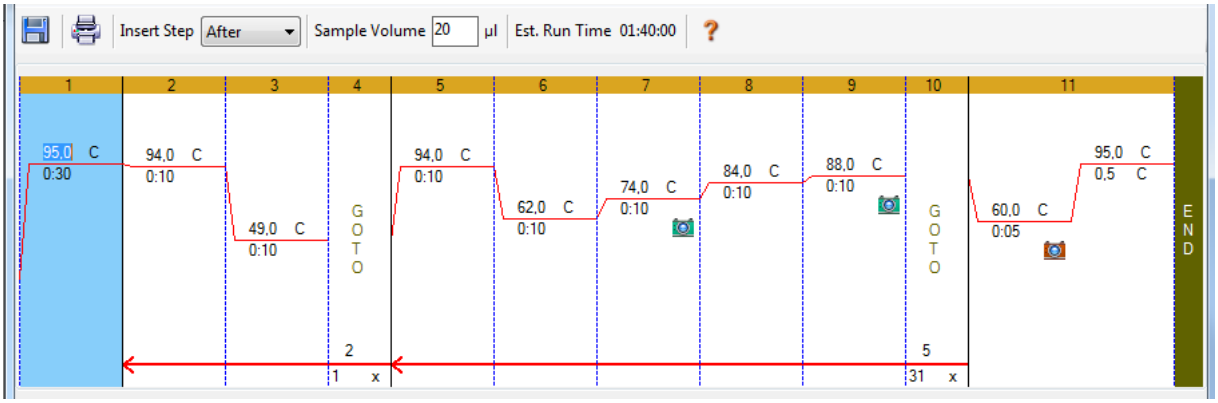
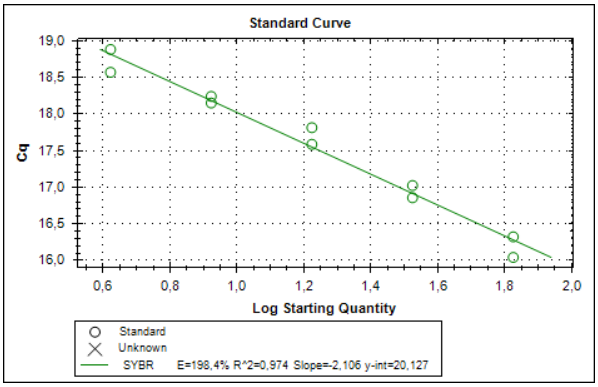


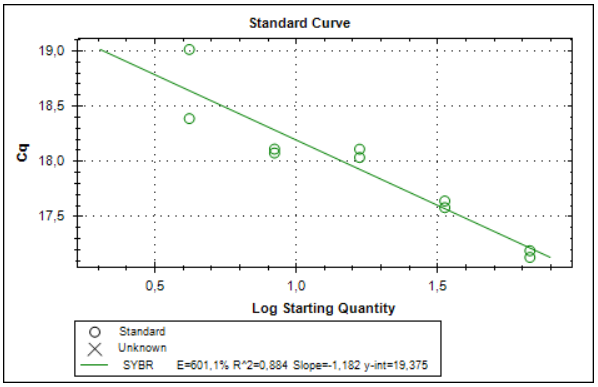
Abb. 3.3: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.1

Um die Primer-Konzentrationen in der angemessenen Größenordnung zu halten, wurde direkt im ersten Versuch die Platte zweigeteilt; für beide Hälften wurden jeweils die

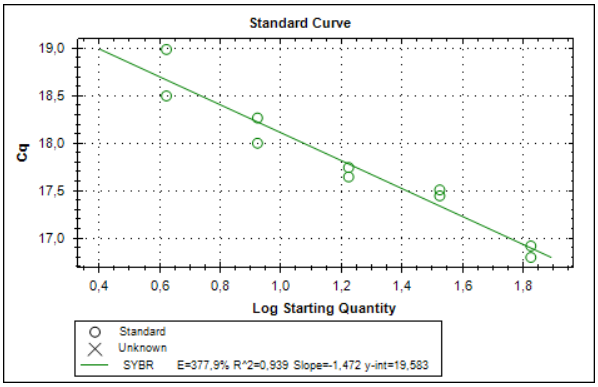
angegebene Ober- und Untergrenze gewählt (250 nM pro Primer bzw. 500 nM pro Primer). Die Standardkurve wurde mittels nativer DNA, die vorher von einer gesunden Kontrolle aufgereinigt wurde, aufgestellt. Als Ausgangskonzentration wurden 64 ng gewählt. Diese Menge wurde anschließend immer wieder zu gleichen Teilen verdünnt, um eine Endkonzentration von 4,19 ng absolut pro Well zu erhalten. Eine Non-Template-Control (NTC) wurde ebenfalls pipettiert.



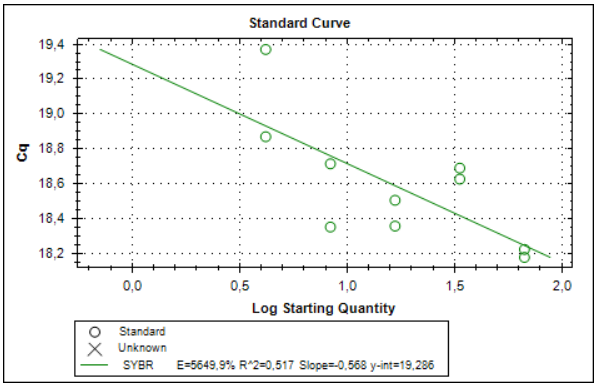
A



C



B

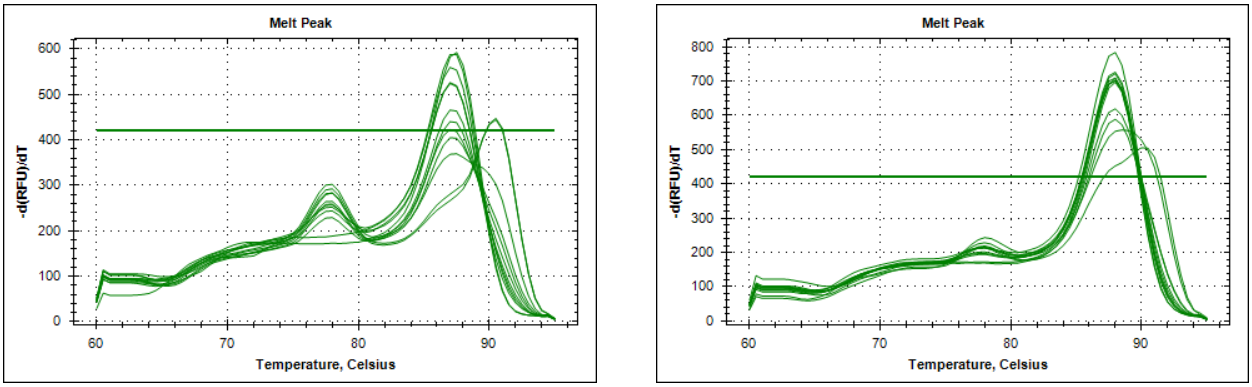


D

Abb. 3.4: Standardkurven der Telomeramplifikation bei 250 nM (A) und 500 nM (B) sowie der Albuminamplifikation bei 250 nM (C) und 500 nM (D) in Versuchsblock 1.1

Für beide Konzentrationen zeigte sich, dass entgegen den Erwartungen das Set-up nicht günstig war (Abb. 3.4). Sowohl die Effizienzwerte (E) der Standardkurven als auch das Bestimmtheitsmaß (R^2) waren unzureichend. Die Effizienz beschreibt die exponentielle Phase der PCR. 100% Effizienz würde bedeuten, dass sich die gewünschte Zielsequenz pro Zyklus exakt verdoppelt. Effizienzen deutlich über 100% lassen vermuten, dass auch viele unerwünschte und unspezifische Produkte entstanden sind. Die optimale Balance zwischen den Konzentrationen der Primer und der eingesetzten Template-Menge galt es im Folgenden erst zu ermitteln, da sie aus den vorliegenden Angaben nicht valide zu erschließen war

Dass die Messung jedoch zumindest prinzipiell funktionierte, zeigten die Schmelzkurven (Abb. 3.5). Diesen konnte man entnehmen, dass zwei unterschiedliche Produkte entstanden waren. Im Fall der 250 nM-Konzentration stellte sich der erste Peak (bei ca. 78°C), also der dem Telomer-Produkt entsprechende, verglichen mit der 500 nM-Konzentration deutlicher dar.



A **B**

Abb. 3.5: Schmelzprofile der entstandenen Produkt, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, im Ansatz mit 250 nM (A) und 500 nM (B) in Versuchsblock 1.1

Versuchsblock 1.2

Die vorstehenden Beobachtungen gaben Grund zu der Annahme, dass geringer Primer-Konzentrationen für die Messungen besser geeignet sein könnten. Im darauffolgenden Schritt der Methodenentwicklung wurden die Konzentrationen deshalb reduziert. Das Temperaturprogramm wurde geringfügig verändert. Der Hot-Start wurde verlängert und die Temperatur leicht erhöht, um auszuschließen, dass eine möglicherweise unzureichende Polymerase-Freisetzung zu Fehlinterpretationen führen. Die Zeit in Schritt 3 wurde um 10 sec verlängert, damit nicht aufgrund von zu kurzer Annealing Zeit die Primer inkorrekt hybridisieren. Das restliche Temperaturprogramm (Abb. 3.6) blieb weitgehend bestehen.

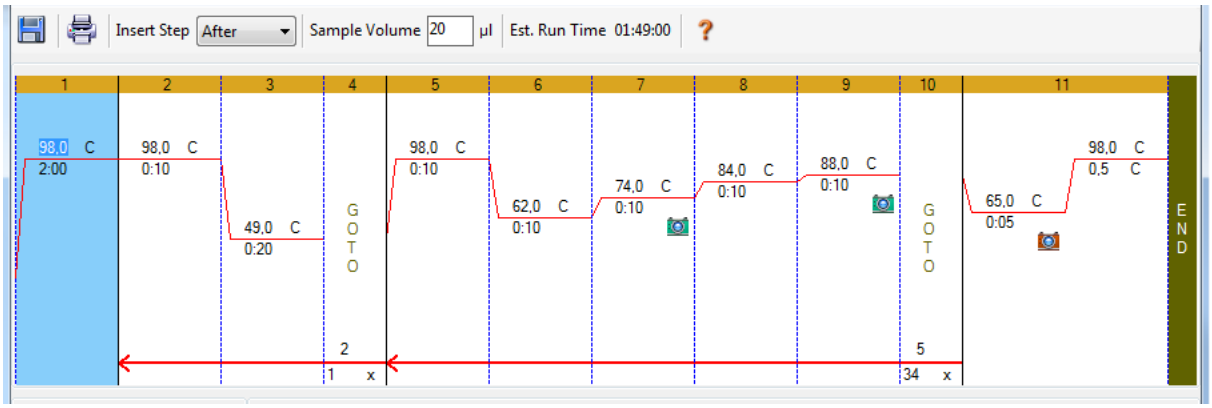
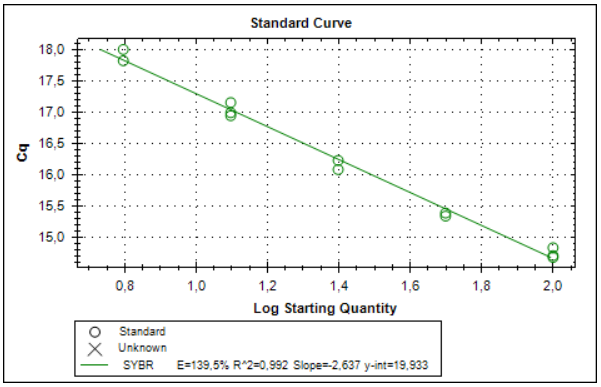
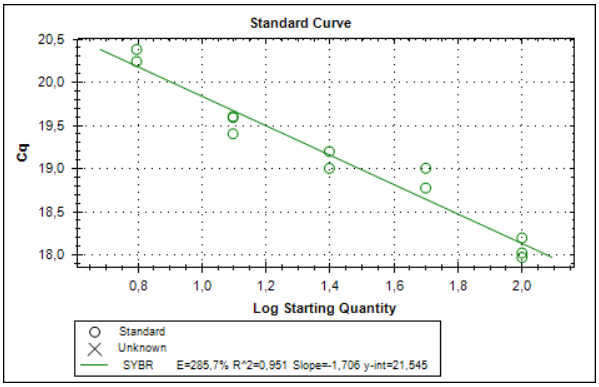


Abb. 3.6: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.2

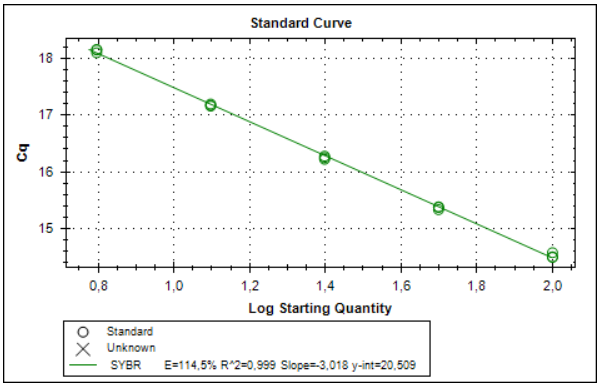
Die Platte wurde erneut zweigeteilt und die Primer wurden auf jeweils 100 nM und 200 nM reduziert. Um einen breiteren Bereich abzudecken, wurde die Ausgangskonzentration auf 100 ng gesteigert. Die serielle 1:2-Verdünnung wurde beibehalten, sodass sich 6,25 ng als niedrigste Konzentration ergab.



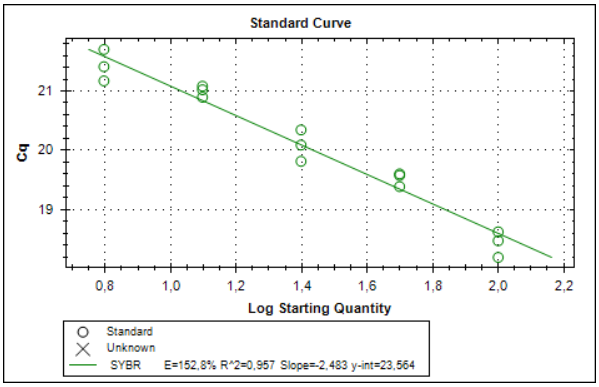
A



C



B



D

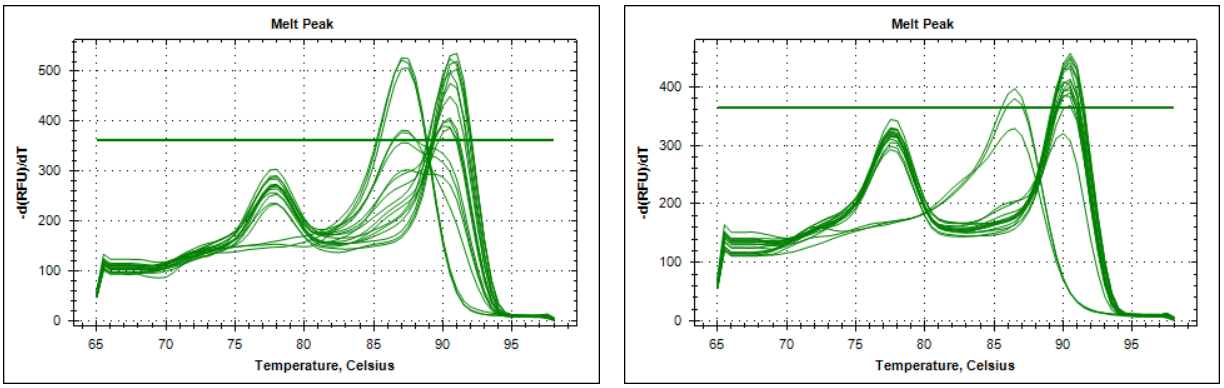
Abb. 3.7: Standardkurven der Telomeramplifikation bei 200 nM (A) und 100 nM (B) sowie der Albuminamplifikation bei 200 nM (C) und 100 nM (D) in Versuchsblock 1.2

Der neue methodologische Ansatz bestätigte die ihm zugrunde liegenden Annahmen (Abb. 3.7). Vor allem konnte man eine Assoziation zwischen verringerter Primer-Konzentration und geringeren Effizienzen ausmachen. Dennoch ließ keine der Standardkurven ein akzeptables Ergebnis erkennen. Neben der Verbesserung der Effizienz der Standardkurven mit Abnahme der Primer-Konzentration zeigten auch die Schmelzkurven die beiden Produkte durch das Vorhandensein zweier deutlicherer Peaks (Abb. 3.8). Beide Kurven wiesen auf Produkte in der NT-Kontrolle hin (Peak bei ca. 87°C). Als Produkt hierfür ist vermutlich ein Heterodimer aus den Primern anzunehmen. Dieses ergäbe sich aus einer 4-Basenpaar-Überlappung an den 3‘-Enden eines Telomer- und eines Albumin-Primers.

Heterodimer: 85bp

acaatccctatccctatccctatccctatccctatggattgt telc

GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGgaaaagcatggtcgcc**tgtt** Albd

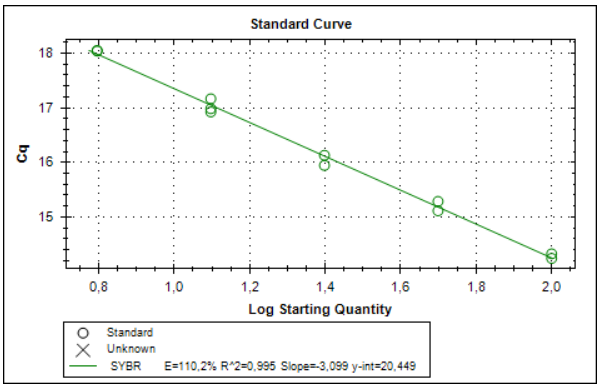


A **B**

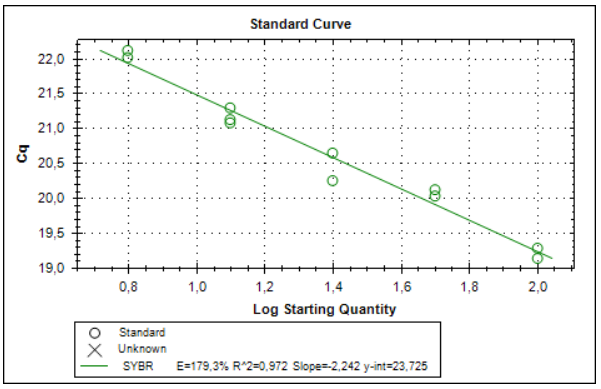
Abb. 3.8: Schmelzprofile der entstanden Produkte, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, im Ansatz mit 200 nM (A) und 100 nM (B) in Versuchsblock 1.2

Versuchsblock 1.3

Der nächste Block von Versuchen sollte klären, ob durch weiteres Absenken der eingesetzten Primer-Konzentration ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen wäre. Das Temperaturprogramm wurde von dem vorhergehenden Ansatz übernommen. Ebenso das Erstellen der Standardkurve. Die Primer wurden auf 75 nM pro Primer herabgesetzt.



A



B

Abb. 3.9: Standardkurve der Telomeramplifikation bei 75 nM (A) und der Albuminamplifikation bei 75 nM (B) in Versuchsblock 1.3

Die Standardkurve der Telomeren konnte somit zwar in einen akzeptablen Bereich von 110% Effizienz gebracht werden, Albumin blieb jedoch unverändert schlecht (Abb. 3.9). Die Schmelzanalyse zeigte ein ähnliches Bild wie im Versuchsblock 1.2. Die Peaks der beiden Produkte waren klar voneinander abzugrenzen und erschienen sehr verschieden (Abb. 3.10). Außerdem waren die Cts der verschiedenen Standardkurven bei entsprechenden DNA-Werten sehr unterschiedlich (ca. 5 Zyklen Differenz). Das kürzere Produkt erschien bei niedrigerer Schmelztemperatur und das längere bei entsprechend höheren Temperaturen. Leider blieb trotz Verringerung der Primer-Konzentration weiterhin ein Signal in der NT-Kontrolle nachweisbar. Die Schmelzkurve bestätigte dies. Es handelte sich vermutlich um das oben genannte Primer-Heterodimer. Generell war zu bemerken, dass die Signale in den Schmelzanalysen relativ wenig intensiv waren und bei niedrigen Relativen Fluoreszenz-einheiten (RFU) lagen.

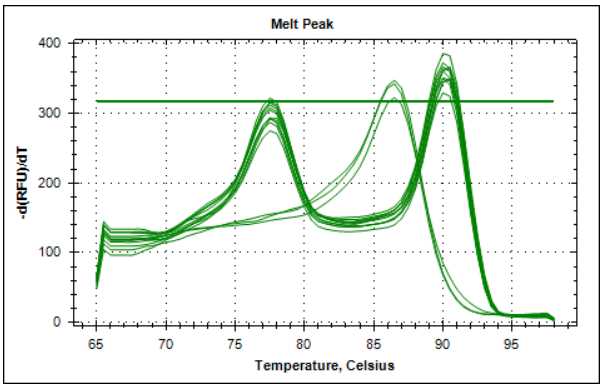


Abb. 3.10: Schmelzprofil der entstanden Produkte, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, im Ansatz mit 75 nM in Versuchsblock 1.3

Versuchsblock 1.4

Um die Vermutung, dass es sich bei dem Produkt in der NT-Kontrolle wahrscheinlich um ein Heterodimer aus Telomer- und Albumin-Primern handelte, zu untermauern, wurde im Anschluss eine Methode geprüft, in der die Ansätze auf zwei verschiedene Platten verteilt wurden und pro Ansatz jeweils entweder nur das Telomer-Primerpaar oder die Primer für Albumin zugegeben wurden. Außerdem sollte damit überprüft werden, inwieweit sich die Effizienzen unterschieden, ohne Interferenz der unterschiedlichen Produkte oder Signale. Hohe Effizienzen wurden grundsätzlich als fehlerhafte, übermäßig starke Amplifikation betrachtet. Nicht spezifische Produkte konnten in den unterschiedlichen Verdünnungen der Standardkurve die Ct-Werte unterschiedlich stark beeinflussen, wodurch sich die Steigung und somit die Effizienz veränderte. Dies traf am stärksten für die am höchsten konzentrierten Wells der Standardkurve zu, die die größte Menge an DNA beinhalteten. Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch die Ausgangskonzentration der Standardkurve geringfügig erniedrigt. Startpunkt war 80 ng, eine Menge, die durch 5-fache 1:2-Verdünnung auf 5 ng verdünnt wurde. Um gleichzeitig eine mögliche Abhängigkeit der Ergebnisse von der Temperatur zu beurteilen, wurden Gradienten für den Telomer-Signalaufzeichnungsschritt (70-75°C) und den Albumin-Signalaufzeichnungsschritt (85-90°C) angelegt (Abb. 3.11 und 3.12). Die Konzentration der Telomer-Primer wurde wieder auf 100 nM angehoben, da 75 nM nach allgemeinem Konsens in der Literatur als zu wenig erschienen und die Ergebnisse sich nicht maßgeblich unterschieden.

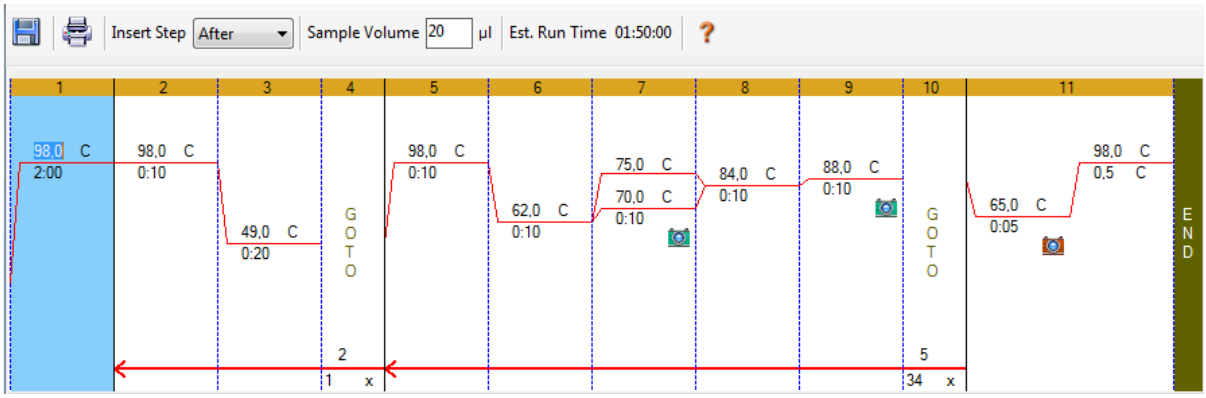


Abb. 3.11: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.4 mit Temperaturgradient für den Telomer-Amplifikationsschritt

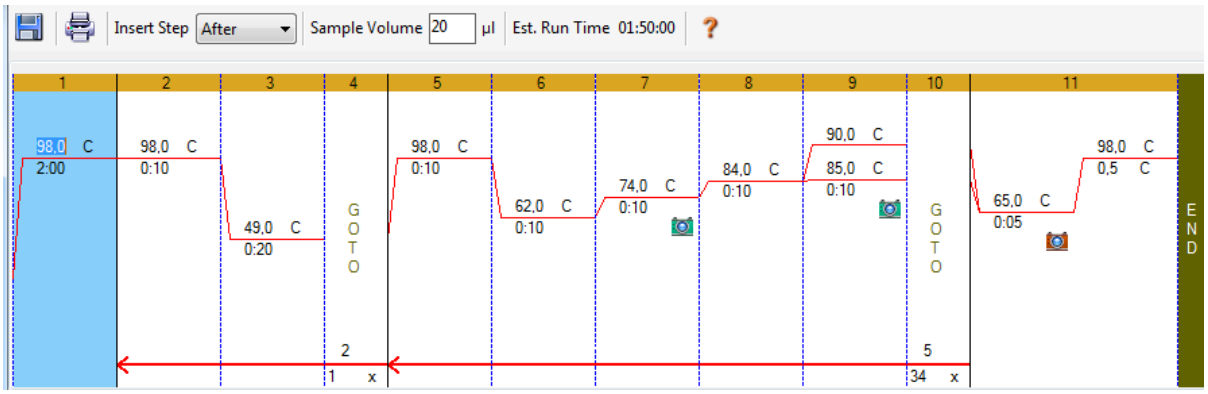
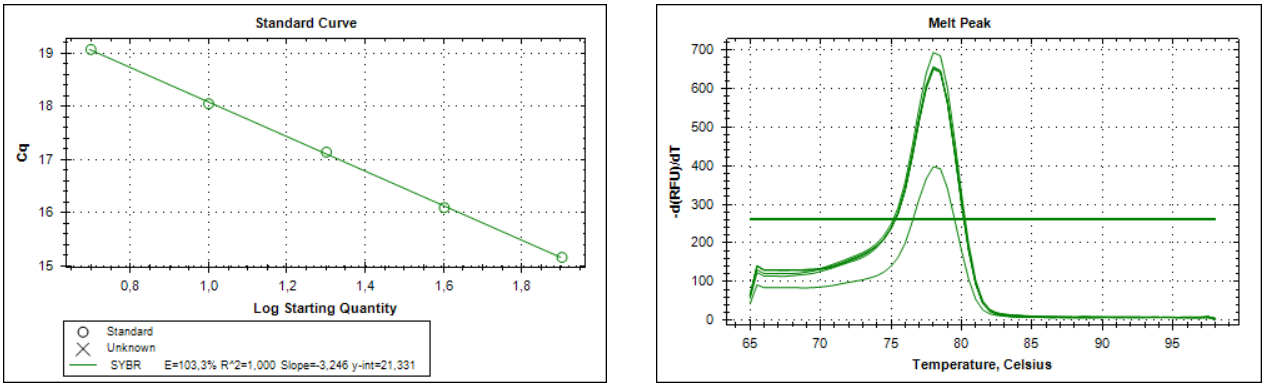


Abb. 3.12: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.4 mit Temperaturgradient für den Albumin-Amplifikationsschritt

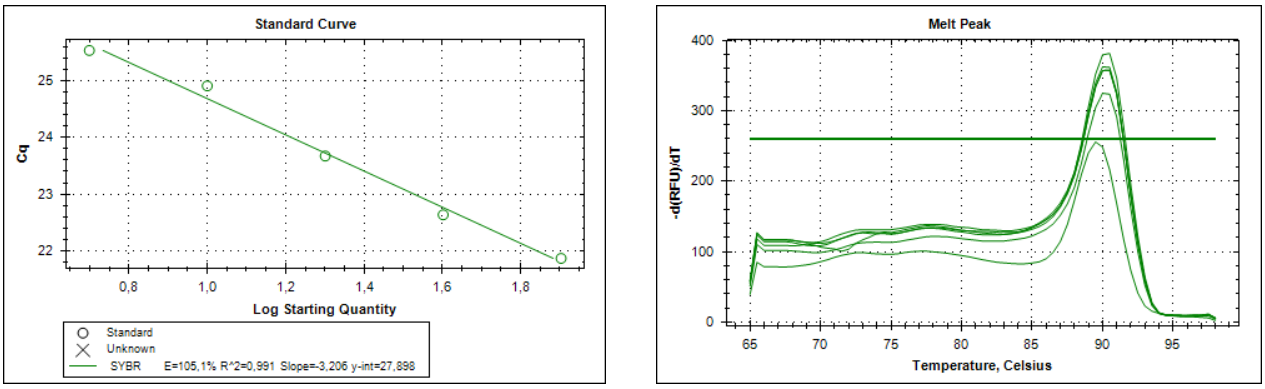
Die Effizienzen der Telomer-Standardkurven wurden durch die Temperatur wenig beeinflusst. Bei 72°C ergab sich die Standardkurve mit dem niedrigsten Ct und dem besten R^2. Daher wurde diese Temperatur für künftige Versuche gewählt (Abb. 3.13).



A **B**

Abb. 3.13: Standardkurve des Telomeransatztes mit 100 nM bei 72 °C (A) und das dazugehörige Schmelzprofil (B) in Versuchsblock 1.4

Für das Albumin-Produkt erwiesen sich niedrigere Temperaturen als tauglicher. Das beste Ergebnis konnte bei 85°C erzielt werden (Abb. 3.14). Die Effizienz konnte durch das Absenken der Annealing/Extension Temperatur in einen akzeptablen Bereich (105%) gebracht werden. Es waren außerdem kaum mehr Produkte in beiden NT-Kontrollen nachzuweisen, und falls doch, dann nur in unwesentlichem Umfang sowie direkt auf Höhe des eigentlichen Produktes und nicht verschoben; dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei den früheren Resultaten um Hetero-Dimere handelte. Waren die verschiedenen Primerpaare in getrennten Wells, so konnte dieses Produkt naturgemäß nicht entstehen.



A **B**

Abb. 3.14: Standardkurve des Albuminansatzes mit 100 nM bei 85 °C (A) und dem dazugehörigen Schmelzprofil (B) in Versuchsblock 1.4

Die Erkenntnis aus den genannten Versuchen war, dass zwar beide Produkte separat akzeptabel entstehen konnten, im selben Well allerdings vor allem das Albumin keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachte. Die Albumin-Primer weisen viele GC-Klammern auf und gelten somit als schwieriges Ziel für eine PCR, das häufig nur durch den Zusatz sogenannter PCR-Enhancer (Verstärker) zugänglich gemacht werden kann. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen der Master-Mix gewechselt. Es wurde der selbst herzustellende Original-Mix gewählt, der von Cawthon 2009 beschrieben wurde [98].

Eine zweite Überlegung war, in der Literatur nach möglicherweise neukonzipierten Primern zu suchen, um das Problem der Heterodimere zu lösen. In einem unlängst, nach den initialen Versuchen publizierten Paper aus dem Jahre 2014 [99], wurde ebenfalls das Problem der Heterodimere erkannt und durch die Konstruktion neuer Primer für das Albumin gelöst. Die ursprüngliche 4bp Überlappung des telc und Albd konnte somit umgangen werden.

3.4.1d Versuche mit selbsthergestelltem Master- nach Cawthon 2009

Für die folgenden Messungen wurden die gelisteten Materialien verwendet:

1) AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Puffer II und MgCl, Life Technologies
2) Polymerase 5 U/µl, 10X Buffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), Magnesium chloride Solution (25 mM), Life Technologies
3) dNTP Mix, 2 mM each, Thermo Scientific
4) DTT, Thermo Scientific
5) Betaine solution 5 M, Sigma-Aldrich

6) SYBR Green®-Färbelösung, DNA-frei, AppliChem
7) Water, nuclease-free, Thermo Scientific
8) Primer telc/telg, Albugcr2/Albdgcr2, Eurofins MWG Operon

   Primersequenzen (5‘-3‘):

   telg: acactaaGGTTtGGGTTtGGGTTtGGGTTtGGGTTAGtGT

   telc: tgttaggTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAACa

   Erwartete Produktlänge: 79 Basenpaare

   Albugcr2: cggcggcgggcggcgcgggctgggcggccATGCTTTTCAGCTCTGcAAGTC

   Albdgcr2: gcccggcccgccgcgcccgtcccgccgAGCATTAAgCTCTTTGGcAACGTAgGTTTC

   Erwartete Produktlänge: 111 Basenpaare
9) E-Gel® Precast Agarose Gels (4%); Ethidium bromide, Life Technologies
10) GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific
11) CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems und CFX Manager Software (3.0) der Firma Bio-Rad

Versuchsblock 2.1

Die detaillierte Herstellung des Master-Mix folgte der im Jahr 2009 publizierten Arbeit [98]. Ferner galten auch Set-up Angaben aus der aktuellen Literatur [99] als Vorlagen. Die Angaben wurden anhand der Erfahrungen der bis dato durchgeführten Versuche weiter angepasst. Das Temperaturprogramm wurde fast originalgetreu aus der Literatur übernommen [99]. Eine Veränderung gab es bei der Zeiteinstellung der Denaturierung. Hier wurde die Zeit von 2 auf 5 sec erhöht. Außerdem wurde das Signal des Telomer-Produktes bei 72°C erfasst, wie es die bisherigen Versuche als günstig erwiesen hatten. Um für das Annealing/Extension des Telomer-Produktes das Temperaturoptimum zu finden, wurde ein Temperaturgradient erstellt (Abb. 3.15). Die Standardkurve wurde ausgehend von 80 ng jeweils 1:2 verdünnt bis auf 5ng. Die Konzentration der Primer wurde entsprechend der erwähnten Arbeit gewählt [99], also telg/ telc/ Albugcr2/ Albdgcr2 mit 100 nM/ 900 nM/ 700 nM/ 500 nM.

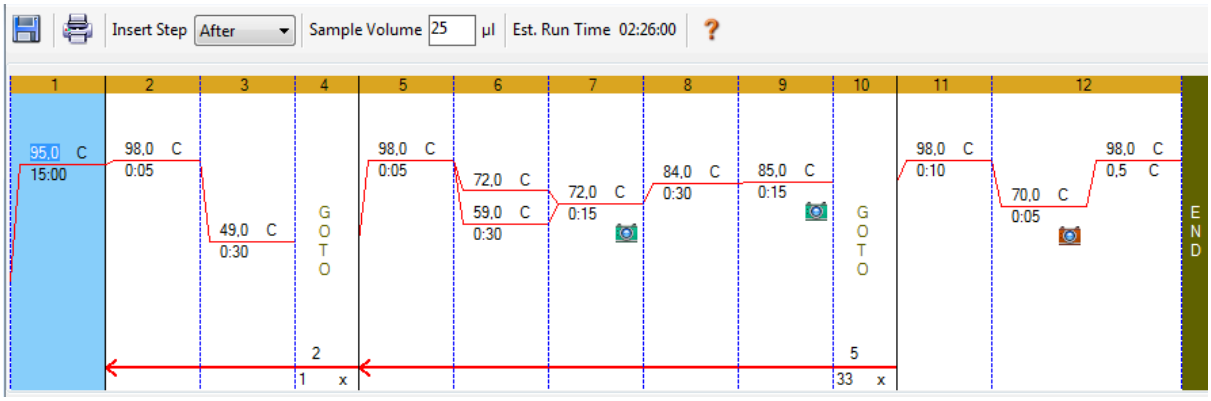


Abb. 3.15: Temperatur Set-up von Versuchsblock 2.1

Betrachtete man ausschließlich die Effizienz, so konnten nahezu alle Standardkurven der beiden Produkte überzeugen. Unterschiede zeigten sich jedoch in den Amplifikationskurven sowie beim Analysieren der Schmelzprofile hinsichtlich der Lage der NTC. Im Folgenden werden die Darstellungen der Analyse der Telomeren bei 59°C und 72°C gezeigt und direkt darunter die entsprechende Messung bei 85°C (Abb. 3.16).

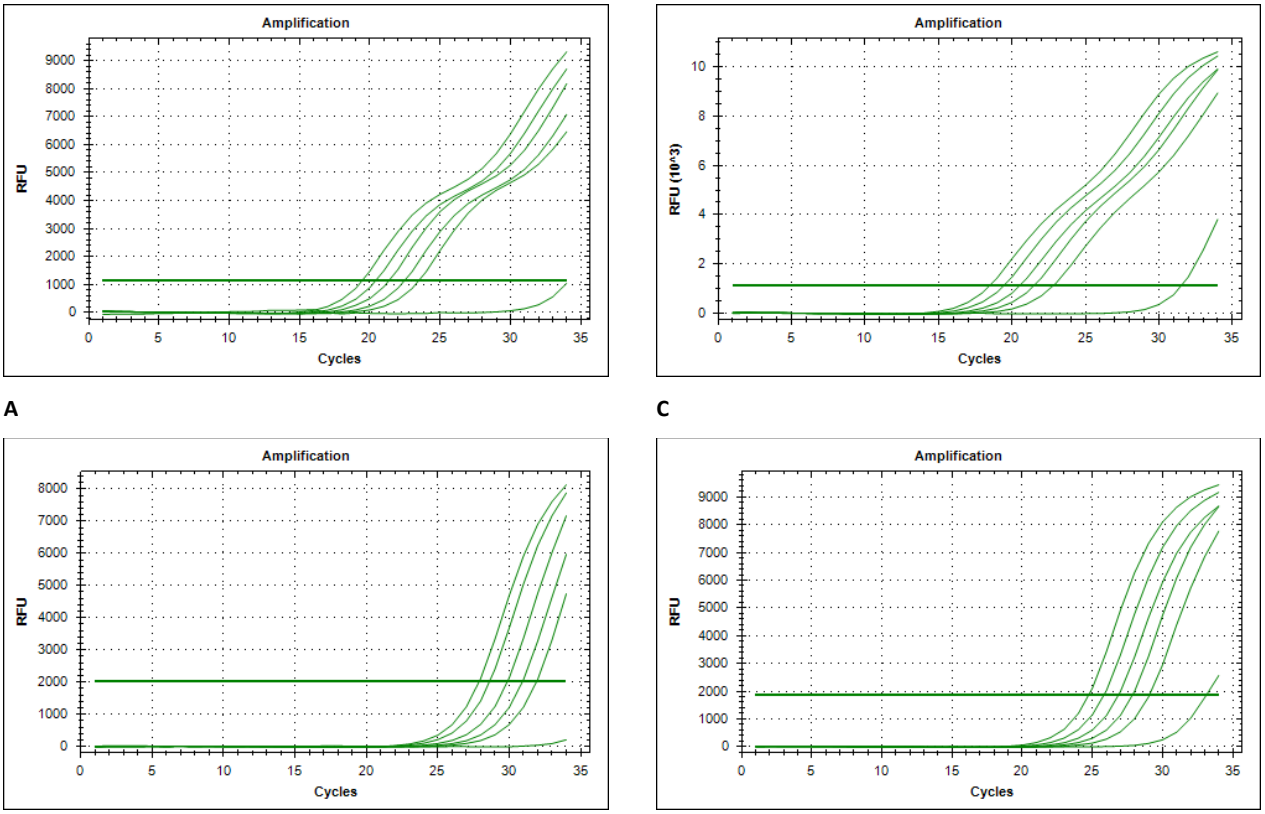


Abb. 3.16: Amplifikationsprofile des Telomer-Produktes bei 72°C (A) und 59°C (C) und die entsprechenden Amplifikationkurven des Albumin-Produktes bei 89°C (B und D) in Versuchsblock 2.1

Obwohl die Annealing/Extension-Temperatur des Telomeres die Albumin-Kurve unbeeinflusst lassen sollte, zeigte der Versuch das Gegenteil. Die Standardkurven des Albumins waren deutlich unterschiedlich im Bezug auf die Zyklenzahlen bei sich entsprechenden DNA-Mengen. Während die Amplifikation des Albumins bei einem vorherigen Annealing/Extension mit 59°C früher begann, ergaben sich für die entsprechenden Cts bei 72°C deutlich verzögerte Werte (ca. 3 Zyklen Unterschied). Der Zyklenunterschied des Telomer-Produktes betrug maximal 1 (Abb. 3.17 und 3.18). Korrekte Werte der Standardkurven sind Voraussetzung für eine korrekte Produktquantifizierung.

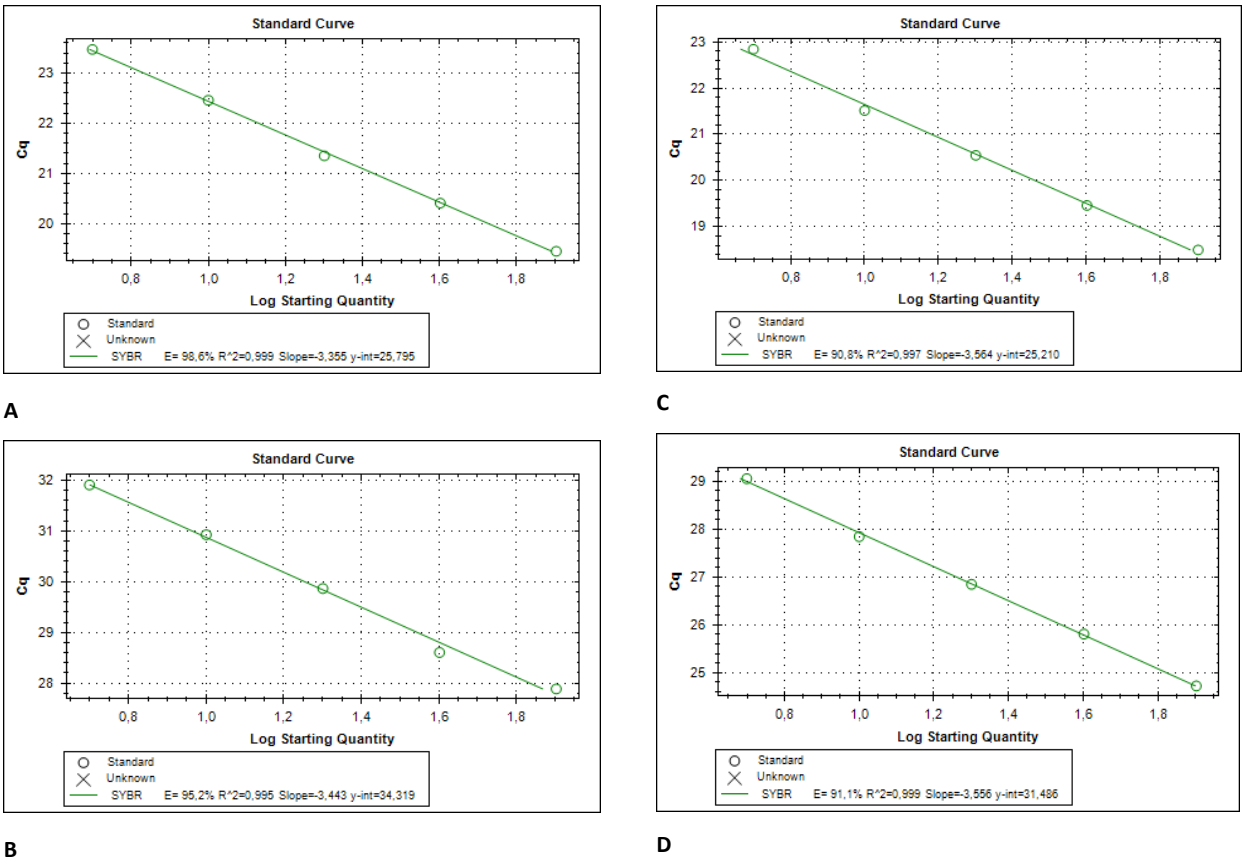
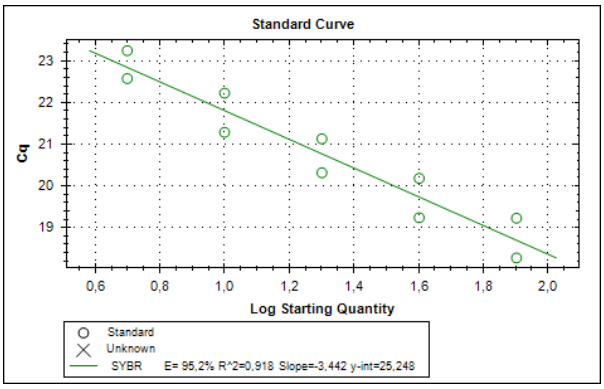
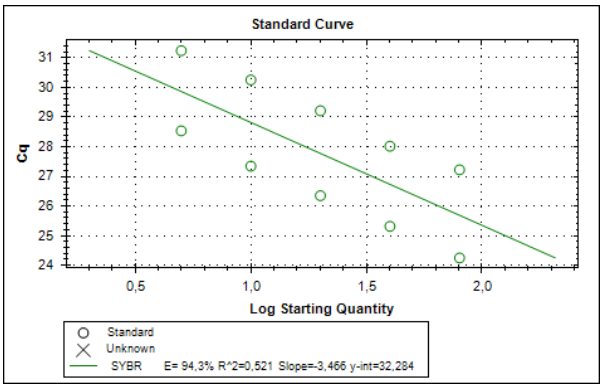


Abb. 3.17: Standardkurve des Telomer-Produktes bei 72°C (A) und 59°C (C) und die entsprechenden Standardkurven des Albumin-Produktes bei 89°C (B und D) in Versuchsblock 2.1



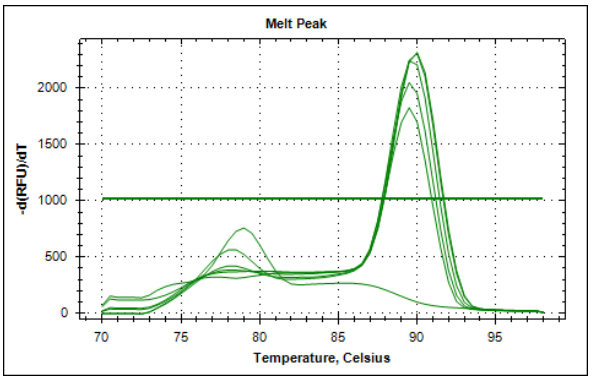
A



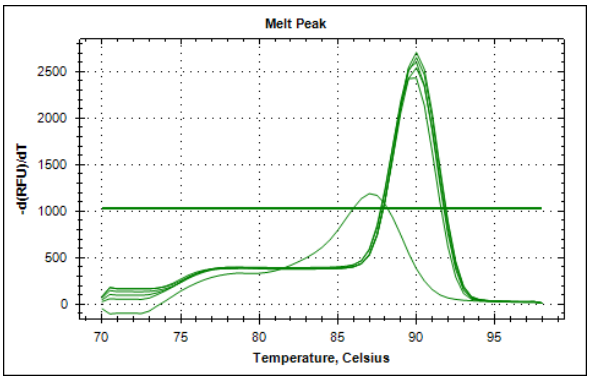
B

Abb. 3.18: Darstellung der Standardkurven des Telomer-Produktes (A) bei 72°C (oben) und 59°C (unten) mit den entsprechenden Standardkurven des Albumins (B) bei 85°C mit vorherigem Telomer-Schritt bei 72°C (oben) und 59°C (unten) von Versuchsblock 2.1

Neben der Schmelzkurven-Analyse (Abb. 3.19) erfolgte im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese (Abb. 3.20), um Hinweise auf die entstandenen Produktmengen und mögliche Verunreinigungen zu erhalten.

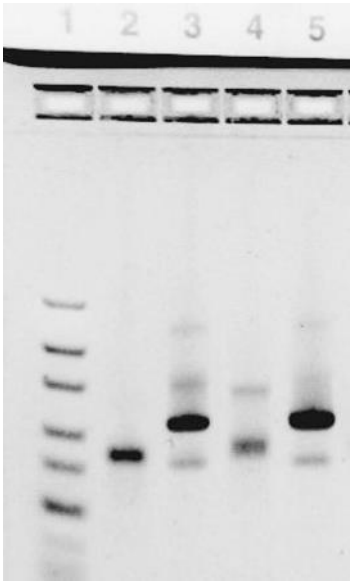


A



B

Abb. 3.19: Schmelzprofile der entstandenen Produkte, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, mit 72°C-Annealing/Extension für das Telomer-Produkt (A) und 59°C (B) in Versuchsblock 2.1



Elektrophoreseprofil 1: Leiter
(50, 75, 100, 150, 200,300 bp aufsteigend)
Elektrophoreseprofil 2: NTC Standardkurve
Telomer (72°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 3: Probe Standardkurve
Telomer (72°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 4: NTC Standardkurve
Telomer (59°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 5: Probe Standardkurve
Telomer (59°C)/Albumin

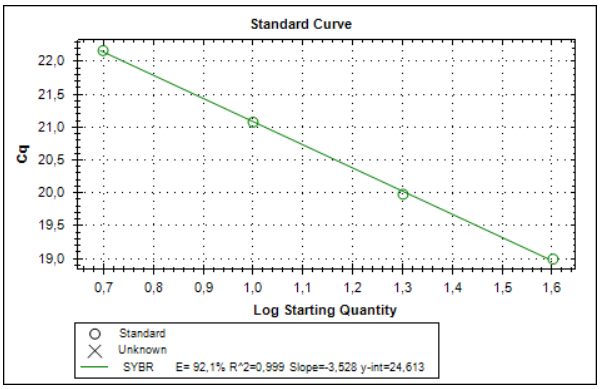
Abb. 3.20: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.1

Leider war in beiden Aufträgen der NTC Produkt enthalten, in Bande 4 jedoch deutlich schwächer und vermutlich einige Basenpaare länger als in Bande 2. Bande 3 und 5 zeigten alle entstandenen Produkte. Die schwache Bande entspricht dem 79 Basenpaar (bp) langen Telomer-Produkt, die dicke, obere Bande dem Albumin-Produkt. Anhand der Bandenstärke ließ sich erkennen, dass deutlich weniger Telomer- als Albumin-Produkt entstanden war. Zu dem selben Schluss führte die Analyse der Schmelzprofile. Hier ergab sich, wenn überhaupt, nur ein minimaler Schmelzpeak bei der erwarteten Temperatur von ca. 78°C. Es dominierte das Albumin-Produkt (89°C).

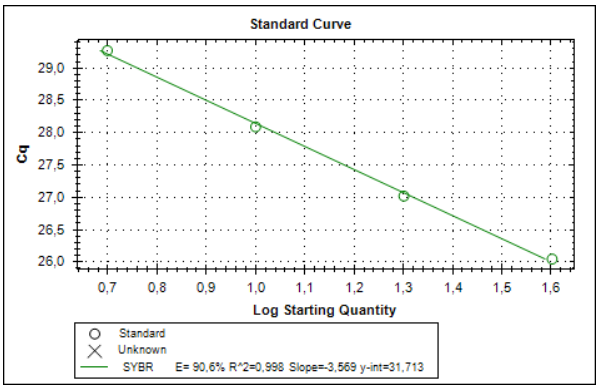
Versuchsblock 2.2

Für den nächsten Versuchsblock wurde überlegt, wie man die Entstehung des Telomer-Produktes steigern könnte. Eine Möglichkeit schien die Veränderung der Primerkonzentration. Telg ist der ausschlaggebende Primer, der die Amplifikation der Telomeren starten kann. Hier wurde der Primer von 100 auf 200 nM erhöht und im gleichen Zug der Gegenprimer telc von 900 auf 700 nM erniedrigt. Die Konzentrationen der Albumin-Primer wurden beibehalten. Das Temperaturprogramm blieb mit Ausnahme des Gradienten bestehen. Dieser wurde nur noch im Bereich von 59-65°C genutzt, da sich im vorherigen

Experiment gezeigt hatte, dass hohe Temperaturen für das Annealing/Extension der Telomere das Albumin ungünstig beeinflussten.



A



B

Abb. 3.21: Standardkurve des Telomer-Produktes bei 59,4°C (A) und die entsprechende Standardkurve des Albumin-Produktes bei 85°C (B) in Versuchsblock 2.2

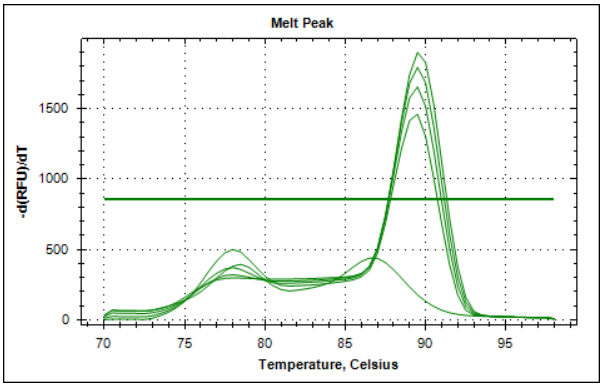
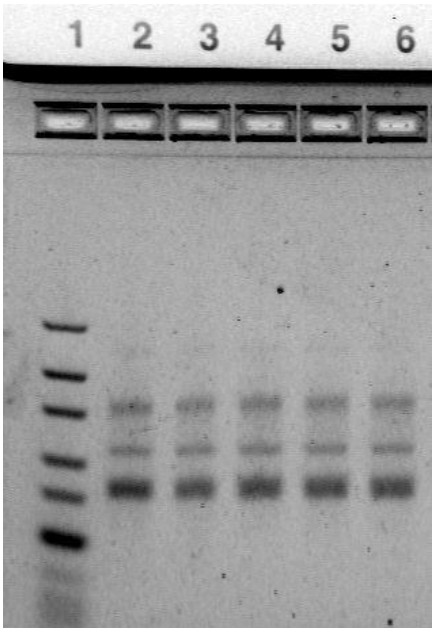


Abb. 3.22: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 2.2

Die Ergebnisse der Standardkurven schienen in diesem Temperaturbereich relativ ähnlich (Abb. 3.21). Wie erhofft fand sich zumindest ein kleiner Telomer-Produkt-Peak in der Schmelzanalyse (Abb. 3.22). Außerdem konnten Produkte der NTC weitestgehend zurückgedrängt werden. Dass in der NTC nun kaum mehr nachweisbares Produkt vorhanden war, ließ darauf schließen, dass nicht Verunreinigungen zu dieser Bande führten, sondern dass ein ungünstiges Verhältnis der Primer zueinander die unspezifischen Produkte

generierte. Erneut wurde zwecks einer leichteren Interpretation der entstandenen Produkte eine Gelelektrophorese (Abb. 3.23) erstellt.



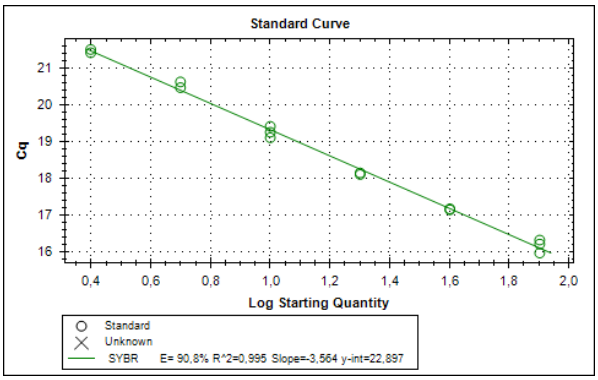
Elektrophoreseprofil 1: Leiter (50, 75, 100, 150, 200,300 bp aufsteigend)
Elektrophoreseprofil 2: Probe Standardkurve Telomer (59,4°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 3: Probe Standardkurve Telomer (61,4°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 4: Probe Standardkurve Telomer (62,8°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 5: Probe Standardkurve Telomer (64°C)/Albumin
Elektrophoreseprofil 6: Probe Standardkurve Telomer (65°C)/Albumin

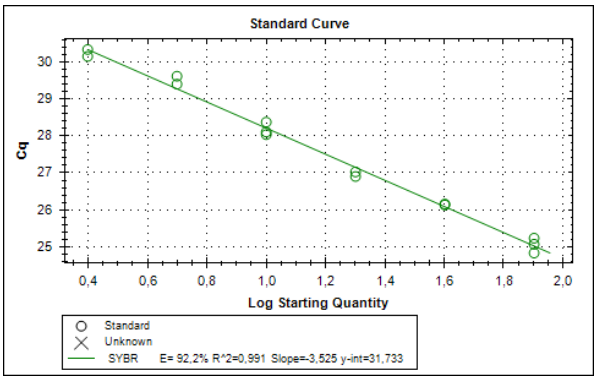
Abb. 3.23: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.2

Mengenmäßig gab es eine deutliche Verschiebung hin zum Telomer-Produkt. Die Telomer-Bande schien bei 59,4°C Ann/Ex.-Temperatur am deutlichsten.

Versuchsblock 2.3

Die nächste methodologische Verfeinerung sollte klären, ob eine Umkehr der Konzentrationsverhältnisse der Primer (also mehr Telomer- als Albumin-Primer) noch bessere Erfolge bringen könnte. Das Temperaturprogramm wurde wie vorher der Literatur entnommen [99] (2 sec Denaturieren statt 5 sec). Für die Telomer-Primer wurden 500 nM und für Albumin 200 nM gewählt. Die Standardkurve wurde um eine weitere 1:2-Verdünnung auf einen Bereich von 80 bis 2,5 ng erweitert.





A **B**

Abb. 3.24: Standardkurve des Telomer-Produktes bei 59°C (A) und die entsprechende Standardkurve des Albumin-Produktes bei 85°C (B) in Versuchsblock 2.3

Beide Standardkurven verhielten sich bezüglich der Effizienz gut (Abb. 3.24). Die Schmelzpeaks zeigten, dass mit der neuen Primer-Konstellation das Telomer-Produkt in der Analyse stärker vertreten war, aber dennoch nicht an die Signalstärke des Albumins heranreichte. Aufgrund der irritierenden Ergebnisse der Schmelzanalyse (Abb. 3.25) wurde Kontakt zum korrespondierenden Autor Richard M. Cawthon (Department of Human Genetics, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, USA) aufgenommen. Dieser erklärte, dass es in den Schmelzprofilen gelegentlich passiere, dass im Anschluss an eine Amplifikation mit zwei unterschiedlichen Targets und nur einem Farbstoff das GC-reichere Target dem anderen Produkt den Farbstoff entziehe. Würde man vor der Schmelzanalyse das Reaktions-Well mit dem Farbstoff SYBR-Green absättigen, bekäme man diese Unstimmigkeit evtl. in den Griff. Während der PCR selbst ist es unmöglich, mehr Farbstoff zuzugeben, da dieser in zu hohen Konzentrationen als Inhibitor der Reaktion bekannt ist.

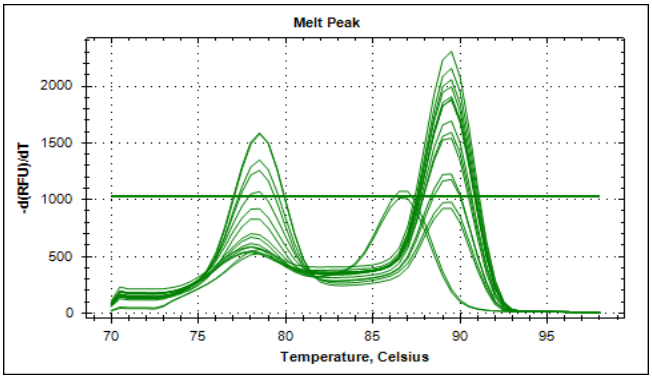
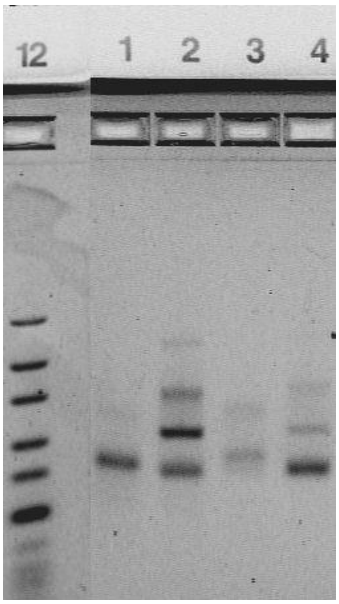


Abb. 3.25: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 2.3



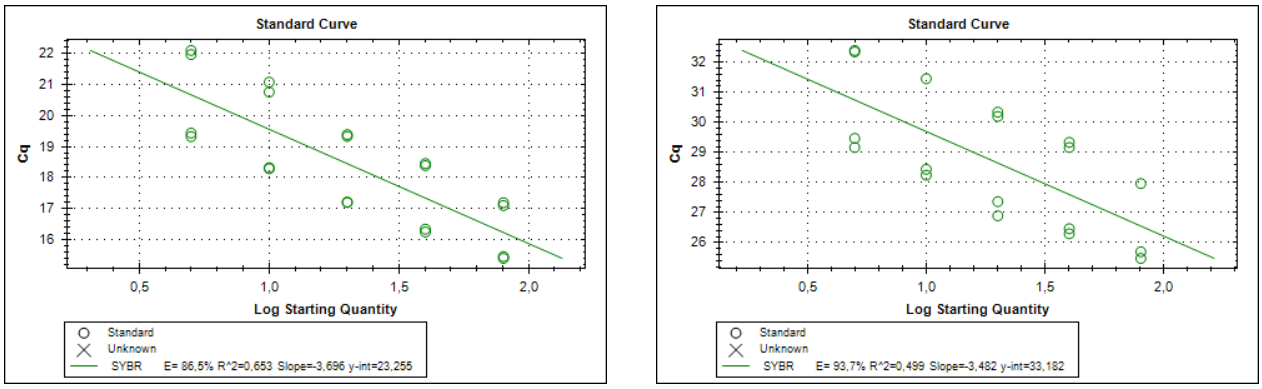
Elektrophoreseprofil 12: Leiter
(50, 75, 100, 150, 200,300 bp aufsteigend)
Elektrophoreseprofil 1: NTC, telg/telc/Albugcr2/Albdgcr2:
200/700/700/500 nM
Elektrophoreseprofil 2: Probe, telg/telc/Albugcr2/Albdgcr2:
200/700/700/500 nM
Elektrophoreseprofil 3: NTC, telg/telc/Albugcr2/Albdgcr2:
500/500/200/200 nM
Elektrophoreseprofil 4: Probe, telg/telc/Albugcr2/Albdgcr2:
500/500/200/200 nM

Abb. 3.26: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.3

Durch die veränderte Primer-Konzentration konnte die Synthese weiterhin Richtung Telomer-Produkt verschoben werden; dies wurde durch die Gelelektrophorese bestätigt (Abb. 3.26). Sie ermöglichte den direkten Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen. Während Bande 2 mit der ursprünglichen Konzentration das Albumin deutlicher zeigte, zeigte Bande 4 vermehrt das Telomer-Produkt. Außerdem führt die neue Primer-Zusammensetzung zu weniger unspezifischen Produkten, wie man der NT-Kontrolle entnehmen konnte. Bande 2 wies neben den gewünschten Sequenzen zwei weitere beachtliche Banden auf.

Versuchsblock 2.4

Soweit schien die Methode praktikabel, daher sollte der nächste Versuch zeigen, dass die Primer in der verwendeten Konzentration und unter dem etablierten Temperaturprogramm anständig arbeiteten und es keine große Beeinträchtigung untereinander gab. Hierzu wurde die Platte in 3x3 Spalten aufgeteilt. In Spalte 1 waren beide Primerpaare vorhanden, in Spalte 2 nur das Telomer-Paar und in Spalte 3 nur das Albumin-Paar. Leider bestätigte der Versuch nicht, dass das System stabil und robust genug für die Messung der eigentlichen Proben war. Die unterschiedlichen Effizienzen der Targetsequenzen im gemeinsamen Ansatz verglichen mit den separaten Ansätzen sprachen für gegenseitige Beeinflussung der Produktsequenzen, und es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese auch das Messergebnis an den Proben der Patienten beeinträchtigen würde (Abb. 3.27).



A **B**

Abb. 3.27: Zusammenfassenden Darstellung der Standardkurven des entstandenen Telomer-Produktes (A) im Einzelansatz (oben) und im gemeinsamen Ansatz (unten) und des entsprechend entstandenen Albumin-Produktes (B) im Einzelansatz (oben) und im gemeinsamen Ansatz (unten) von Versuchsblock 2.4

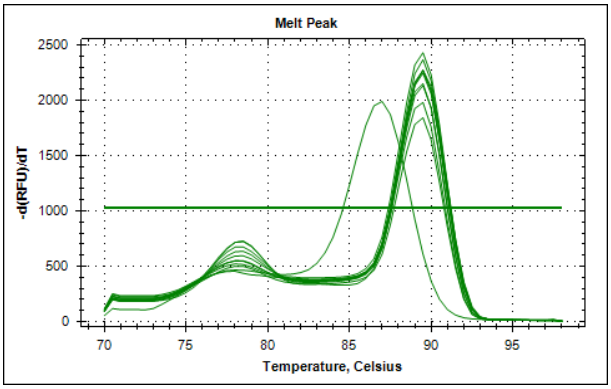
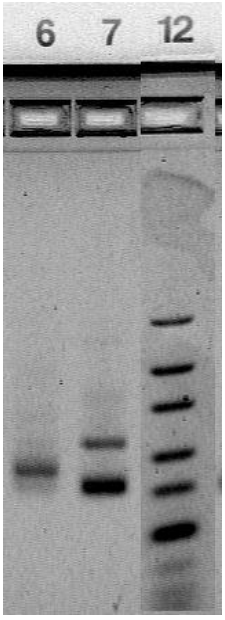


Abb. 3.28: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 2.4



Elektrophoreseprofil 6: NTC, telg/telc/Albugcr2/Albdgcr2:
500/500/200/200 nM
Elektrophoreseprofil 7: Probe, telg/telc/Albugcr2/Albdgcr2:
500/500/200/200 nM
Elektrophoreseprofil 12: Leiter
(50, 75, 100, 150, 200,300 bp aufsteigend)

Abb. 3.29: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.4

Auch die Schmelzanalyse (Abb. 3.28) und die Elektrophorese (Abb. 3.29) waren nicht überzeugend. Im Schmelzprofil zeigte sich erneut nur wenig Telomer-Produkt, während die Elektrophorese dieses relativ deutlich ergab. In beiden Fällen zeigte sich ferner erneut ein Produkt in der NT-Kontrolle, obwohl dieses Problem in den bisherigen methodologischen Vorversuchen als gelöst erschienen war. Die heterogenen Ergebnisse und die Tatsache, dass es große Effizienzunterschiede in den separaten Ansätzen gab, waren Grund zu der Annahme, dass auch der nach Literaturvorgaben hergestellte Mastermix evtl. nicht genug Stabilität bei einer Analyse bieten konnte, die so heikel und diffizil wie die Telomerenanalyse ist. Hierauf wurde erneut in der Literatur eruiert, ob nicht ein Master Mix beschrieben worden war, der Stabilität und Reproduzierbarkeit eher gewährleistete. Hierbei wurde eine Bachelorarbeit [100] identifiziert, die sich mit diesem Thema beschäftigt hatte. In dieser Arbeit wurden drei handelsübliche Master-Mix-Rezepturen als in höherem Maße tauglich hervorgehoben, von denen der HOT FIREpol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX) für die weiteren Versuche gewählt wurde.

3.4.1e Versuche mit HOT FIREpol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX)

Für die folgenden Messungen wurden die gelisteten Materialien verwendet:

1) 5 x HOT FIREpol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX), Solis Biodyne
2) Water, nuclease-free, Thermo Scientific
3) Primer telc/telg, Albugcr2/Albdgcr2, Eurofins MWG Operon
   Primersequenzen (5‘-3‘):
   telg: acactaaGGTTtGGGTTtGGGTTtGGGTTtGGGTTAGtGT
   telc: tgttaggTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAtCCCTAACa
   Erwartete Produktlänge: 79 Basenpaare
   Albugcr2: cggcggcgggcggcgcgggctgggcggccATGCTTTTCAGCTCTGcAAGTC
   Albdgcr2: gcccggcccgccgcgcccgtcccgccgAGCATTAAgCTCTTTGGcAACGTAgGTTTC
   Erwartete Produktlänge: 111 Basenpaare
4) E-Gel® Precast Agarose Gels (4%); Ethidium bromide, Life Technologies
5) GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific
6) CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems und CFX Manager Software (3.0) der Firma Bio-Rad

Versuchsblock 3.1

Die Versuchsbedingungen mussten hierfür erneut an den Master-Mix angepasst werden. Das Temperaturprogramm wurde an die Vorschläge des Herstellers des Master-Mix angepasst; hierbei blieb aber das Prinzip des Programmes nach Cawthon (siehe oben) erhalten (Abb. 3.30).

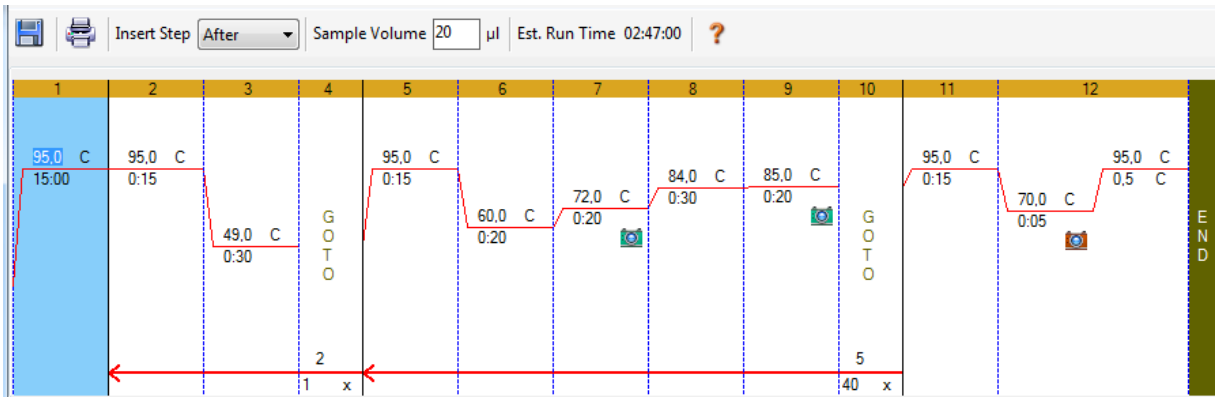
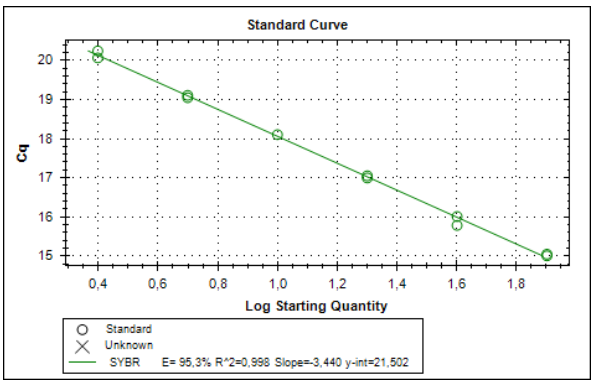
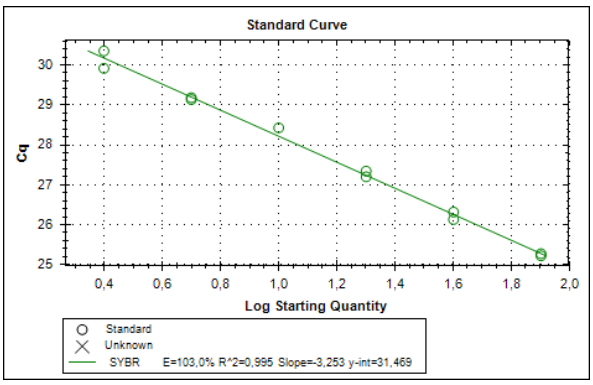


Abb. 3.30: Temperatur Set-up von Versuchsblock 3.1

Als Primer-Konzentration wurde die höchstmögliche, in diesem Fall 250 nM pro Primer, gewählt. Das Reaktionsvolumen wurde aufgrund der Herstellerinformation von 25 µl auf 20 µl pro Ansatz reduziert. Die Standardkurve deckte, wie in den vorherigen Versuchen, den Bereich von 80 bis 2,5 ng ab. Auf Anhieb zeigte dieser Versuchsaufbau ein akzeptables Ergebnis hinsichtlich der Effizienz (Abb. 3.31).



A



B

Abb. 3.31: Standardkurve des entstandenen Telomer-Produktes (A) und des entsprechend entstandenen Albumin-Produktes (B) in Versuchsblock 3.1

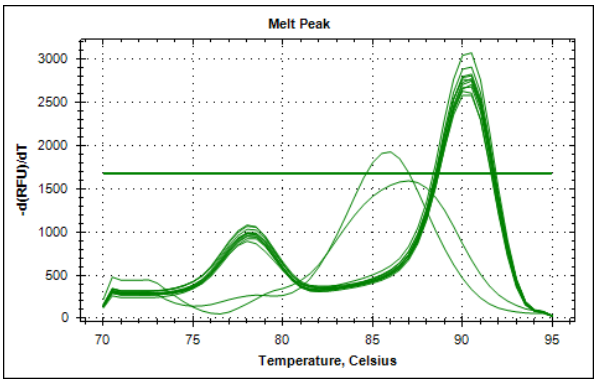
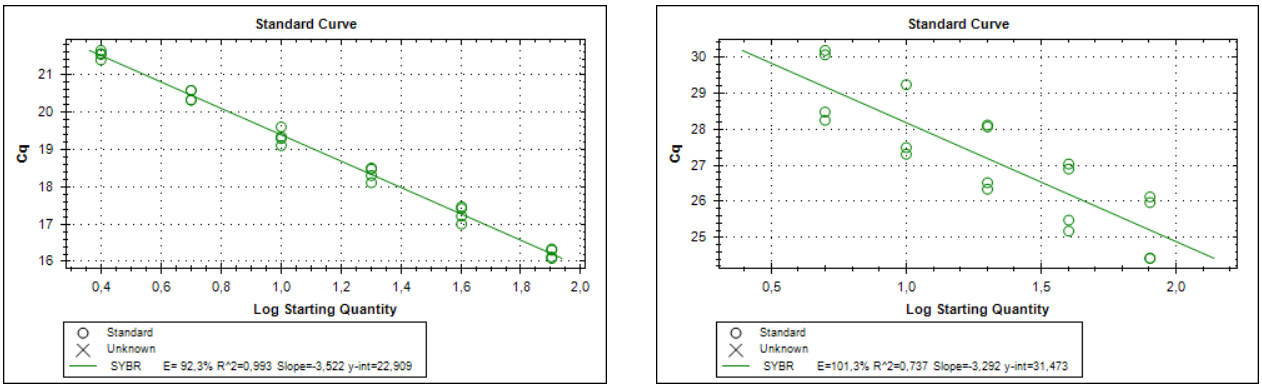


Abb. 3.32: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 3.1

Es entstanden zwei unterschiedliche Produkte, die allerdings gemäß der Schmelzanalyse mengenmäßig zugunsten des Albumins ausfielen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass mehr Telomer-Produkt zu finden wäre. Die im vorherigen Teil beschriebene Möglichkeit des „Stehlens“ des Farbstoffes SYBR-Green durch das GC-reiche Target scheint für EVA-Green unwahrscheinlich. Das Schmelzprofil spiegelte somit vermutlich auch die tatsächlichen Mengenverhältnisse wider. Auch zeigte sich ein deutliches NTC-Produkt.

Versuchsblock 3.2

In den vorherigen Versuchen hatte eine Veränderung der Primer-Konzentrationen die Verschiebung der Produktmengen ermöglicht. Folglich wurde hier ebenso verfahren. Der Telomer-Primer wurde auf 200 nM reduziert, der Albumin-Primer sogar auf 80 nM. 80 nM ist die in der Herstelleranweisung angegebene minimale Menge. Wie schon mehrfach praktiziert, sollte gleichzeitig analysiert werden, ob unterschiedliche Effizienzen und Ct-Werte in separaten Ansätzen zustande kamen. Das Temperaturprogramm und die Standardkurve wurden aus dem Versuchsblock 3.1 übernommen. Einzig die Zyklenzahl wurde von 40 auf 30 Wiederholungen gekürzt. Die Standardkurve wurde nachträglich um die 2,5 ng-Werte gekürzt, da diese für Albumin nicht nachweisbar war. Im Falle des Albumins erwies sich die gleichzeitige Reduktion der Primer-Konzentration und der Zyklenzahl als so drastisch, dass die niedrigste Konzentration entfallen musste.



A **B**

Abb. 3. 33: Darstellung der Standardkurven des entstandenen Telomer-Produktes (A) im Einzelansatz und im gemeinsamen Ansatz (fallen zusammen) und des entsprechend entstandenen Albumin-Produktes (B) im Einzelansatz (unten) und im gemeinsamen Ansatz (oben) in Versuchsblock 3.2

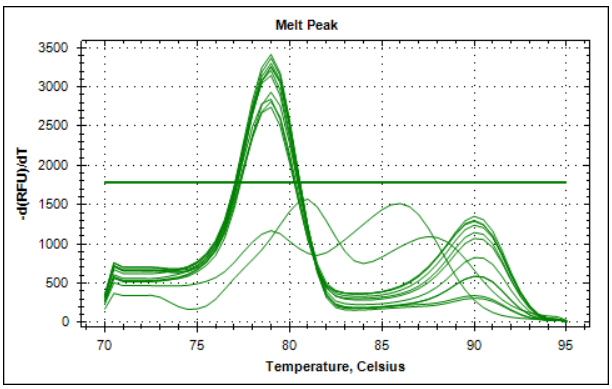
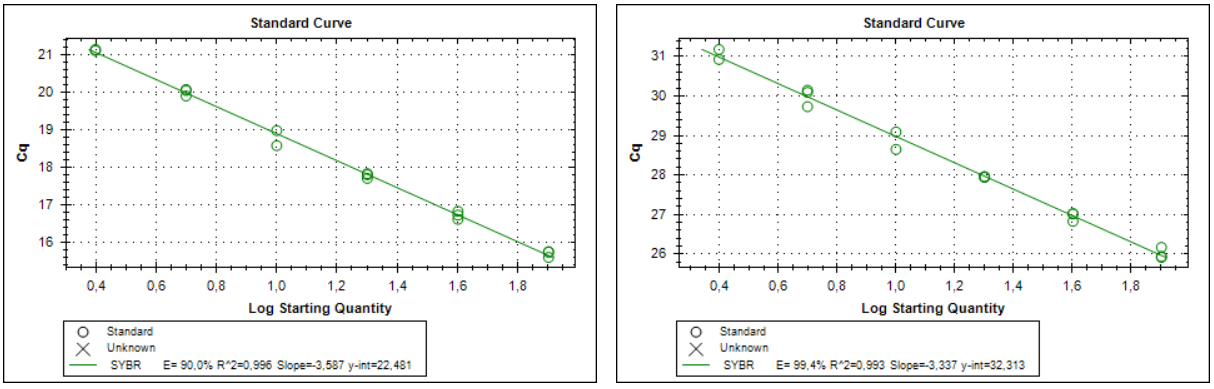


Abb. 3.34: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 3.2

Die Effizienz der Telomer-Standardkurve blieb nahezu unverändert, unabhängig davon, ob es ein Ansatz war, der beide Primerpaare enthielt oder ob die Primer in getrennten Ansätzen analysiert wurde (Abb. 3.33). Die Grafik mit beiden Standardkurven zeigte, dass diese nahezu zusammenfielen. Weniger einheitlich verhielt es sich mit dem Albumin. Die Effizienz variierte leicht zwischen den verschiedenen Ansätzen, und die beiden Standardkurven fielen nicht zusammen. Dennoch waren die Unterschiede relativ gering. Die Schmelzanalyse ergab unspezifische Peaks in der NTC (Abb. 3.34). Diese wurden jedoch als irrelevant erachtet, da der automatisch gewählte Grenzwert (horizontale grüne Linie) oberhalb der Peaks lag und diese somit als nicht nachweisbar galten.

Versuchsblock 3.3

Im letzten Versuchsblock, der in die Etablierung des schlussendlich verwendeten Verfahrens mündete, wurden nochmals geringe Veränderungen vorgenommen. Die Konzentration der Albumin-Primer wurde auf 100 nM erhöht und die Zyklenzahl auf 32.



A **B**

Abb. 3.35: Standardkurve des Telomer-Produktes (A) und die entsprechenden Standardkurven des Albumin-Produktes (B) in Versuchsblock 3.3

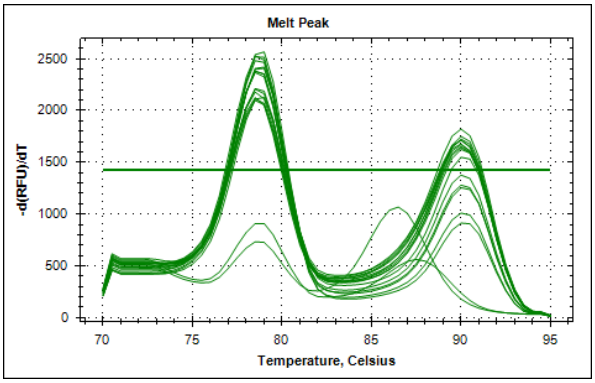
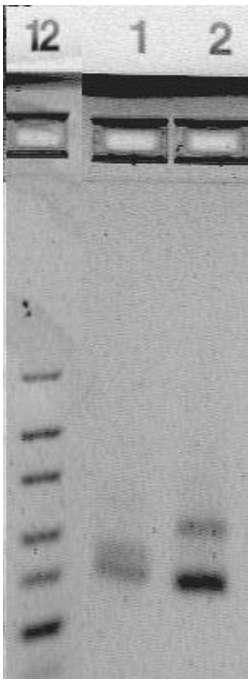


Abb. 3.36: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 3.3



Elektrophoreseprofil 12: Leiter
(50, 75, 100, 150, 200,300 bp aufsteigend)
Elektrophoreseprofil 1: NTC, telg/telc/Albugcr2/albdgcr2:
200/200/100/100 nM
Elektrophoreseprofil 2: Probe, telg/telc/Albugcr2/albdgcr2:
200/200/100/100 nM

Abb. 3.37: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 3.3

Die Standardkurven sind in Abb. 3.35 gezeigt. Die Schmelzkurve (Abb. 3.36) zeigte erneut nur unspezifische NTC-Produkte, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die Gelelektrophorese (Abb. 3.37) ergab Ähnliches. Es existierte nach wie vor eine leichte Bande in der NTC. Diese war allerdings schwach ausgeprägt und auch verschieden von den eigentlichen, gewünschten Produkten. Außerdem begann die Amplifikation nicht spezifischer Produkte in der NTC erst weit nach Abschluss der eigentlichen Amplifikation (Ct 31,2); somit konnte davon ausgegangen werden, dass diese Amplifikation nicht mit derjenigen der eigentlichen Produkte interferierte.

Finales Set-up

Hierbei wurde 5 x HOT FIREpol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX) als Master Mix verwendet. Das Temperaturprogramm galt wie im Versuchsblock 3.3 beschrieben. Als Ergebnis der aufwendigen Vorversuche war es ein Kompromiss aus Herstellerangaben und den Vorschlägen der Literatur, sowie eigenen Erfahrungen. Die Schritte der Amplifikation wurden 31-mal wiederholt, sodass die Amplifikation insgesamt 32 erfolgte. Die Primer wurden auf Konzentrationen von telg/telc jeweils 200 nM sowie Albugcr2/Albdgcr2 jeweils 100 nM festgelegt.

3.4.2 Messung der Telomeren

Während der Rekrutierungszeit der Probanden konnten insgesamt 123 Blutproben für die Messung gewonnen werden. Die Proben wurden grundsätzlich in Triplikaten aufgetragen. Wenn nötig wurden Ausreißer nachträglich entfernt. Mindestens zwei Werte waren notwendig, um einen gültigen Mittelwert zu erhalten. Messwerte wurden dann für die Analyse verwendet, wenn der Variationskoeffizient der über die Standardkurve berechneten Anfangskonzentration bei drei (ggf. zwei) identischen Proben (Starting Quantity, SQ) nicht mehr als 10% betrug. Für die Standardkurve wurde die DNA von zwei bekannten Proben aufgereinigt und anschließend zu einer Pool-DNA kombiniert. Die Standardkurve wurde für jede Platte neu verdünnt. Ausgangsstandard war immer dieselbe Pool-DNA. Für eine spätere Korrektur aufgrund der Interassay-Variation wurde auf jeder Platte derselbe interne Standard mitgemessen. Es handelte sich hierbei um die DNA einer bekannten Probe. Diese wurde einmalig aufgereinigt und für jede Platte gleich verwendet. Sowohl für die Pool-DNA der Standardkurve als auch für den internen Standard galten die Qualitätskriterien wie im Abschnitt DNA-Aufreinigung (Kap. 3.4.1a) beschrieben. Offensichtliche Ausreißer der Standardkurve wurden vor der Analyse entfernt. Das Kriterium war, dass die Punkte bis auf den fraglichen Punkt auf einer Geraden lagen, während der fragliche Punkt deutlich außerhalb lag und durch keine Kombination auf eine Gerade gebracht wurde.

Aufgrund deutlicher Randeffekte wurden die Wells A1 und H12 grundsätzlich von der Analyse ausgeschlossen. Grundsätzlich galt, dass die Effizienz der Standardkurve einer qPCR-Messung in einem Bereich von 90-105% liegen sollte. Soweit als möglich wurde diese Regel eingehalten. Von allen erstellten Telomer-Standardkurven (siehe Anhang 7.3) konnten drei nicht ganz 90% erreichen; der niedrigste Wert lag bei 88%. Alle anderen Standardkurven erfüllten die Kriterien.

Die Ct-Bestimmungsmethode war, wie im Gerät als Standardeinstellung gewählt, die „Single Threshold“-Methode, nicht die „lineare Regression“. Der Threshold wurde automatisch in die Analyse gelegt und manuell nicht verändert. Ein weiteres Kriterium für die Beurteilung einer qPCR-Analyse stellt bekanntlich das Bestimmtheitsmaß R^2 dar. Der Wert beschreibt den Zusammenhang von zwei Variablen und sollte im besten Fall bei 1 liegen. Werte von 0,99 oder größer werden in der Regel akzeptiert. Auf zwei Nachkommastellen gerundet konnten alle Kurven dieses Kriterium erfüllen (schlechtester Wert: 0,988).

Pro Platte konnten Proben von 24 Probanden gemessen werden, für die 123 Proben mussten also 6 Platten vorbereitet werden. 121 der 123 Proben (98,4%) zeigten einen Variationskoeffizient von weniger als 10% und konnten somit für die Datenanalysen herangezogen werden.

Im Anschluss an die Amplifikationsläufe wurde die T/S Ratio der Proben bestimmt und zwar, indem der errechnete SQ_{mean}-Wert für das Telomer-Produkt durch das des Albumins dividiert wurde. Die T/S Ratio der internen Standards jeder Platte wurden gemittelt. Für jede Platte wurde daraufhin ein Korrekturfaktor erstellt, der sich aus dem Quotienten der T/S Ratio des Mittelwertes durch den tatsächlichen Wert der T/S Ratio des internen Standards auf der entsprechenden Platte ergab. Für jede Platte ergab sich somit ein eigener Korrekturfaktor. Die jeweiligen berechneten T/S Ratio der unbekannten Proben wurden anschließend mit dem für ihre Platte spezifischen Korrekturfaktor multipliziert. Somit konnten Effizienzunterschiede bei der Produktentstehung zwischen den unterschiedlichen Platten ausgeglichen werden.

3.4.3 LL-37

Die Bestimmung des LL-37 erfolgte mittels kommerziellem ELISA-Kit (LL-37, Human, ELISA Kit-Hycult Biotech, HK321-02). Für die Messung der LL-37 Protein-Konzentrationen in humanem Plasma wurde venöses EDTA-Blut mit Stabilisatoren mittels BD™ P100 Blood Collection System entnommen, direkt nach der Entnahme mehrfach sanft gemischt und anschließend, wie in der Herstelleranweisung beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 sterile Kryoröhrchen pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Bei der Messung handelte es sich um die quantitative Bestimmung der Protein-Konzentration nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Hierzu wurden die verdünnten Proben auf eine bereits mit Antikörpern beschichtete Platte pipettiert und diese anschließend inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte gewaschen und erneut mit einem markierten Antikörper überschichtet. Es folgten eine weitere Inkubation und ein anschließender Waschvorgang. Im nächsten Schritt wurde an den vorhandenen Komplex ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gebunden und die Platte nochmals bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Tetramethylbenzidin zugegeben, welches nach Aktivierung durch die Peroxidase einen farbigen Komplex bildete. Nach 30-minütiger

Reaktionszeit wurde der Prozess durch Zugabe von Säure gestoppt, und die Platte konnte im Fluoreszenzmessgerät bei 450 nm vermessen werden. Verwendung fand der Varioskan™ Flash Multifunktions-Spektralreader und die SkanIt™ Software (V 2.4.3) der Firma Thermo Scientific.

Innerhalb der Studie war es möglich, Proben von 120 Patienten zu gewinnen. Standards und Proben wurden in Duplikaten aufgetragen. Ein Variationskoeffizient von weniger als 10% galt als Akzeptanzkriterium. Dieser lag für jede Probe innerhalb der Grenze.

Das Vorbereiten der Reagenzien erfolgte nach Herstellerempfehlung. Ein Proteinstandard war ebenso enthalten, wie die detaillierte Beschreibung des Erstellens der Standardkurve. Diese deckte den Bereich von 100 ng/ml bis 0,1 ng/ml ab. Es wurde ebenfalls ein Nullwert mitgemessen (Blank). Das Protokoll gab an, dass 25 bis 250 ng/ml die zu erwartende Größenordnung der Konzentration in humanem Plasma darstellt, daher wurden die Proben vor der Messung 20-fach verdünnt, um in den nachweisbaren Bereich des Kits zu gelangen. Zu diesem Zweck wurden 15 µl Probe mit 285 µl Waschpuffer gemischt. Für die spätere Anpassung an mögliche Interassay-Variationen (Unterschiede der Bestimmung zwischen den Platten) wurde auf jeder Platte ein interner Standard mitgemessen. Es handelte sich hierbei um immer dieselbe Plasmaprobe, die nach der Entnahme ausreichend häufig aliquotiert wurde. So konnte für jede Platte ein frisches Aliquot derselben Probe genutzt werden. Blank, Standardkurve und interner Standard benötigten zusammen 18 Wells, wodurch pro 96-Well Platte die Messung weiterer 39 Proben in Duplikaten möglich war. Entsprechend bedurfte es für 120 Proben 4 Platten.

Im Anschluss an die Messung mit Hilfe des Fluoreszenz-Detektionsgerätes erfolgte ein Abzug des Blindwertes von den gemessenen Konzentrationen. Anschließend wurde der gemessenen Absorption unbekannter Proben über die ermittelte Standardkurve (Cubic Spline) ein Proteinkonzentrationswert zugeordnet. Die Ergebnisse der beiden Messungen wurden gemittelt und mit dem Faktor 20 multipliziert, da vor der Messung alle Proben 20-fach verdünnt wurden. Um für mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Platten eine Anpassung vorzunehmen, wurden alle Werte der jeweilig gemessenen internen Standards zu einem Mittelwert zusammengefasst. Der Quotient aus dem Mittelwert und dem individuellen Wert der Platte galt als Korrekturfaktor für die Werte auf der jeweiligen Platte. Die so korrigierten Werte wurden für die Datenanalyse verwendet.

3.4.4 Advanced Glycation End Products (AGE)

Die Messung der AGE erfolgte mittels eines kommerziellen ELISA-Kits (ELISA Kit for Advanced Glycation End Product (AGE), USCN Life Science Inc., CEB353Ge). Für die Messung in humanem Serum wurde venöses Blut in eine Serum-Monovette (Sarstedt) entnommen und nach ausreichender Koagulationszeit entsprechend zentrifugiert. Pro Patient wurden 500 µl in zwei sterile Eppendorf-Gefäße pipettiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C kryoasserviert.

Der verwendete Kit basierte auf dem Prinzip des kompetitiven ELISA. Das Vorbereiten der Reagenzien erfolgte nach Herstellerempfehlung. Ein Proteinstandard war ebenso enthalten, wie die detaillierte Beschreibung für das Erstellen der Standardkurve. Diese deckte einen Bereich von 98,8 ng/ml bis 8000 ng/ml ab. Es wurde ebenfalls ein Nullwert mitgemessen (Blank). Für die spätere Anpassung an mögliche Interassay-Variationen (Unterschiede zwischen den Platten) wurde auf jeder Platte ein interner Standard mitgemessen. Es handelte sich hierbei um immer dieselbe Serumprobe, welche nach der Entnahme ausreichend oft aliquotiert wurde. Auf diese Weise konnte für jede Platte ein frisches Aliquot derselben Probe genutzt werden. Blank, Standardkurve und interner Standard benötigten zusammen 14 Wells, wodurch pro 96-Well Platte die Messung weiterer 41 Proben in Duplikaten möglich war.

Die Probenlösung mit Analyt (Blank, Standard oder unbekannte Probe), sowie eine zweite Lösung (Detection Reagent A) mit dem nachzuweisenden Antigen in bekannter Konzentration, wurden auf eine bereits mit Antikörper beschichtete Platte pipettiert und anschließend inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang. Im nächsten Schritt wurde an den vorhandenen Komplex ein mit dem Nachweissystem gekoppelter weiterer Antikörper (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat; Detection Reagent B) gebunden und die Platte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Tetramethylbenzidin zugegeben, das nach Aktivierung durch die Peroxidase einen farbigen Komplex bildete. Nach 30-minütiger Reaktionszeit wurde der Prozess durch Zugabe von Säure gestoppt und die Platte im Fluoreszenzmessgerät (Varioskan™, s.o.) bei 450 nm vermessen.

Insgesamt konnten die Proben von 123 Probanden gewonnen werden. Standards und Proben wurden in Duplikaten aufgetragen. Ein Variationskoeffizient von weniger als 10% zwischen den einzelnen Proben eines Probanden galt als akzeptabel. Im Normalfall wird der

ermittelte Absorptionswert der Proben über die Standardkurve in einen Konzentrationswert überführt. Aus Gründen, die auch dem Hersteller des Kits unerklärlich blieben, lagen die Werte der Proben und der Standardkurven in sehr unterschiedlichen Größenordnungsbereichen. Aus diesem Grunde war die Standardkurve nicht gut anwendbar. Da allerdings in dieser Studie nur die Relativwerte der AGEs für die vergleichenden Analysen interessierten, und sowohl die erhaltenen Messwerte, als auch die Standardkurven für sich genommen plausibel erschienen und reproduzierbar waren, wurden die rohen, unkalibrierten Absorptionswerte für die Analysen verwendet. Zu beachten ist, dass die Absorptionswerte im Prinzip invers zur Konzentration sind. In dieser Arbeit sind immer die Absorptionen angegeben, ggf. mit einem ausdrücklichen Hinweis darauf, dass sich die Konzentrationen invers dazu verhalten. Ungeachtet dessen war es möglich, für Unterschiede zwischen den verschiedenen Platten zu korrigieren. Hierzu wurden alle Werte der jeweilig internen Standards zu einem Mittelwert zusammengefasst. Der Quotient aus Mittelwert und dem individuellen Wert der entsprechenden Platte galt als Korrekturfaktor für die Werte auf den entsprechenden Platten. Die korrigierten Werte wurden für die Datenanalyse verwendet.

3.5 Neurologische Untersuchungen

Als erster Schritt wurden die Symptome einer peripheren Neuropathie anamnestisch erhoben. Der Patient wurde hierzu hinsichtlich Symptomen, Lokalisation, Exazerbation und Besserung der Symptome befragt. Dazu wurde der „Neuropathie-Symptom-Score“ gemäß der Nationalen Versorgungsleitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter (04/2012; Version 1.0) verwendet (siehe Anhang Kap. 7.1). Neuropathie-Symptom-Score, Amplitude und Temperaturempfinden wurden nicht für weitere Auswertungen genutzt, Die Beschreibung der Messung des Temperaturempfindens findet sich im Anhang (Kap. 7.2)

3.5.1 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit und der Amplitude des *N.suralis*

Die anschließenden neurologischen Untersuchungen erfolgten alle im Liegen, zumeist in Rückenlagen. Das Gerät NC-stat® DPNCheck der Firma Neurometrix wurde wie vom Hersteller angegeben benutzt, um die Amplitude in [µV] und die Nervenleitgeschwindigkeit in [m/s] des *N.suralis* nichtinvasiv zu messen. Abb. 3.38 zeigt das Gerät und wie es zum Messen angelegt wurde.

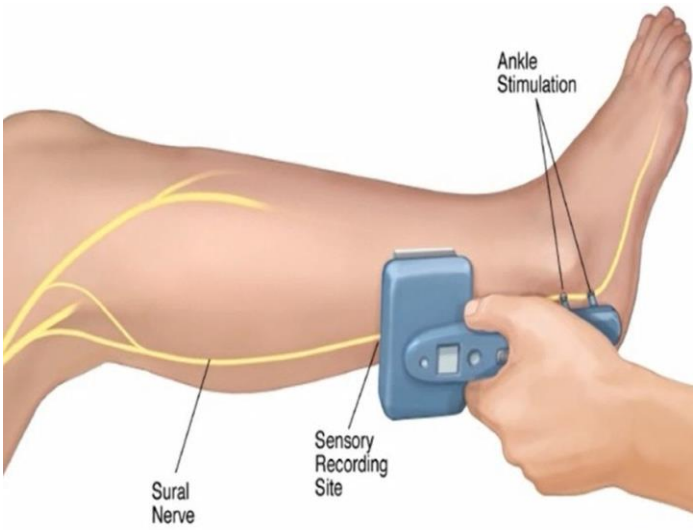


Abb. 3.38: Anlegen des Gerät NC-stat® DPNCheck zum Erfassen von Nervenleitgeschwindigkeit und Amplitude (nach Herstelleranleitung)

3.5.2 Messung des Vibrationsempfindens mittels Rydel-Seiffer-Stimmgabel

Als zweite Messung erfolgte die Erfassung des Vibrationsempfindens mit Hilfe der Rydel-Seiffer-Stimmgabel. Hiermit konnten Sensibilitätsstörungen dicker Nervenfasern aufgedeckt werden. Vor der Untersuchung wurde jedem Patienten das Prinzip der Messung erklärt. Die Stimmgabel wurde stark angeschlagen oder mit den Fingern stark angezupft, so dass der Messwert auf der Skala zunächst oberhalb von 0 lag. In diesem Zustand wurde der Fuß der Gabel nun zunächst auf das Großzehenzwischengelenk, dann auf das Großzehengrundgelenk aufgesetzt. Während der Untersuchung sollte der Patient die Augen geschlossen halten und jeweils genau dann "Jetzt!" sagen, wenn er die Vibration nicht mehr spürte. Der Ergebniswert wurde in diesem Moment vom Untersucher auf der Gabelskala abgelesen (Abb. 3.39).

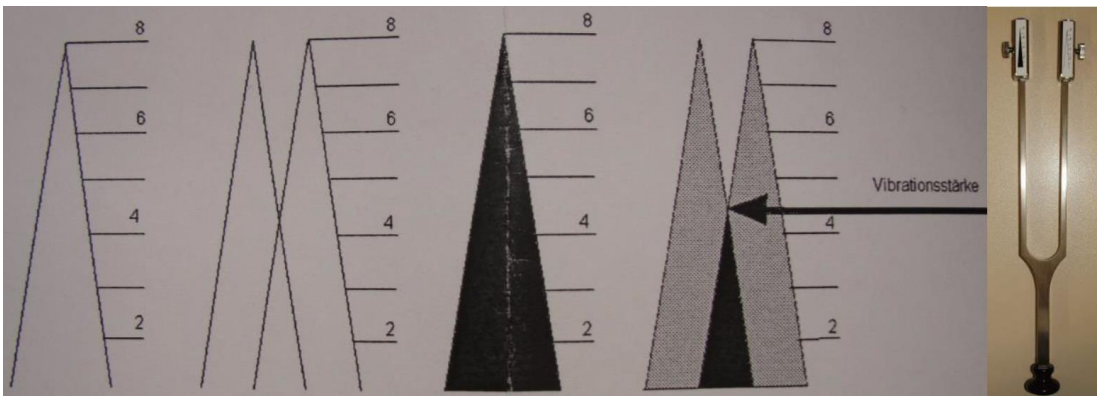


Abb. 3.39: Ableseschema der Rydel-Seiffer-Stimmgabel

3.5.3 Messung der Oberflächensensitivität mittels Semmes-Weinstein Monofilament

Zum Erfassen der Oberflächensensibilität wurde der Test mittels Monofilament nach Semmes-Weinstein (Twin-Tip®) gewählt. Das Aufsetzen des Monofilaments wurde zunächst am Handrücken demonstriert, wobei darauf zu achten war, dass das Filament einmal kurz (<1 sec) zur Biegung gebracht wurde, da man somit eine definierte Kraft ausüben konnte. Das Monofilament wurde an 5 Messstellen beider Füße jeweils zweimal aufgesetzt (Abb. 3.40). Der Patient hielt während der Untersuchung die Augen geschlossen und sollte jedes gespürte Aufsetzen sofort rückmelden, indem er "Jetzt!" sagte. Die Anzahl der korrekt gespürten Berührungen wurde für die einzelnen Untersuchungsstellen während der Untersuchung vom Untersucher dokumentiert.

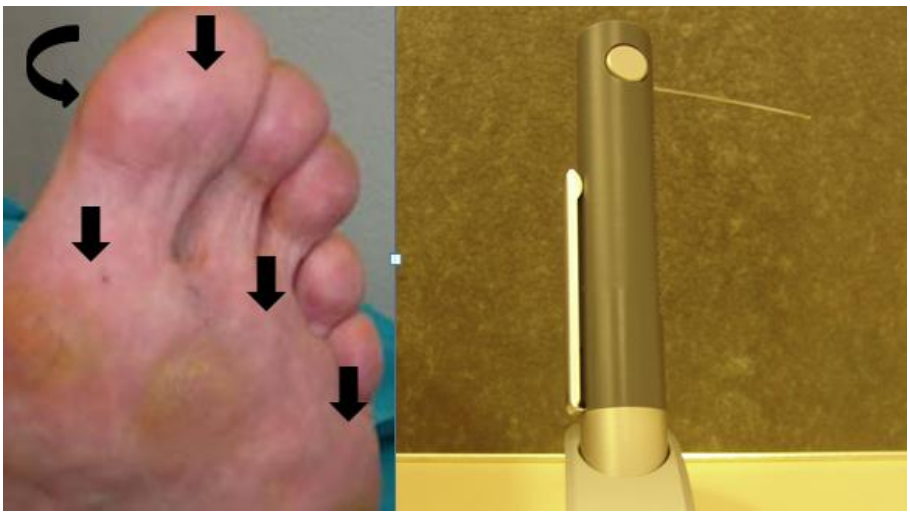


Abb. 3.40: Messpunkte am Fuß für das Monofilament

3.6 Emphysemscore

Der Emphysemscore wurde von Mitarbeitern der MHH Hannover (Biertz, Vogel) und der Arbeitsmedizin der LMU (Jörres) auf der Basis von Daten errechnet, die von dem Studienzentrum Heidelberg (Kauczor) ausgewertet worden waren. Hierbei handelte es sich um 342 CT-Aufnahmen, die in den Studienzentren innerhalb von 4 Jahren vor Einschluss der Patienten verfügbar waren, sei es im Studienzentrum selbst oder aus anderen Quellen. Diese CTs waren für klinische Routinezwecke erstellt worden, da weder die COSYCONET

Gesamtstudie, noch die Teilstudie im Studienzentrum München prospektive CT-Aufnahmen vorsah.

Im Studienzentrum Heidelberg wurden die Aufnahmen daraufhin gesichtet, ob sie überhaupt verwertbar waren für die Entscheidung, ob ein klinisch relevantes Emphysem zu diagnostizieren war. Die Aufnahmen wurden auf einen möglichst einheitlichen Status gebracht und visuell sowie quantitativ nach folgenden Parametern ausgewertet:

Binärer Emphysem-Score (Emphysem vorhanden vs. kein Emphysem oder nicht entscheidbar), mittlere Lungendichte, 15. Perzentil der Lungendichte, Emphysem-Index.

Die vorläufigen statistischen Auswertungen hatten ergeben, dass der binäre Emphysemscore den anderen, kontinuierlichen Scores überlegen war, wenn es um eine möglichst gute Vorhersage der tatsächlichen Klassifikation durch Lungenfunktionsparameter ging. Daher wurde in der vorliegenden Studie nur der binäre Score ausgewertet. Die beste Vorhersage war möglich mit Hilfe der Lungenfunktionsmessgrößen FEV_1/FVC (Tiffeneau), TLCO %Soll, TLC %Soll, Spezifischer Atemwegswiderstand sRaw, absolutes FEV_1. Diese Größen erwiesen sich in einer logistischen Regressionsanalyse als diejenigen Parameter, die signifikant mit dem binären Score zusammenhingen. Die genannten Messgrößen waren in fast allen Patienten der LMU-Kohorte verfügbar; daher konnte die Vorhersagefunktion eingesetzt werden, um bei allen Patienten und nicht nur den Patienten, bei denen ein auswertbares CT vorlag, zu einer Entscheidung über das Vorliegen oder Nichtvorliegen eines Emphysems zu kommen.

3.7 Elektronische Nase

Cyranose® 320

Die Cyranose® 320 (Smiths Detection, Cyrano Sciences, Inc., Pasadena, California, USA) ist eine tragbare Elektronische Nase (Abb. 3.43) und ein klassischer Vertreter der Polymersensoren-Geräte. Das Polymer-Sensorarray besteht aus 32 individuell dotierten Sensoren und wird auch als Nose-Chip bezeichnet. Der elektrische Widerstand der Sensoren ändert sich durch die Aufnahme verschiedener Substanzen und das damit verbundene Anschwellen der Polymerschichten. Die Aufnahme durch die Sensoren ist abhängig von Struktur, Größe und Polarität der Analyten und somit durch die physikochemischen

Eigenschaften der Einzelkomponenten des Gemisches determiniert. Die unterschiedliche Dotierung der Sensoren bedingt unterschiedliche Affinitäten der Analyten zu den Sensoren. Das Sensormaterial besteht aus einem dünnen Polymerfilm, an den eine Spannung angelegt wird. Die Exposition gegenüber den Gasgemischen führt zu einem Anschwellen der Polymerschicht, wenn die Analyten in die Polymerschicht aufgenommen werden. Es entstehen somit für unterschiedliche Substanzgemische Profile aus 32 kombinierten Einzelsignalen, deren charakteristische Muster als Smell-Prints bezeichnet werden. Die Messung über den Nose-Chip erfolgt bei konstant gehaltener Temperatur der Sensoren.

Die Cyranose® 320 besitzt ein getrenntes Spül- sowie Probennahme-System. Über den Spüleingang (Purge-Inlet) wird Raumluft eingesaugt, gefiltert und gelangt sodann zu den Sensoren. Der gemessene Wert wird als Referenz-Widerstand R_0 bezeichnet und zur späteren Berechnung der Signalstärke herangezogen. Er gewährleistet auch das Zurücksetzen der Sensoren auf den Ausgangswert nach jeder Messung. Über den Probeneingang (Sample-Inlet) erreichen die zu messenden Proben die Sensoren. Der hier von jedem Sensor gemessene Wert wird als R_{max} bezeichnet.

Die Volumenzunahme während Messung führt zu einer Widerstandsänderung der Sensoren. Erfasst wird das Abfallen der Spannung während der Volumenzunahme des Sensors. Somit findet sich ein Widerstandsanstieg, dessen Wert angezeigt wird. Der maximale Widerstand während der Exposition gegenüber einem Testgas, R_{max} genannt, wird durch die folgende Formel anhand des Referenzwertes R_0 relativiert:

$(R_{max}-R_{0)}/R_0 = \Delta R/R_0)$

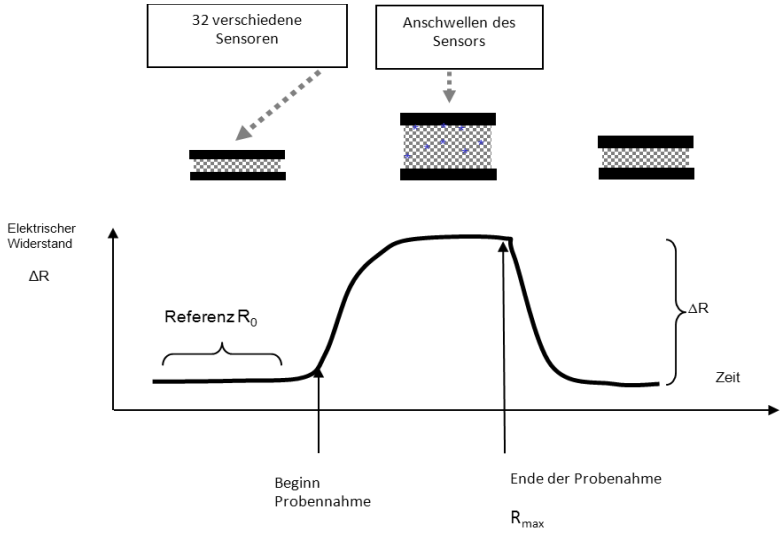


Abb. 3.41: Schematische Darstellung einer Sensorantwort bei Analytenexposition [101]

Die in Abb. 3.41 gezeigte Signalerfassung und Berechnung erfolgt für jeden der 32 Sensoren und resultiert in einem charakteristischen Profil (Smell-Print) wie in Abb. 3.42 dargestellt.

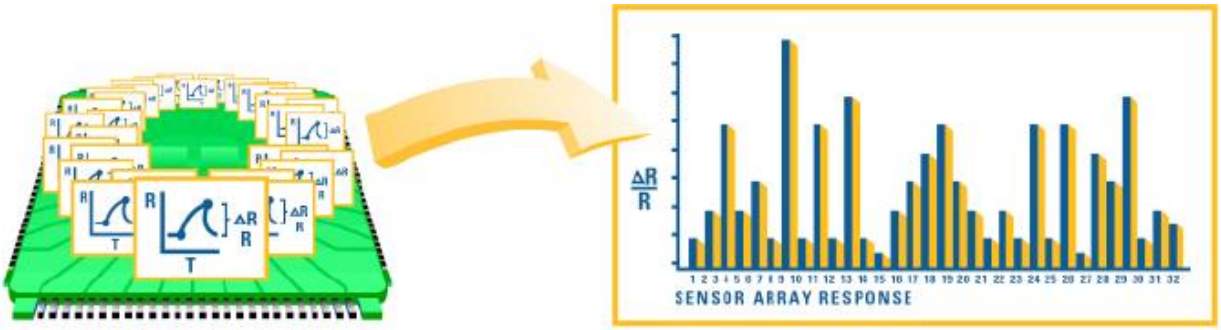


Abb. 3.42: Verarbeitung der Sensorreaktionen zu charakteristischen Profilen [102]

Set-up der Messung

Die Patienten wurden in der Regel direkt zu Beginn einer Visite zur Messung an der Elektronischen Nase geführt, d.h. vor Broncholyse.

Zur Messung saß der Patient und atmete durch den Mund über ein beheiztes Zwei-Wege-Ventil ruhig in ein Plexiglasrohr (Abb. 3.43). Durch eine Nasenklemme war die Nasenatmung unterbunden. Nach einem zweiminütigen Spülvorgang mit Ausatemluft wurde über einen Probenahmeschlauch Ausatemluft aus dem kontinuierlichen Atemstrom des Patienten entnommen und direkt in das Gerät gezogen. Insgesamt wurden drei Messungen aus dem Atemstrom vorgenommen, wobei eine neue Messung immer dann gestartet wurde, wenn dann Gerät signalisierte, die vorherige Messung abgeschlossen zu haben.

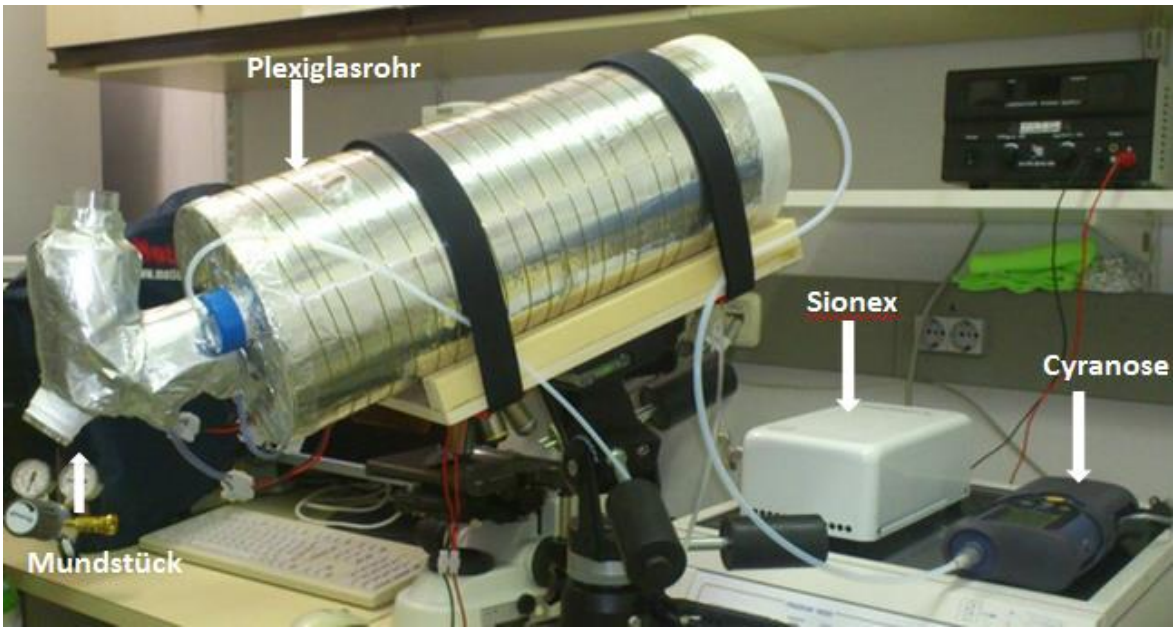


Abb. 3.43 Messaufbau für die Cyranose® 320

Messungen mit der Elektronischen Nase wurden bereits in zwei vorangegangenen Doktorarbeiten [101, 103] durchgeführt, jedoch mit einem anderen Versuchsaufbau (Sammlung im Probennahmebeutel). Die Geräteeinstellungen der Cyranose® 320, die in diesen Arbeiten erprobt und validiert worden waren, wurden für die gegenwärtige Arbeit übernommen. Die Pumpgeschwindigkeit lag bei 120 ml/min (Baseline Purge, Sample Draw 1) und 180 ml/min (1st Air Intake Purge, 2nd Sample Gas Purge); sowohl für die Baseline-Messung als auch die Probenahme wurden 60 sec Probenahmedauer angesetzt (Abb. 3.44). Fast alle Sensoren erreichten in dieser Zeit einen Plateauwert. Eine noch längere Probennahmezeit war nicht ratsam, da einzelne Sensoren dann bereits wieder einen Abfall der Messwerte zeigen konnten. Die Analyse der Daten ergab, dass der Variationskoeffizient der ersten der drei Messungen i.d.R. über 10% lag; aus diesem Grunde wurde nur der Mittelwert der Messungen 2 und 3 für die Analyse herangezogen.

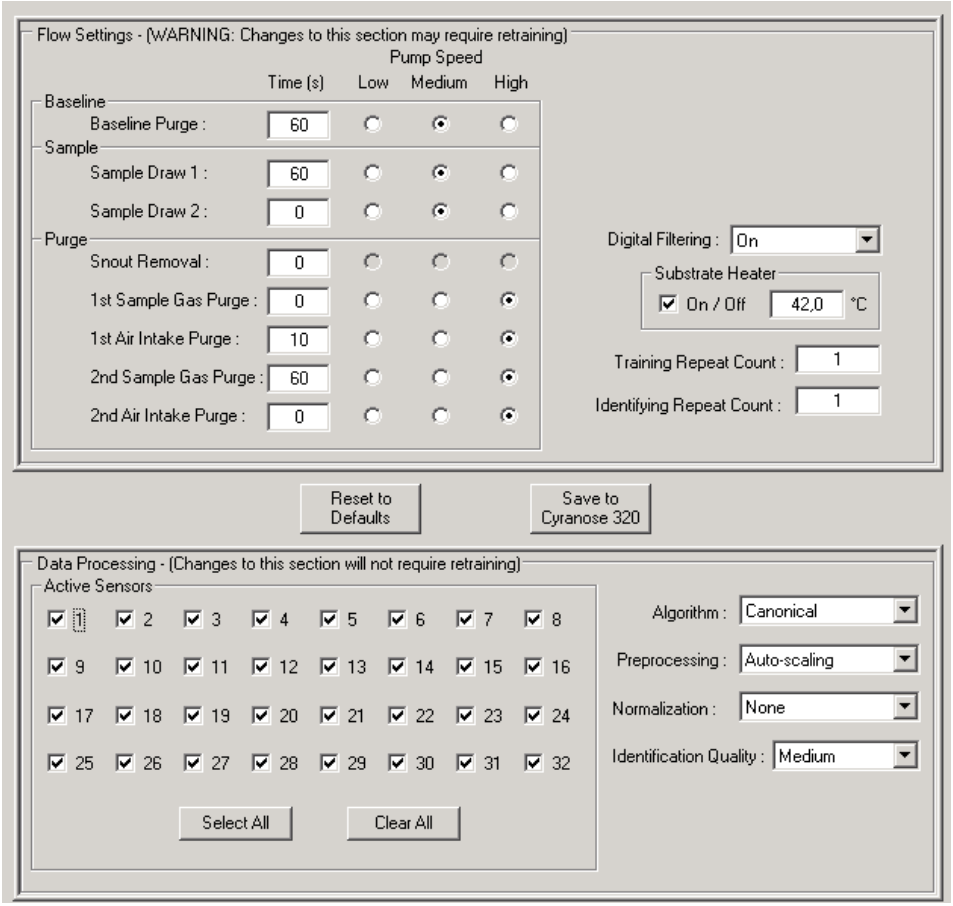


Abb. 3.44: Set-up Panel der Cyranose® 320 zur Verdeutlichung der Einstellungen

3.8 Datenauswertung

Zur Beschreibung der Daten wurden überwiegend Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) verwendet, wenn dies mit der Verteilung der Daten kompatibel war. Zusätzlich fanden Mediane und Quartile bei Bedarf Anwendung. Zum Vergleich von Werten zweier Gruppen wurden der unpaarige t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, je nach Verteilung. Zum Vergleich gepaarter Daten dienten der paarige t-Test oder gegebenenfalls der Wilcoxen-Paardifferenzen-Test. Wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, fanden eine entsprechende Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) oder das nichtparametrische Pendant des Kruskal-Wallis-Tests Anwendung. Hierbei kamen die entsprechenden Post Hoc-Tests (Dunn, Holm-Sidak) zum Einsatz, um zu eruieren, auf welche Gruppen gegebenenfalls ein Unterschied zurückzuführen war.

Der Zusammenhang zwischen kontinuierlichen Variablen wurde mittels einfacher oder multivariater Regressionsanalyse analysiert, der Zusammenhang einer binären Variablen mit anderen, kontinuierlichen oder kategorialen Variablen mit Hilfe des Verfahrens der

logistischen Regressionsanalyse. Zusätzlich wurde in einzelnen Fällen die Kovarianz-Analyse (ANCOVA) eingesetzt, um den Einfluss kontinuierlicher Kovariater zu berücksichtigen. Der Grad der Beziehung zwischen zwei Variablen wurde mit Hilfe des linearen Korrelationskoeffizienten nach Pearson oder gegebenenfalls des Rankkorrelations-koeffizienten nach Spearman beurteilt. Im Falle von binären Variablen wurden Vierfelder-Tafeln mittels des Chi-Quadrat-Tests ausgewertet.

Angesichts des begrenzten Datensatzes (n=127 max.) einerseits, der Vielzahl von Variablen und Fragenstellungen andererseits, wurde darauf geachtet, die Zahl der statistischen Analysen auf das Notwendige zu beschränken und in multivariaten Analysen so wenige Variablen als möglich mitzuführen. Das Signifikanzniveau wurde durchgängig bei $p \leq 0{,}05$ angenommen. Korrekturen für multiple Testungen wurden in dieser explorativen Studie nicht angewendet, stattdessen wurden soweit als sinnvoll die p-Werte explizit angegeben, insbesondere wenn diese Werte ≤0,10 waren. Die Daten wurden in Excel-Tabellen erfasst, mehrfach korrekturgelesen, u.a. in Zusammenarbeit mit der Qualitätskontrolle der COSYCONET-Datenbank in Hannover. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms Sigma Plot (SigmaPlot™ Version 13, Systat Software, San Jose, CA) sowie SPSS (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

4. Ergebnisse

Die vorliegende Studie ist eine Querschnittsstudie, indem nur ein Gesamtdatensatz pro Patient ausgewertet wurde. Bei allen 127 Patienten, die in die Studie Eingang fanden, stammten die Daten von Anamnese, Lungenfunktion, Funktionstests, Fragebögen und Blutproben von der gleichen Visite. Bei 41 Patienten stammten die Daten der Hautalterung von einer anderen, zeitlich nächstgelegenen Visite, bei 35 Patienten diejenigen der Polyneuropathie, und bei 26 Patienten diejenigen der Elektronischen Nase. Da die Patienten grundsätzlich nur in stabilem Zustand untersucht wurden und die Abstände i.d.R. nur sechs Monate betrugen, wurde diese Vorgehensweise als gerechtfertigt betrachtet, um einen möglichst vollständigen Datensatz zu erzielen.

4.1 Basischarakteristika der Kohorte

4.1.1 Anthropometrische Daten

Unter den 127 Patienten befanden sich 64 (50,4%) Frauen und 63 (49,6%) Männer. Das mittlere (±SD) Alter betrug 67 ± 8,22 Jahre, der mittlere BMI 27,07 ± 5,32 kg/m^2, der mittlere Bauchumfang 97,8 ± 15,74 cm und die mittlere Waist-to-Hip Ratio 0,94 ± 0,11. 26 (20,5%) der Patienten wiesen spirometrisch das COPD-Stadium GOLD 1 auf, 44 (34,6%) GOLD 2, 25 (19,7%) GOLD 3 und 26 (20,5%) GOLD 4. Ferner wurden 6 (4,7%) Patienten eingeschlossen, die dem zeitweise üblichen Stadium GOLD 0 zugewiesen wurden, da sie chronische Symptome einer Bronchitis aufwiesen, jedoch mit der Lungenfunktion noch im als normal geltenden Bereich lagen. Da die Einteilung in die GOLD-Klassen in der vorliegenden Studie nur eine sekundäre Rolle bei der Auswertung spielte, wurden die bislang in Klinik und Forschung hauptsächlich verwendeten EGKS-Sollwerte [104] herangezogen statt der neueren GLI-Sollwerte [105]. Eine Gegenüberstellung der Klassifikationen findet sich in der Gesamtstudie.

Die anthropometrischen und lungenfunktionsanalytischen Charakteristika der Patienten relativ zu den fünf GOLD-Klassen sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 angegeben. Für alle diesbezüglichen statistischen Vergleiche wurden die Gruppe GOLD 0 und GOLD 1 zusammengefasst, sodass insgesamt vier COPD-Klassen resultierten. Gegebenenfalls wurden weitere GOLD-Klassen für die Analysen zusammengefasst, vor allem die Klassen 0-2 und 3-4.

Der Vergleich der GOLD-Klassen erfolgte mittels üblicher Einweg-Varianzanalyse (ANOVA). Das Alter der Patienten unterschied sich nicht signifikant zwischen den GOLD-Klassen, ebenso die Geschlechtsverteilung. Sowohl der Bauchumfang als auch die Waist-to-Hip Ratio zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede über die GOLD-Stadien. Der BMI hingegen war zwischen den verschiedenen Krankheitskategorien signifikant verschieden (p=0,039), wobei die Post-Hoc Analyse (Dunn) ergab, dass für dieses Ergebnis der Unterschied zwischen den Stadien GOLD 2 vs. GOLD 4 ausschlaggebend war (p=0,038).

Tab. 4.1: Anthropometrische Charakteristika der Patienten

		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	0	6	26	44	25	26	127
Alter [J]	Mittelwert	69,30	66,50	67,50	67,20	65,00	66,80
	SD	14,90	8,30	8,20	7,10	7,60	8,20
	Quart1	65,75	59,25	62,75	64,00	62,00	62,00
	Median	72,00	67,50	68,00	66,00	65,50	67,00
	Quart3	77,50	72,75	72,25	72,00	68,75	72,00
BMI [kg/m^2]	Mittelwert	26,40	28,12	28,07	25,98	25,53	27,07
	SD	3,83	5,41	4,20	4,03	7,59	5,32
	Quart1	24,00	24,78	25,38	23,00	21,93	23,80
	Median	26,80	27,20	27,70	26,40	24,85	27,20
	Quart3	29,00	29,58	31,08	29,30	27,40	29,40
	n	6	26	44	25	25	126
Bauchumfang [cm]	Mittelwert	92,17	99,27	98,98	98,40	94,96	97,80
	SD	15,37	14,30	14,53	12,13	21,94	15,74
	Quart1	85,50	91,00	88,00	89,00	77,00	88,00
	Median	87,00	98,50	97,50	100,00	97,00	98,00
	Quart3	97,75	107,00	109,50	106,00	104,00	106,75
Waist-to-Hip [Ratio]	Mittelwert	0,89	0,94	0,93	0,97	0,93	0,94
	SD	0,15	0,10	0,10	0,09	0,12	0,11
	Quart1	0,79	0,87	0,88	0,93	0,82	0,88
	Median	0,88	0,95	0,93	0,95	0,94	0,94
	Quart3	0,96	1,00	1,00	1,04	1,05	1,02

4.1.2 Lungenfunktionsdaten

Analog den zur Definition der GOLD-Stadien verwendeten Werten von FEV_1 zeigten auch die Werte von FVC, IVC, ERV und IC eine signifikante Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung ($p<0,001$ bzw. $p=0,006$ bzw. $p=0,036$ bzw. $p<0,001$). Darüber hinaus fanden sich Unterschiede in den ganzkörperplethysmographischen Daten. Dies betraf ITGV, RV und TLC ($p<0,001$ bzw. $p<0,001$ bzw. $p=0,014$) sowie die spezifischen Atemwegswiderstände sRtot und sReff ($p<0,001$ bzw. $p<0,001$). In jeder der einzelnen GOLD-Klassen war, wie zu erwarten, der Wert sRtot größer als der Wert von sReff (jeweils $p<0,001$). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Obstruktion und Übergewicht zu eruieren, wurden verschiedene ganzkörperplethysmographische Messgrößen zu Indices des Übergewichtes in Beziehung gesetzt. Der Quotient aus sRtot und sReff, der ein Maß für die Öffnung bzw. die Asymmetrie der Atemschleifen darstellt, war nicht signifikant korreliert mit BMI, Bauchumfang und Waist-to-Hip Ratio; weder in der Gesamtgruppe der Patienten, noch in den Patienten niedriger Schwergrade 0-2. Die letztere Teilgruppe wurde deshalb separat analysiert, weil in ihr eine Adipositas-bedingte Atemwegsobstruktion am ehesten erkennbar sein sollte.

Die Diffusionskapazität, TLCO, zeigte einen signifikanten Unterschied über die COPD-Kategorien, während sich für den Parameter VA keine Signifikanz ergab, wohl aber ein Trend. ($p<0,001$ bzw. $p=0,077$). Die Differenz zwischen den Absolutwerten von TLC und VA, als Maß der Nichtbelüftung der Lunge, war ebenfalls zwischen den COPD-Stadien verschieden ($p<0,001$). Hierbei bestand gemäß Post-Hoc Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen den COPD-Stadien 4 und 0,1 ($p<0,001$), 4 und 2 ($p<0,001$), 3 und 0,1 ($p<0,001$) sowie 2 und 0,1 ($p=0,003$).

Tab. 4.2: Lungenfunktionswerte der Probanden

		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	n	6	26	44	25	26	127
sRtot [kPa*sec]	Mittelwert	1,02	0,99	1,77	2,63	3,91	2,18
	SD	0,55	0,43	0,83	1,01	2,37	1,63
	Quart1	0,66	0,71	1,27	1,66	2,29	1,18
	Median	0,93	0,85	1,50	2,45	3,06	1,64
	Quart3	1,26	1,17	2,12	3,47	4,80	2,70
	n	6	26	44	24	24	124
sReff [kPa*sec]	Mittelwert	0,72	0,80	1,47	2,20	3,49	1,83
	SD	0,46	0,36	0,53	0,83	1,91	1,36
	Quart1	0,55	0,57	1,11	1,51	2,02	1,01
	Median	0,89	0,72	1,38	2,26	3,20	1,43
	Quart3	1,06	0,96	1,77	2,58	4,46	2,28
	n	6	26	44	25	26	127
FEV_1 [%Soll]	Mittelwert	89,63	89,19	62,08	43,91	36,94	60,21
	SD	24,92	6,70	7,63	4,84	12,51	21,66
	Quart1	70,50	83,88	55,71	40,68	28,45	45,57
	Median	80,00	87,84	60,90	45,42	34,89	57,95
	Quart3	111,93	95,04	68,69	47,42	44,57	75,40
FVC [%Soll]	Mittelwert	95,95	113,31	94,45	81,80	75,29	92,17
	SD	25,92	12,00	12,69	16,59	19,38	20,11
	Quart1	79,03	105,70	84,92	67,67	60,65	76,03
	Median	88,38	113,03	95,18	78,51	71,33	94,35
	Quart3	115,067	121,65	104,285	95,2417	87,9568	108,295
ITGV [%Soll]	Mittelwert	109,51	113,48	137,27	155,86	183,21	144,16
	SD	29,56	19,52	24,85	29,65	43,53	38,40
	Quart1	94,89	101,25	120,60	134,86	154,05	115,83
	Median	99,01	108,51	133,87	152,53	181,29	140,84
	Quart3	132,91	122,35	152,01	175,63	202,79	165,43
ERV [l]	Mittelwert	0,64	0,75	0,80	0,95	0,94	0,84
	SD	0,63	0,44	0,59	0,41	0,51	0,51
	Quart1	0,18	0,45	0,46	0,73	0,57	0,50
	Median	0,53	0,69	0,67	0,87	0,81	0,72
	Quart3	0,89	0,94	0,91	1,16	1,14	1,02

TLC [%Soll]	Mittelwert	101,49	113,59	117,30	121,29	131,27	119,44
	SD	20,41	12,14	15,32	18,98	26,13	19,58
	Quart1	91,97	106,55	106,96	108,86	114,15	107,07
	Median	107,73	115,20	115,48	120,30	127,24	118,54
	Quart3	114,51	120,88	127,83	134,89	143,72	129,40
RV [%Soll]	Mittelwert	122,02	124,66	143,67	170,99	215,27	163,83
	SD	33,14	19,64	28,58	39,07	65,42	50,48
	Quart1	105,54	108,09	134,50	151,04	164,68	131,63
	Median	123,49	127,91	154,45	172,70	205,90	154,23
	Quart3	132,45	135,40	168,77	196,00	253,87	183,65
	n	6	26	44	25	25	126
IVC [l]	Mittelwert	2,88	3,82	3,33	3,25	2,80	3,29
	SD	1,04	0,93	1,07	0,90	0,93	1,02
	Quart1	2,17	3,04	2,55	2,59	2,21	2,52
	Median	2,27	3,37	3,04	3,22	2,53	3,06
	Quart3	3,68	4,53	4,00	3,98	2,93	3,99
IC [l]	Mittelwert	2,24	3,07	2,53	2,30	1,87	2,45
	SD	0,63	0,73	0,71	0,68	0,55	0,77
	Quart1	1,78	2,43	2,01	1,86	1,58	1,89
	Median	2,22	2,95	2,46	2,25	1,69	2,35
	Quart3	2,42	3,72	3,00	2,60	1,97	2,98
	n	6	24	44	25	25	123
TLCO [%Soll]	Mittelwert	68,03	75,31	61,27	49,23	36,01	56,96
	SD	22,03	25,61	14,99	13,39	13,23	21,65
	Quart1	54,76	55,78	48,07	37,51	26,91	42,67
	Median	69,12	69,07	60,35	49,12	32,07	54,33
	Quart3	79,59	90,16	72,48	57,12	42,02	69,01
VA [l]	Mittelwert	4,36	5,19	4,75	4,76	4,22	4,72
	SD	1,51	1,18	1,17	1,18	1,00	1,18
	Quart1	3,42	4,23	3,72	3,88	3,60	3,79
	Median	3,56	4,66	4,55	4,70	4,01	4,50
	Quart3	5,07	6,25	5,77	5,61	4,62	5,67

4.1.3 Zusätzliche funktionelle Daten und Fragebogendaten

Zusätzlich wurden bei den Probanden andere funktionelle sowie Fragebogendaten erhoben (CAT, mMRC, T&go, 6MWD, DemTect, ABI). Diese sind in Tabelle 4.3 für die verschiedenen GOLD-Klassen aufgeschlüsselt.

Der Unterschied der Werte des mMRC zwischen den verschiedenen Stadien erwies sich in der Gesamtgruppe der Patienten als statistisch signifikant ($p<0,001$); die Signifikanz kam im Wesentlichen durch die Unterschiede zwischen (GOLD 4 vs. GOLD 0+1; $p<0,001$ und GOLD 4 vs. GOLD 2; $p=0,002$) zustande. Im 6MWD ergab sich ebenfalls ein signifikanter Gesamtunterschied zwischen den Gruppen ($p=0,007$); dieser war auf Unterschiede zwischen GOLD 4 vs. GOLD 0+1 ($p=0,009$) und GOLD 4 vs. GOLD 2 ($p=0,013$) zurückzuführen. Weiterhin bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem T&go und den vier getesteten GOLD-Stadien ($p=0,033$), der maßgeblich durch den Unterschied von Gruppe GOLD 4 vs. GOLD 2 ($p=0,041$) bedingt war. In letzter Konsequenz war auch der BODE-Score, der sich aus den Werten der Lungenfunktion, 6MWD, BMI und mMRC zusammensetzt, hochsignifikant mit den GOLD-Stadien korreliert ($p<0,001$), besonders wenn man die Gruppen GOLD 3 und 4 den Gruppen 0-1 und 2 gegenüberstellte (jeweils $p<0,001$).

Weder für den CAT-Fragebogen und den DemTect, noch für den Vergleich mit den ABI-Werten gab es statistisch signifikante Zusammenhänge mit den unterschiedlichen Krankheitsstadien.

Tab. 4.3: Zusätzliche funktionelle und Fragebogendaten der Patienten

		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	n	6	26	44	25	26	127
CAT	Mittelwert	15,83	15,58	16,61	16,84	19,69	17,04
	SD	7,17	6,29	6,92	6,83	7,88	7,03
	Quart1	12,00	11,25	11,00	11,00	13,50	12,00
	Median	13,50	15,00	17,00	17,00	20,00	17,00
	Quart3	18,75	21,00	23,00	20,00	26,25	21,50

mMRC	Mittelwert	1,33	1,23	1,36	1,56	2,15	1,54
	SD	1,03	0,91	0,69	0,77	0,78	0,84
	Quart1	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00
	Median	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00
	Quart3	1,75	2,00	2,00	2,00	3,00	2,00
	n	5	24	44	25	26	124
T&go [s]	Mittelwert	6,64	6,92	6,62	7,10	8,02	7,07
	SD	1,04	2,67	1,49	1,47	2,33	1,98
	Quart1	6,00	5,30	5,50	6,10	6,55	5,70
	Median	6,50	6,80	6,70	7,30	7,90	7,00
	Quart3	6,80	7,75	7,63	7,95	9,80	8,03
	n	6	25	44	25	25	125
6MWD [m]	Mittelwert	420,00	469,64	449,36	435,12	375,60	434,41
	SD	131,42	95,82	109,46	64,26	100,64	102,11
	Quart1	391,00	427,00	396,50	384,00	352,00	380,00
	Median	451,00	480,00	450,00	439,00	405,97	436,00
	Quart3	514,75	540,00	523,00	480,00	408,93	507,00
	n	6	26	44	25	26	127
DemTect	Mittelwert	17,67	15,46	16,27	16,08	16,62	16,20
	SD	0,52	2,98	2,02	2,23	1,58	2,21
	Quart1	17,25	14,25	15,00	16,00	16,00	15,00
	Median	18,00	16,00	17,00	17,00	17,00	17,00
	Quart3	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00
	n	6	26	40	25	25	122
ABI	Mittelwert	1,23	1,20	1,21	1,18	1,16	1,19
	SD	0,15	0,10	0,17	0,14	0,20	0,16
	Quart1	1,20	1,15	1,14	1,07	1,05	1,13
	Median	1,24	1,21	1,22	1,23	1,20	1,22
	Quart3	1,31	1,27	1,32	1,26	1,31	1,30

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde bei den Patienten ebenfalls eine ausführliche Anamnese erfasst, deren Schwerpunkt auf Komorbiditäten und Medikation lag. Die diesbezüglichen Daten sind in den Tabellen 4.4 und 4.5 angegeben.

Tab. 4.4: Komorbiditäten der Patienten

	Fehlend*	GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
n		6	26	44	25	26	127
Schlafapnoe	0	0 (0%)	4 (15,4%)	4 (9,1%)	5 (20%)	5 (19,2%)	18 (14,2%)
Bluthochdruck	0	2 (33,3%)	13 (50%)	25 (56,8%)	15 (60%)	15 (57,7%)	70 (55,1%)
Durchblutungsstörungen Herz	0	1 (16,7%)	3 (11,5%)	6 (13,6%)	5 (20%)	3 (11,5%)	18 (14,2%)
Herzinfarkt	0	1 (16,7%)	1 (3,8%)	4 (9,1%)	2 (8%)	3 (11,5%)	12 (9,4%)
Herzrhythmusstörung	35	2 (33,3%)	5 (19,2%)	6 (13,6%)	1 (4%)	3 (11,5%)	17 (13,4%)
Herzschwäche	38	1 (16,7%)	2 (7,7%)	1 (2,3%)	1 (4%)	0 (0%)	5 (3,9%)
Durchblutungsstörungen Beine	0	2 (33,3%)	3 (11,5%)	6 (13,6%)	6 (24%)	4 (15,4%)	21 (16,5%)
Krampfadern	0	1 (16,7%)	10 (38,5%)	21 (47,7%)	7 (28%)	15 (57,7%)	54 (42,5%)
Asthma	0	0 (0%)	8 (30,8%)	11 (25%)	6 (24%)	4 (15,4%)	29 (22,8%)
Chronische Bronchitis	0	6 (100%)	21 (80,8%)	31 (70,5%)	15 (60%)	17 (65,4%)	90 (70,9%)
Gastritis	0	4 (66,7%)	11 (42,3%)	16 (36,4%)	7 (28%)	9 (34,6%)	47 (37%)
Reflux	39	1 (16,7%)	7 (26,9%)	8 (18,2%)	2 (8%)	5 (19,2%)	23 (18,1%)
Magengeschwür	0	2 (33,3%)	7 (26,9%)	4 (9,1%)	2 (8%)	3 (11,5%)	18 (14,2%)
Gallensteine	0	1 (16,7%)	6 (23,1%)	9 (20,5%)	8 (32%)	5 (19,2%)	29 (22,8%)
Hyperthyreose	0	1 (16,7%)	5 (19,2%)	6 (13,6%)	4 (16%)	5 (19,2%)	21 (16,5%)
Hypothyreose	0	1 (16,7%)	4 (15,4%)	12 (27,3%)	4 (16%)	4 (15,4%)	25 (19,7%)
Insulinpflichtiger Diabetes	0	0 (0%)	2 (7,7%)	2 (4,5%)	0 (0%)	2 (7,7%)	6 (4,7%)
Diabetes ohne Insulin	0	0 (0%)	2 (7,7%)	4 (9,1%)	5 (20%)	3 (11,5%)	14 (11,3%)
Erhöhte Blutfette	0	3 (50%)	12 (52,2%)	22 (50%)	11 (44%)	12 (52,2%)	60 (47,2%)
Gicht	0	0 (0%)	5 (19,2%)	9 (20,5%)	5 (20%)	6 (23,1%)	25 (19,7%)
Blutarmut	0	2 (33,3%)	4 (15,4%)	3 (6,8%)	3 (12%)	7 (26,9%)	19 (15%)
Pyelonephritis	0	1 (16,7%)	5 (19,2%)	3 (6,8%)	3 (12%)	5 (19,2%)	17 (13,4%)
Nierensteine/Koliken	0	0 (0%)	2 (7,7%)	7 (15,9%)	1 (4%)	4 (15,4%)	14 (11,3%)
Krebs	0	1 (16,7%)	6 (23,1%)	6 (13,6%)	6 (24%)	5 (19,2%)	24 (18,9%)

Arthrose	0	3 (50%)	13 (50%)	21 (47,7%)	11 (44%)	11 (42,3%)	59 (46,5%)
Entzündliche Gelenkerkrankungen	0	0 (0%)	2 (7,7%)	5 (11,4%)	2 (8%)	2 (33,3%)	11 (8,7%)
Osteoporose	0	2 (33,3%)	6 (23,1%)	11 (25%)	6 (24%)	9 (34,6%)	34 (26,8%)
Migräne	0	1 (16,7%)	6 (23,1%)	9 (20,5%)	2 (8%)	1 (3,8%)	19 (15%)
Psychische Erkrankungen	0	1 (16,7%)	7 (26,9%)	8 (18,2%)	4 (16%)	6 (23,1%)	26 (20,5%)
Polyneuropathien	0	1 (16,7%)	5 (19,2%)	4 (9,1%)	4 (16%)	1 (3,8%)	15 (11,8%)
Alkoholabhängigkeit	0	1 (16,7%)	2 (7,7%)	0 (0%)	5 (20%)	3 (11,5%)	11 (8,7%)
Heuschnupfen	0	1 (16,7%)	7 (26,9%)	11 (25%)	2 (8%)	3 (11,5%)	24 (18,9%)
Tuberkulose	0	0 (0%)	4 (15,4%)	2 (4,5%)	2 (8%)	1 (3,8%)	9 (7,1%)
Alpha-1-Antitrypsinmangel	0	0 (0%)	1 (3,8%)	4 (9,1%)	0 (0%)	3 (11,5%)	8 (6,3%)

*fehlend, da Fragen erst im Laufe der Studie implementiert wurden

Tab. 4.5: Eingenommene Medikamentenklassen

	GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
n	6	26	44	25	26	127
Kurzwirksame Beta-2-Mimetika	0 (0%)	8 (30,8%)	19 (43,2%)	15 (60%)	12 (46,2%)	54 (42,5%)
Langwirksame Beta-2-Mimetika	0 (0%)	6 (23,1%)	14 (31,8%)	11 (44%)	11 (42,3%)	42 (33,1%)
Kurzwirksame Anticholinergika	0 (0%)	2 (7,7%)	1 (2,3%)	1 (4%)	1 (3,8%)	5 (3,9%)
Langwirksame Anticholinergika	1 (16,7%)	13 (50%)	32 (72,7%)	23 (92%)	24 (92,3%)	93 (73,2%)
Theophyllin	0 (0%)	2 (7,7%)	1 (2,3%)	2 (8%)	5 (19,2%)	10 (7,9%)
PDE4-Inhibitor	0 (0%)	1 (3,8%)	1 (2,3%)	4 (16%)	9 (34,6%)	15 (11,8%)
Leukotrien-Rezeptorantagonist	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,8%)
Antiallergika	0 (0%)	0 (0%)	2 (4,5%)	2 (8%)	0 (0%)	4 (3,1%)
Alpha-1-Antitrypsin-Substitution	0 (0%)	1 (3,8%)	2 (4,5%)	0 (0%)	2 (7,7%)	5 (3,9%)
Inhalative Corticosteroide	0 (0%)	6 (23,1%)	10 (22,7%)	3 (12%)	2 (7,7%)	26 (20,5%)
Orale Corticosteroide	1 (16,7%)	1 (3,8%)	3 (6,8%)	3 (12%)	6 (23,1%)	14 (11%)
Anticholinergikum + Betamimetikum	2 (33,3%)	6 (23,1%)	8 (18,2%)	5 (20%)	11 (42,3%)	32 (25,2%)
Bronchodilator + inhalatives Corticosteroid	1 (16,7%)	13 (50%)	25 (56,8%)	15 (60%)	16 (61,5%)	70 (55,1%)
Kardiovaskuläre Medikation	4 (66,7%)	16 (61,5%)	28 (63,6%)	19 (76%)	19 (73,1%)	86 (67,7%)
Antidiabetika	0 (0%)	4 (15,4%)	6 (13,6%)	3 (12%)	5 (19,2%)	18 (14,2%)
Andere Medikamente	5 (83,3%)	23 (88,5%)	34 (77,3%)	19 (76%)	23 (88,5%)	104 (81,9%)

4.2 Polyneuropathie

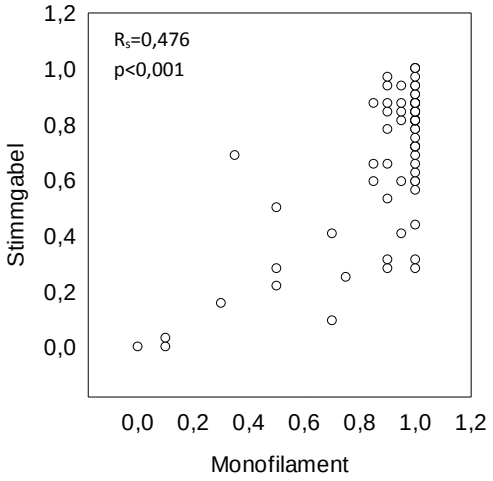
Über das in COSYCONET implementierte Protokoll wurden in dieser Studie nicht nur die semiquantitativen Indices der Stimmgabel und des Monofilaments erhoben, sondern auch die Nervenleitgeschwindigkeit nichtinvasiv am *N.suralis* gemessen. Eine Übersicht über die Ergebnisse gemäß den COPD-Stadien findet sich in Tabelle 4.6. Polyneuropathie-Daten waren von 74 Patienten verfügbar.

Tab. 4.6: Daten der Polyneuropathie bei den Patienten

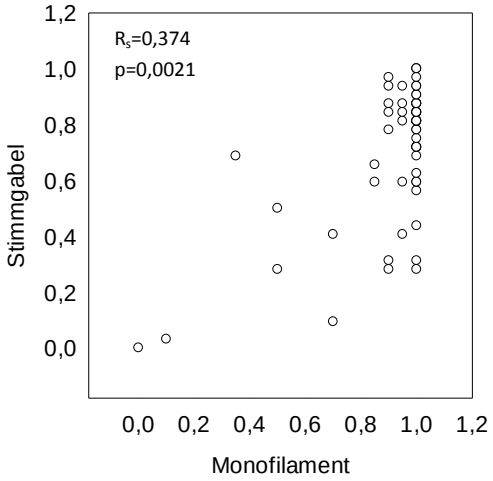
		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	n	1	13	25	13	13	65
Leitgeschwindigkeit [m/s]	Mittelwert	52,00	41,19	41,88	38,92	40,73	41,08
	SD	0,00	12,37	10,53	18,14	11,51	12,64
	Quart1	52,00	40,50	37,00	36,50	30,50	36,50
	Median	52,00	44,50	46,00	45,00	43,50	44,50
	Quart3	52,00	49,00	49,00	49,00	48,00	49,00
	n	4	15	28	13	14	74
Stimmgabel [Score]	Mittelwert	0,59	0,63	0,75	0,60	0,72	0,68
	SD	0,23	0,27	0,22	0,34	0,24	0,26
	Quart1	0,52	0,55	0,71	0,31	0,61	0,59
	Median	0,64	0,66	0,83	0,78	0,81	0,80
	Quart3	0,72	0,84	0,88	0,84	0,87	0,88
Monofilament [Score]	Mittelwert	0,96	0,89	0,89	0,81	0,94	0,89
	SD	0,05	0,24	0,24	0,31	0,13	0,23
	Quart1	0,94	0,88	0,90	0,85	0,95	0,90
	Median	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Quart3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Über alle Patienten gemittelt fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den Ergebnissen des Stimmgabel- und des Monofilament-Tests ($p<0,001$; Abb. 4.1A). Beide Parameter waren auch mit der Nervenleitgeschwindigkeit assoziiert ($p=0,0011$ bzw. $p=0,0015$; Abb. 4.1B und C). Wenn Patienten mit der Komorbidität eines Diabetes ausgeschlossen wurden, blieb die für Stimmgabel- und Monofilament- Test genannte Korrelationen bestehen ($p= 0,0021$), die Assoziation zwischen Nervenleitgeschwindigkeit und Stimmgabel-Test blieb als Trend erhalten ($p=0,0709$), während der signifikante Zusammenhang für die Beziehung von Nervenleitgeschwindigkeit und die Ergebnisse des Monofilament-Tests nicht mehr feststellbar war ($p= 0,147$; Abb. 4.1D-F). Dennoch sprechen die vorhandenen Korrelationen für die interne Konsistenz der erhobenen Messgrößen.

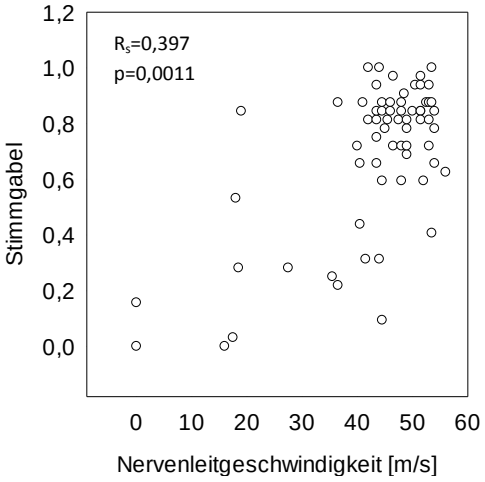
A: Stimmgabel-Monofilament



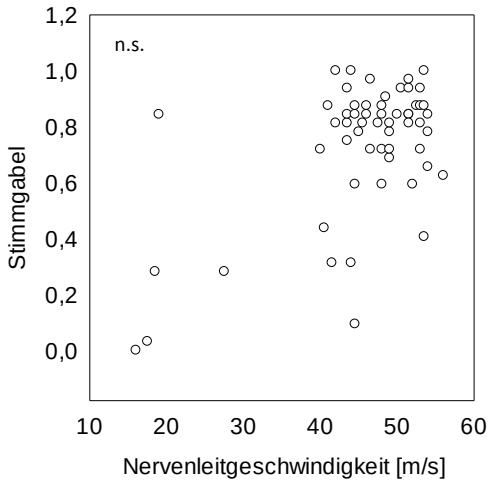
D: Stimmgabel-Monofilament o.Diab.



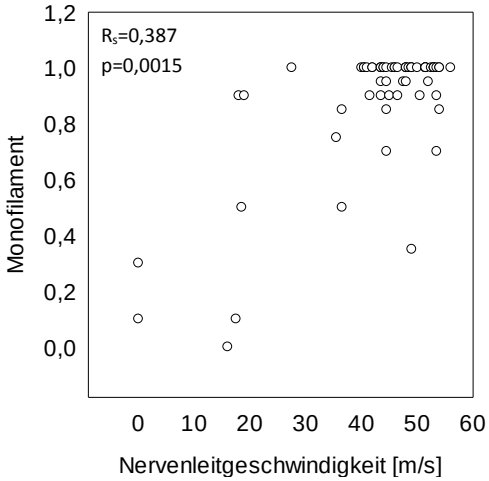
B: Stimmgabel-Nervenleitgeschwindigkeit



E: Stimmgabel-Nervenleitgeschwindigkeit o.Diab.



C: Monofilament-Nervenleitgeschwindigkeit



F: Monofilament-Nervenleitgeschwindigkeit o.Diab.

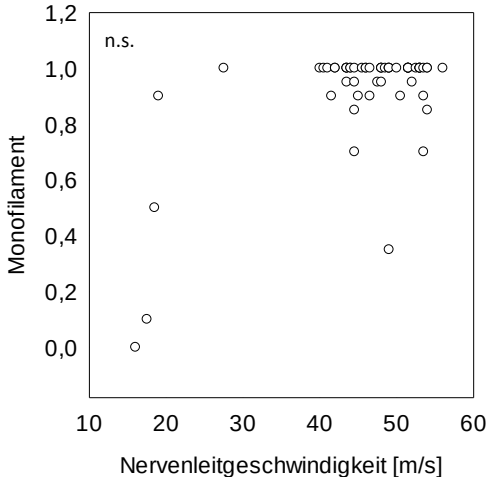


Abb. 4.1: Beziehung der Messungen der Polyneuropathie mit und ohne Diabetiker untereinander; Monofilament-Stimmgabel (A) und (D), Nervenleitgeschwindigkeit-Stimmgabel (B) und (E), Nervenleitgeschwindigkeit –Monofilament (C) und (F)

In keinem der drei untersuchten Parameter ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den COPD-Stadien (Tab. 4.6). Hingegen fanden sich Beziehungen zu den angegeben Komorbiditäten. So unterschieden sich Patienten mit und ohne Diabetes in dem Parameter Nervenleitgeschwindigkeit statistisch signifikant voneinander ($p<0,001$; n=8 bzw. 57; Abb. 4.2A). Gleiches war der Fall für die Mittelwerte aus den Messungen mittels Rydel-Seiffer-Stimmgabel ($p=0,007$; n=8 bzw. 66; Abb. 4.2B), sowie die Mittelwerte der Ergebnisse aus der Monofilament-Untersuchung ($p<0,001$; n=8 bzw. 66; Abb. 4.2C).

Entsprechend fanden sich sowohl für die Nervenleitgeschwindigkeit ($p=0,008$; Abb. 4.2D; n=8 bzw. 57) als auch den Monofilament-Score ($p=0,008$; Abb. 4.2F; n=10 bzw. 64) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, die anamnestisch eine Polyneuropathie hatten oder nicht; für den Stimmgabel-Score ergab sich keine statistische Signifikanz, wohl aber zumindest ein Trend ($p=0,051$; Abb. 4.2E; n=10 bzw. 64).

Basierend auf der anamnestischen Angabe einer Polyneuropathie wurde in dieser Studie eine Prävalenz von Polyneuropathie bei COPD-Patienten von 11,8% (15/127) gefunden. Betrachtete man hingegen das Ergebnis der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit und die vom Hersteller gegebene untere Normgrenze von > 40 m/s, so stieg die Prävalenz neurologischer Auffälligkeiten auf 20% (16/65) an. Eine weitere Steigerung auf 31,1% (23/74) ergab sich, wenn man ausschließlich der Stimmgabeltestung Bedeutung beimaß und Patienten mit einem Testergebnis < 5/8=0,625 als auffällig betrachtete. Der Wert 5/8 wird als kritischer Schwellenwert u.a. in der Nationalen Versorgungs-Leitlinie „Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter“ [106] definiert. Die Ergebnisse des Monofilament-Testes schienen für diese Analyse weniger ratsam, da sie auf einen sehr hohen Prozentsatz von Auffälligkeiten geführt hätten und die kritischen Grenzwerte weniger klar sind.

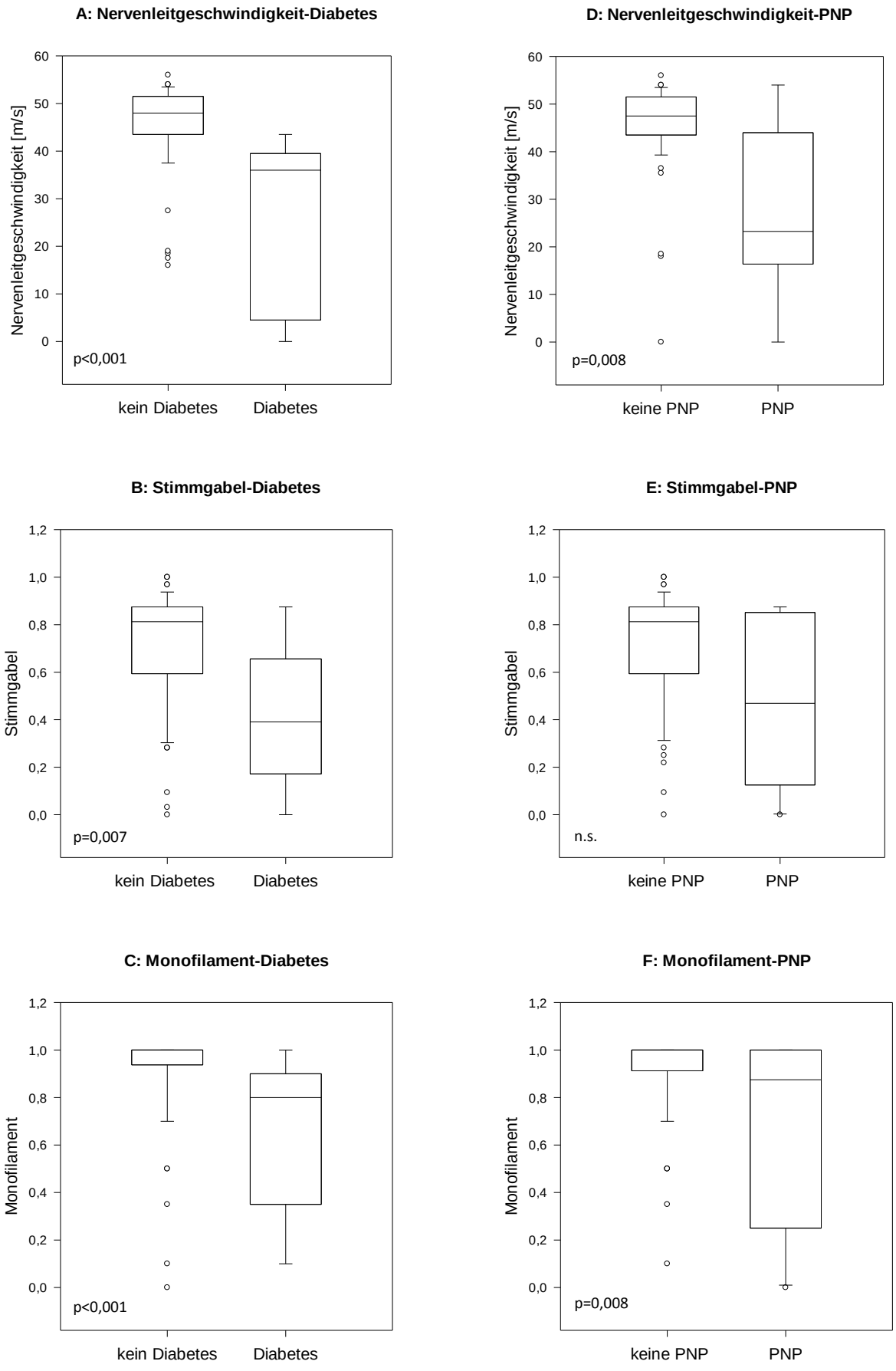


Abb. 4.2: Beziehung der Messparameter der Polyneuropathie zu Diabetes und der anamnestischen Angabe einer Polyneuropathie; Nervenleitgeschwindigkeit-Diabetes (A), Stimmgabel-Diabetes (B), Monofilament-Diabetes (C), Nervenleitgeschwindigkeit-Polyneuropathie (D), Stimmgabel-Polyneuropathie (E) und Monofilament-Polyneuropathie (F)

4.3 Hautalterung als phänomenologischer Marker

In der vorliegenden Studie wurde mit Hilfe von Fotos und eines semiquantitativen Scoresystems festgelegt, wie ausgeprägt die Faltenbildung sowie andere Alterszeichen im Gesicht waren. Hierfür wurden periorbitalen (PO) und die nasolabialen (NL) Falten bewertet, ferner das biologische Alter aus dem Gesamteindruck geschätzt. Die diesbezüglichen Daten, wiederum nach COPD-Stadien aufgeschlüsselt, finden sich in Tabelle 4.7. Auswertbare Fotos lagen bei 124 Patienten vor.

Tab. 4.7: Parameter der Hautalterung anhand von Fotos des Gesichts

		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	n	5	26	42	25	26	124
geschätztes Alter [J]	Mittelwert	65,60	68,15	69,55	69,40	72,15	69,61
	SD	20,28	9,92	9,69	9,40	10,43	10,32
	Quart1	63,00	60,00	63,25	64,00	66,50	63,00
	Median	72,00	68,00	69,00	69,00	75,50	69,00
	Quart3	77,00	75,75	75,75	76,00	79,75	78,00
	n	5	24	40	25	25	119
Schweregrad Falten NL	Mittelwert	3,20	3,25	3,38	3,40	3,56	3,39
	SD	1,30	0,61	0,63	0,58	0,71	0,67
	Quart1	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Median	4,00	3,00	3,00	3,00	4,00	3,00
	Quart3	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
	n	5	25	41	25	25	121
Schweregrad Falten PO	Mittelwert	2,40	2,36	2,54	2,52	2,56	2,50
	SD	0,89	0,95	0,78	0,65	0,87	0,81
	Quart1	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	Median	3,00	2,00	3,00	3,00	2,00	2,00
	Quart3	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00

	n	5	24	40	25	25	119
Faltensumme (NL+PO)	Mittelwert	5,60	5,58	5,93	5,92	6,12	5,88
	SD	2,19	1,41	1,10	0,95	1,36	1,24
	Quart1	5,00	5,00	5,00	5,00	6,00	5,00
	Median	7,00	5,50	6,00	6,00	6,00	6,00
	Quart3	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
	n	5	26	42	25	26	124
Altersdifferenz [J]	Mittelwert	-4,80	1,69	2,52	2,24	7,15	2,97
	SD	6,65	6,66	6,82	6,72	7,64	7,30
	Quart1	-9,00	-3,50	-2,00	-2,00	2,25	-2,00
	Median	-8,00	1,00	2,00	1,00	6,00	2,00
	Quart3	-1,00	3,75	6,00	6,00	9,75	7,00

Die Schweregrade der NL-Falten und der PO-Falten waren über alle Probanden statistisch signifikant miteinander assoziiert ($p<0,001$; Abb. 4.3A). Ferner waren der NL-und PO-Score mit dem geschätzten Alter ($p<0,001$ bzw. $p<0,001$; Abb. 4.3B und C) sowie dem tatsächlichen Alter ($p<0,001$ bzw. $p=0,011$) korreliert. Dies galt ebenfalls für den Summenscore der NL- und PO-Falten ($p<0,001$ bzw. $p<0,001$; Abb. 4.3D). Das geschätzte Alter stand ebenfalls in signifikanter Beziehung zum tatsächlichen, chronologischen Alter der Patienten ($p<0,001$; Abb. 4.3E). Die Differenz zwischen geschätztem und chronologischem Alter, die einen Index der vorzeitigen Alterung darstellt, war ebenso mit der Summe der NL- und PO-Scores korreliert ($p<0,001$; Abb. 4.3F), sowie dem NL-Einzelscore und dem PO-Einzelscore ($p=0,002$ bzw. $p<0,001$). Diese Beziehungen sprechen für die interne Konsistenz der erhobenen phänomenologischen Alterungsmarker.

Die NL- und PO-Faltenscores, ihre Summe, sowie das geschätzte Alter hingen nicht statistisch signifikant mit den COPD-Klassen zusammen. Im Gegensatz dazu zeigte die Differenz zwischen geschätztem und tatsächlichem Alter einen Zusammenhang mit der COPD-Kategorie ($p=0,005$). Insbesondere bestand zwischen GOLD 0+1 einerseits und GOLD 4 andererseits ein signifikanter Unterschied ($p=0,003$). Die zusammenfassenden, dichotome (GOLD 0-2 vs. 3-4) Analyse kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass sich im Vergleich mit der Altersdifferenz ein signifikanter Unterschied ($p=0,023$) ergab. Dies deutete die Korrektheit der externen Auswertung der fotografischen Aufnahmen an, unter der Annahme, dass die

Hautalterung mit höherem Schweregrad zunimmt. Zum Vergleich ist wichtig, dass sich kein signifikanter Unterschied im tatsächlichen, chronologischen Alter der Patienten fand (Kap. 4.1.1). Ferner war bei Patienten der COPD-Klassen 0-2 die Altersdifferenz nicht signifikant von Null verschieden (Δ=1 Jahr; p=0,098), d.h. mittleres und geschätztes Alter waren gleich. Hingegen unterschieden sich die Patienten der Schweregrade 3-4 in diesem Parameter (Δ=4,7 Jahre; p<0,001). Zusätzliche Korrelationsanalysen sind in Kap. 4.6 dargestellt.

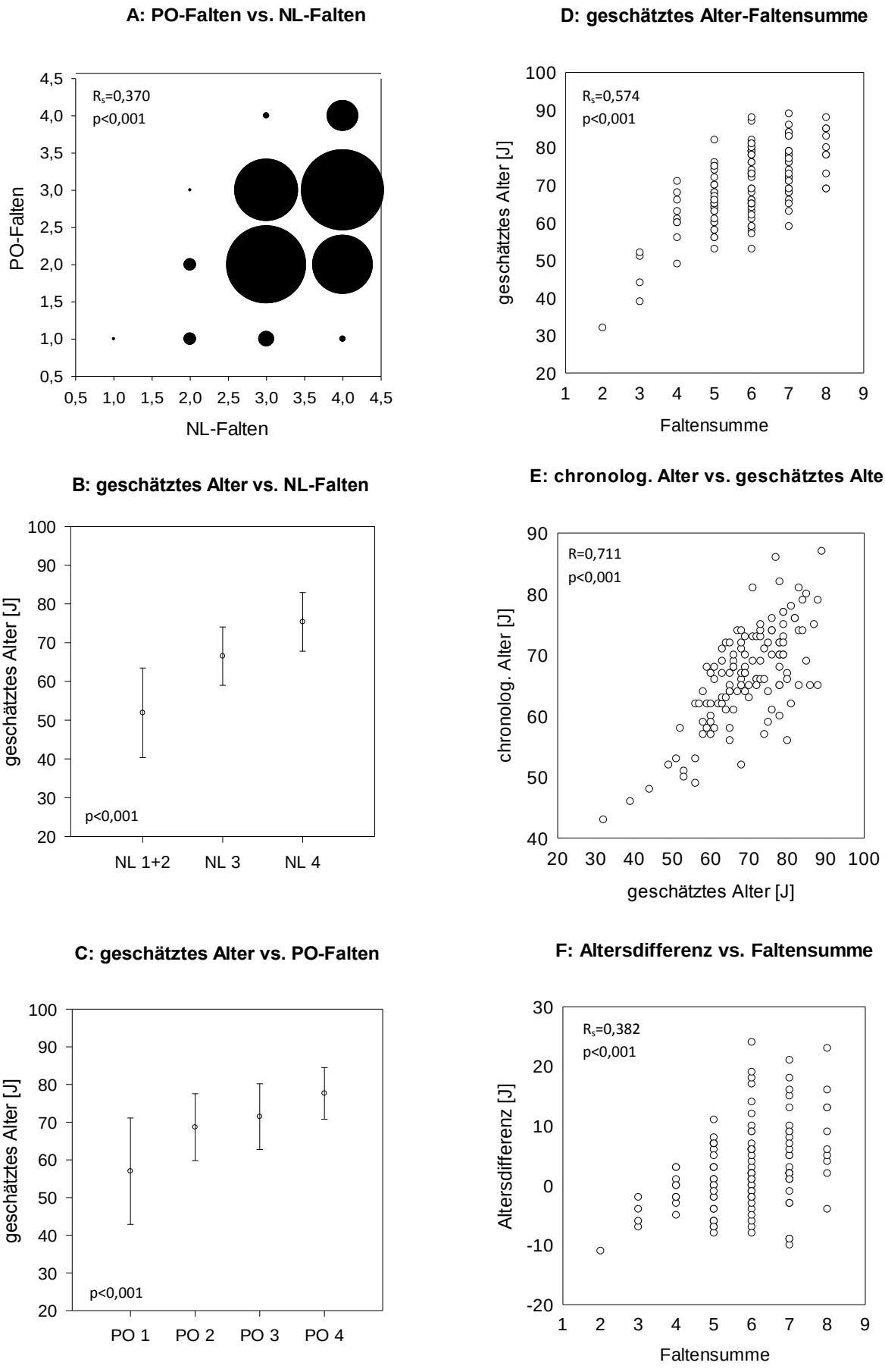


Abb. 4.3: Beziehung der Parameter der Hautalterung zueinander; NL-Falten-PO-Falten (A), NL-Falten-geschätztes Alter (B), PO-Falten-geschätztes Alter (C), Faltensumme-geschätztes Alter (D), chronologisches Alter- geschätztes Alter (E), Altersdifferenz vs. Faltensumme (F)

4.4 Marker des Alterns im Blut

Bei 121 Patienten konnte die Telomerenlänge von Blutleukozyten mittels qPCR bestimmt werden, bei 123 Patienten die Konzentration von Advanced Glycation End Products (AGE) im Serum, sowie bei 120 Patienten die Konzentration des Peptides LL-37 im Plasma. Die statistischen Charakteristika dieser Biomarker sind in Tabelle 4.8 aufgeschlüsselt nach COPD-Stadium dargestellt. Angegeben ist die Absorption der AGE-Werte, die aus technischen Gründen (siehe Methode 3.4.4) nicht in eine definite Konzentration umgerechnet werden konnte, wenngleich sie in einer eindeutigen Beziehung zur Konzentration steht. Hierbei ist zu beachten, dass eine höhere Absorption der AGE-Werte eine niedrigere Konzentration an AGEs bedeutet.

Tab. 4.8: Marker des Alterns im Blut

		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	n	5	26	42	25	23	121
Telomeren T/S-Ratio	Mittelwert	0,76	0,70	0,70	0,69	0,69	0,70
	SD	0,22	0,16	0,13	0,14	0,16	0,15
	Quart1	0,56	0,58	0,60	0,60	0,58	0,59
	Median	0,80	0,70	0,72	0,67	0,73	0,72
	Quart3	0,89	0,81	0,78	0,77	0,78	0,78
	n	6	25	42	24	23	120
LL-37 [ng/ml]	Mittelwert	40,12	38,79	37,74	39,27	36,70	38,19
	SD	5,04	9,27	9,87	10,82	8,80	9,48
	Quart1	39,05	31,31	30,05	30,55	29,22	30,19
	Median	40,19	39,22	36,39	39,57	36,37	38,12
	Quart3	42,03	47,75	46,77	47,50	40,81	45,93
	n	6	26	43	25	23	123
AGE [Absorption, invers zur Konzentration]	Mittelwert	1,19	1,24	1,14	1,06	1,06	1,13
	SD	0,24	0,35	0,24	0,27	0,22	0,27
	Quart1	1,01	0,96	0,96	0,89	0,88	0,93
	Median	1,23	1,26	1,05	1,02	1,03	1,07
	Quart3	1,27	1,51	1,30	1,21	1,16	1,31

Der statistische Vergleich mittels ANOVA ergab, dass weder die Telomerenlänge noch die Konzentration von LL-37 in statistisch signifikanter Weise vom COPD-Stadium abhingen (p=0,927 bzw. p=0,743). Auch die Zusammenfassung einzelner GOLD-Stadien ergab keinen signifikanten Unterschied.

Im Gegensatz dazu bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen COPD-Stadium und AGE-Konzentration (p=0,034); für diese Analysen wurden die GOLD-Stadien 0-2 und 3-4 zusammengefasst. Der Zusammenhang der AGE-Konzentration mit den GOLD-Stadien blieb auch nach Ausschluss der Patienten mit der Anamnese eines Diabetes bestehen (p=0,038). Weiterführende Korrelationsanalysen finden sich in Kap. 4.6.

4.5 Standardlaborparameter

Mit Hilfe klinischer Routinemethoden wurden die in Tab. 4.9 angegebenen Laborparameter bestimmt. Hierbei fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den COPD-Stadien für Lymphozyten (p<0,001), bedingt durch Unterschiede der Gruppen GOLD 4 vs. GOLD 0+1 (p<0,001) sowie GOLD 4 vs. GOLD 2 (p=0,008). Außerdem zeigte sich insgesamt ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die segmentierten Granulozyten (p<0,001), der im Einzelnen auf Unterschiede der Gruppen GOLD 4 gegen GOLD 0+1 (p<0,001), sowie GOLD 4 gegen GOLD 2 (p=0,014) zurückzuführen war. Ferner zeigte sich nach dem Zusammenfassen der GOLD-Klassen zu zwei Gruppen (GOLD 0-2 vs. GOLD 3-4) im CRP-Wert ein Trend in Richtung einer Abhängigkeit vom Krankheitsstadium (p=0,054). Kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den GOLD-Klassen ergab sich für die Leukozytenzahl sowie für die Werte von Hämoglobin und Hämatokrit.

Tab. 4.9: Standardlaborparameter der Patienten

		GOLD-0	GOLD-1	GOLD-2	GOLD-3	GOLD-4	Gesamt
	n	6	26	44	25	26	127
Kreatinin Blut [mg/dl]	Mittelwert	0,97	0,91	0,83	0,94	0,75	0,86
	SD	0,23	0,31	0,23	0,39	0,16	0,28
	Quart1	0,80	0,70	0,70	0,80	0,60	0,70
	Median	0,95	0,80	0,80	0,90	0,70	0,80
	Quart3	1,10	1,00	0,93	1,10	0,88	1,00
Gesamtcholesterin [mg/dl]	Mittelwert	228,00	213,96	215,57	203,36	221,58	214,65
	SD	39,27	43,27	37,50	38,59	39,26	39,32
	Quart1	205,00	187,50	193,00	174,00	198,25	189,00
	Median	215,00	203,00	207,50	203,00	221,00	209,00
	Quart3	249,75	245,25	239,50	215,00	242,00	243,00
Triglyzeride [mg/dl]	Mittelwert	173,67	150,73	166,89	151,24	130,38	153,35
	SD	74,68	76,21	104,73	101,98	90,03	94,35
	Quart1	117,75	96,50	89,75	93,00	68,00	86,00
	Median	158,00	119,50	142,00	138,00	94,00	130,00
	Quart3	237,25	197,75	219,50	188,00	167,25	191,50
LDL [mg/dl]	Mittelwert	126,67	125,46	126,12	114,92	115,77	121,70
	SD	26,62	43,41	25,84	41,25	33,09	34,62
	Quart1	109,75	96,25	106,50	92,75	97,25	100,00
	Median	123,50	117,50	121,00	118,50	114,50	120,00
	Quart3	137,25	150,50	144,00	141,50	136,75	144,00
HDL [mg/dl]	Mittelwert	73,67	64,54	65,02	65,08	85,15	69,46
	SD	21,64	20,92	21,15	27,10	33,95	26,34
	Quart1	55,25	49,00	47,75	44,00	59,75	50,00
	Median	72,50	59,50	70,50	56,00	81,50	68,00
	Quart3	89,00	70,50	77,00	77,00	105,25	81,50
Harnsäure [mg/dl]	Mittelwert	6,27	6,01	5,82	6,28	6,15	6,04
	SD	1,53	1,73	1,44	1,66	1,95	1,64
	Quart1	5,53	4,85	4,80	5,10	4,93	4,85
	Median	5,85	5,80	5,60	5,90	5,90	5,80
	Quart3	7,23	6,53	6,60	7,00	7,10	6,90

Harnstoff-N [mg/dl]	Mittelwert	18,83	16,19	15,93	15,28	15,50	15,91
	SD	7,25	6,29	4,71	7,39	3,58	5,57
	Quart1	13,25	13,00	12,00	12,00	13,00	12,00
	Median	15,50	15,00	15,00	13,00	15,00	15,00
	Quart3	25,25	17,75	20,00	17,00	16,75	18,00
CRP [mg/dl]	Mittelwert	0,21	0,31	0,44	0,48	0,36	0,40
	SD	0,13	0,33	0,85	0,68	0,29	0,61
	Quart1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,12	0,10
	Median	0,17	0,10	0,16	0,30	0,27	0,20
	Quart3	0,34	0,44	0,38	0,46	0,44	0,44
Glucose [mg/dl]	Mittelwert	94,83	101,65	103,48	102,16	103,46	102,43
	SD	5,38	24,49	25,16	17,01	15,94	21,10
	Quart1	90,00	88,00	89,50	93,00	93,25	90,00
	Median	95,00	93,00	97,50	97,00	100,50	97,00
	Quart3	98,50	105,25	109,00	105,00	112,75	108,00
HbA1c [%]	Mittelwert	5,85	5,76	6,04	5,95	5,87	5,92
	SD	0,25	0,54	0,68	0,47	0,50	0,57
	Quart1	5,70	5,40	5,60	5,70	5,50	5,50
	Median	5,85	5,55	5,90	5,80	5,80	5,80
	Quart3	6,08	6,00	6,30	6,20	6,08	6,15
Alpha-1-Antitrypsin [mg/dl]	Mittelwert	120,83	116,94	119,26	122,88	129,58	121,69
	SD	13,03	19,96	45,10	24,80	30,42	33,17
	Quart1	111,50	102,00	105,75	107,00	115,00	106,00
	Median	123,00	111,50	119,50	119,00	129,00	120,00
	Quart3	130,00	133,75	134,25	141,00	147,00	136,00
Kreatinin Urin [mg/dl]	Mittelwert	122,90	79,37	100,49	93,29	77,43	90,82
	SD	68,89	75,09	66,99	65,14	45,21	64,70
	Quart1	73,30	31,40	44,53	46,60	37,20	39,30
	Median	153,00	60,95	97,90	77,25	74,85	72,40
	Quart3	172,00	90,20	153,50	135,25	109,75	128,00
Erythrozyten [10^12/l]	Mittelwert	4,31	4,62	4,66	4,66	4,72	4,65
	SD	0,42	0,42	0,45	0,37	0,49	0,44
	Quart1	4,23	4,42	4,41	4,39	4,50	4,40
	Median	4,32	4,57	4,67	4,71	4,67	4,66
	Quart3	4,50	4,84	4,90	4,88	5,00	4,87

Hämoglobin [g/dl]	Mittelwert	13,53	14,44	14,59	14,79	14,42	14,51
	SD	1,38	1,29	1,36	1,13	1,41	1,32
	Quart1	13,30	13,55	13,88	13,90	13,50	13,60
	Median	13,90	14,20	14,70	14,70	14,25	14,40
	Quart3	14,28	15,30	15,43	15,60	15,55	15,50
Hämatokrit [l/l]	Mittelwert	0,39	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43
	SD	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04
	Quart1	0,38	0,40	0,40	0,41	0,40	0,40
	Median	0,41	0,42	0,44	0,44	0,43	0,43
	Quart3	0,43	0,44	0,45	0,46	0,46	0,45
Thrombozyten [10^9/l]	Mittelwert	220,33	235,77	240,45	255,60	243,58	242,17
	SD	26,35	55,58	71,33	96,26	56,73	69,63
	Quart1	200,25	196,00	203,00	199,00	203,00	200,50
	Median	214,00	229,50	234,50	243,00	223,50	231,00
	Quart3	237,50	256,75	279,00	269,00	272,00	272,00
Leukozyten [10^9/l]	Mittelwert	7,27	8,42	8,83	8,30	9,02	8,60
	SD	1,23	2,36	3,57	2,26	2,22	2,76
	Quart1	6,60	6,45	7,08	6,60	7,20	6,90
	Median	7,15	8,45	8,45	8,00	9,20	8,40
	Quart3	7,93	10,10	9,80	9,80	10,48	9,90
Lymphozyten [%]	Mittelwert	28,67	27,42	25,20	23,80	18,58	24,19
	SD	7,81	10,12	7,98	7,87	9,01	9,08
	Quart1	24,50	22,25	20,75	19,00	13,00	19,00
	Median	31,00	29,50	25,50	25,00	18,50	24,00
	Quart3	34,50	31,75	31,00	32,00	23,00	31,00
Monozyten [%]	Mittelwert	7,83	8,54	8,07	8,32	7,31	8,05
	SD	2,93	3,14	2,28	2,51	2,26	2,54
	Quart1	6,00	7,00	6,00	7,00	7,00	7,00
	Median	6,50	8,50	8,00	8,00	7,50	8,00
	Quart3	10,00	10,75	9,00	9,00	8,75	9,00
Segmentierte [%]	Mittelwert	60,17	60,65	64,57	65,64	72,23	65,34
	SD	10,55	11,58	9,39	8,70	11,46	10,84
	Quart1	55,00	56,00	57,75	60,00	66,00	57,00
	Median	55,50	58,50	64,00	64,00	71,00	64,00
	Quart3	65,75	66,25	70,00	72,00	78,75	72,00

	n	6	26	42	25	26	125
Eosinophile [%]	Mittelwert	2,83	3,12	1,98	2,04	1,58	2,18
	SD	2,23	3,01	1,55	1,40	1,21	1,95
	Quart1	1,25	1,25	1,00	1,00	1,00	1,00
	Median	2,50	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00
	Quart3	3,00	3,75	3,00	3,00	2,00	3,00
	n	5	25	40	25	26	121
Basophile [%]	Mittelwert	0,40	0,60	0,38	0,40	0,35	0,42
	SD	0,55	0,50	0,54	0,58	0,49	0,53
	Quart1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Median	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Quart3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Zur Prüfung der internen Konsistenz wurden die Laborparameter zu einigen der anamnestischen Angaben über Komorbiditäten in Beziehung gesetzt. Hierbei zeigte der HbA1c einen Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Diabetes ($p<0,001$; Abb. 4.4A). Ferner korrelierte der BMI mit den Werten der Triglyzeride ($p<0,001$; Abb. 4.4B) sowie von HDL ($p<0,001$). Gleiches war der Fall für den Bauchumfang vs. Triglyzeride ($p<0,001$) und HDL ($p<0,001$; Abb. 4.4C). Analoge Signifikanzen zeigten sich für die Waist-to-Hip Ratio vs. Triglyzeride ($p=0,0281$; Abb. 4.4.D) sowie HDL ($p<0,001$). Die anamnestische Angabe einer Blutarmut korrelierte mit den Werten von Hämoglobin ($p=0,004$; Abb. 4.4E) sowie Hämatokrit ($p=0,005$). Hingegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede des Prozentsatzes der eosinophilen Granulozyten bei der Angabe eines Asthma bronchiale ($p=0,681$; Abb. 4.4F) sowie eines Heuschnupfens.

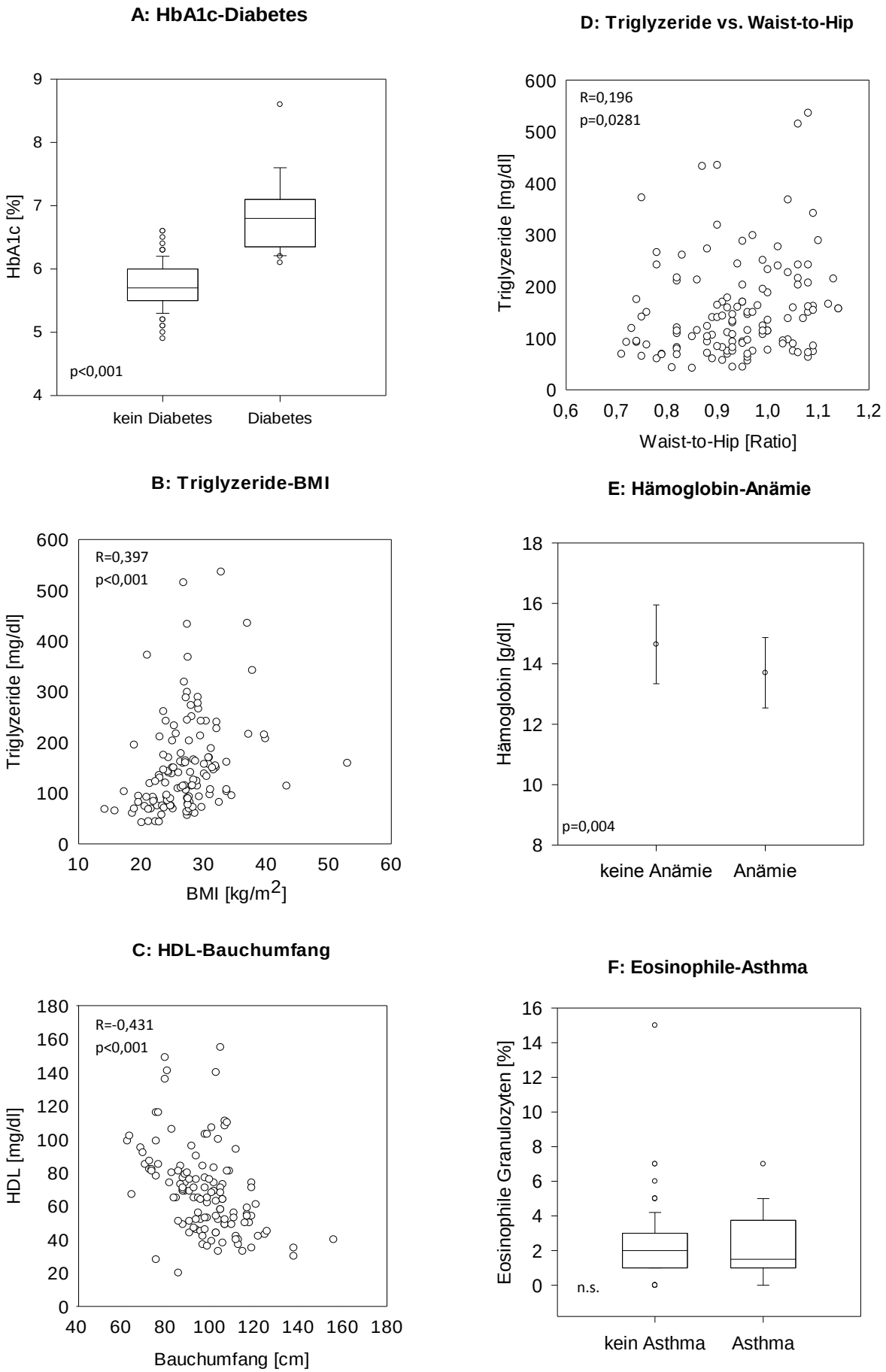


Abb. 4.4: Beziehung einiger Laborparameter zu anamnestischen Komorbiditäten bzw. anthropometrischen Daten; HbA1c-Diabetes (A), Triglyzeride-BMI (B), HDL-Bauchumfang (C), Triglyzeride-Waist-to-Hip Ratio (D), Hämoglobin-Anämie (E) und Eosinophile Granulozyten-Asthma (F)

4.6 Korrelationen mit Alterungsmarkern und Emphysemscore

In einem Teil der folgenden Analysen wurde der Emphysemscore verwendet, der sich anhand einer semiquantitativen Analyse von CT-Aufnahmen des Thorax ergeben hatte, die die Patienten aus klinischen Gründen vor Eintritt in die Studie erhalten hatten. Diese Aufnahmen waren im Rahmen von COSYCONET (Teilprojekt 5) von der Gruppe von Professor Kauczor (Heidelberg) ausgewertet und zur Verfügung gestellt worden. Zugleich war im Rahmen der Auswertung der Gesamtkohorte eine vorläufige Prädiktionsfunktion ausgewertet worden, die auf der Basis verschiedener Funktionsparameter beruhte und anhand der in der Gesamtkohorte vorhandenen CTs optimiert worden war. Diese Vorhersagefunktion wurde in Zusammenarbeit mit der LMU von der MHH Hannover entwickelt und die entsprechenden Werte wurden zur Verfügung gestellt [107]. Die Sensitivität für Emphysem betrug in der COSYCONET-Gesamtkohorte (n=342 auswertbar) 79,1% und die Spezifität 72,3%. Bei den 39 Patienten der hier untersuchten Kohorte, bei denen CT-Aufnahmen vorlagen, wurde ebenfalls zur Überprüfung der vorhergesagte Score mit dem visuell ermittelten verglichen. Hierbei ergaben sich eine Sensitivität von 82,4% zur Vorhersage eines Emphysems und eine Spezifität von 72,7% (Abb. 4.5). Aus diesem Grunde wird im Folgenden die Vorhersagefunktion als hinreichend valide eingestuft, um in die Auswertung Eingang zu finden.

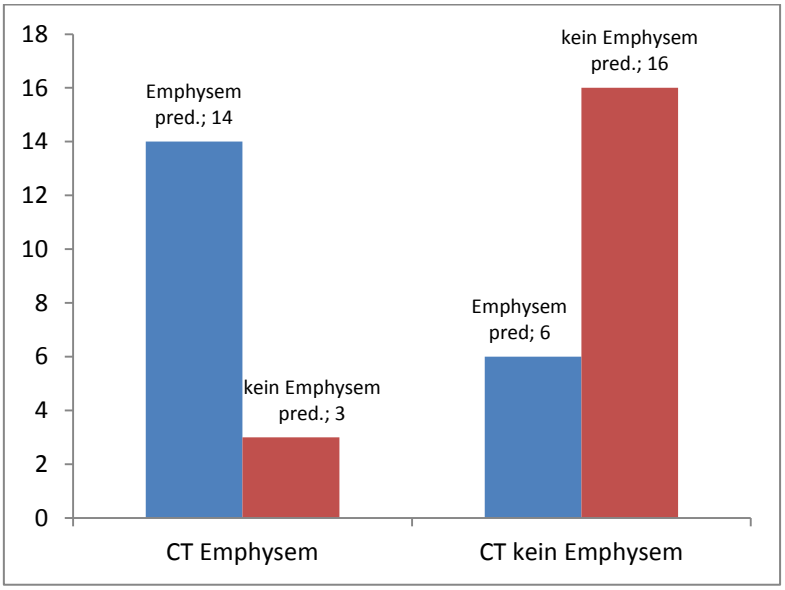


Abb. 4.5: Darstellung der Sensitivität und Spezifität der Vorhersagefunktion in der Münchner Kohorte

Der vorhergesagte Emphysemscore war, wie zu erwarten, mit den COPD-Stadien korreliert. Dies zeigte sich beispielsweise, wenn die COPD-Stadien 0-2 und 3-4 zusammengefasst und gegen den vorhergesagten Emphysemscore in einer Vierfelder-Tafel aufgetragen wurden ($p<0,001$). Von 74 Patienten mit negativem Emphysemscore waren 57 in den niedrigeren und 15 in den höheren GOLD-Klassen. Hingegen waren von den 48 Patienten mit positivem vorhergesagtem Emphysemscore 15 in den niedrigen und 33 in den höheren GOLD-Stadien. Ein im Prinzip ähnlicher, aber statistisch nicht mehr signifikanter Zusammenhang zeigte sich für die Patienten mit einem vorliegenden Thorax-CT. Hier waren für die Patienten ohne CT-morphologisches Emphysem 15 bzw. 7, und für die mit Emphysem 8 bzw. 9 Patienten in den niedrigen bzw. hohen GOLD-Klassen.

4.6.1 Telomeren

Die Telomerenlänge war mit dem Alter der Patienten statistisch signifikant ($R=-0,319$, $p<0,001$) assoziiert (Abb. 4.6A), ebenso mit dem auf Grund der Hautbeschaffenheit geschätzten Alter ($R=-0,359$, $p<0,001$; Abb. 4.6B), sowie tendenziell mit der Differenz zwischen geschätztem und chronologischen Alter (im Folgenden als Altersdifferenz bezeichnet) ($R=-0,163$; $p=0,0795$). Hingegen waren die Telomeren nicht signifikant korreliert mit den Werten der AGE-Absorption sowie denen des LL-37 (Abb. 4.6C und 4.6D). Jedoch bestand ein signifikanter Zusammenhang mit den Gesichtsfalten-Scores. Die Ergebnisse für die NL-Falten sind in Abb. 4.6E ($p=0,009$), diejenigen für die PO-Falten in Abb. 4.6F ($p=0,036$) dargestellt. Ferner korrelierte auch die Summe aus den beiden Falten-Einzelscores mit der Telomerenlänge ($p<0,001$). Die Telomerenlänge war bei Frauen geringfügig, jedoch nicht signifikant ($p=0,226$) größer als bei Männern (T/S 0,715 vs. 0,683).

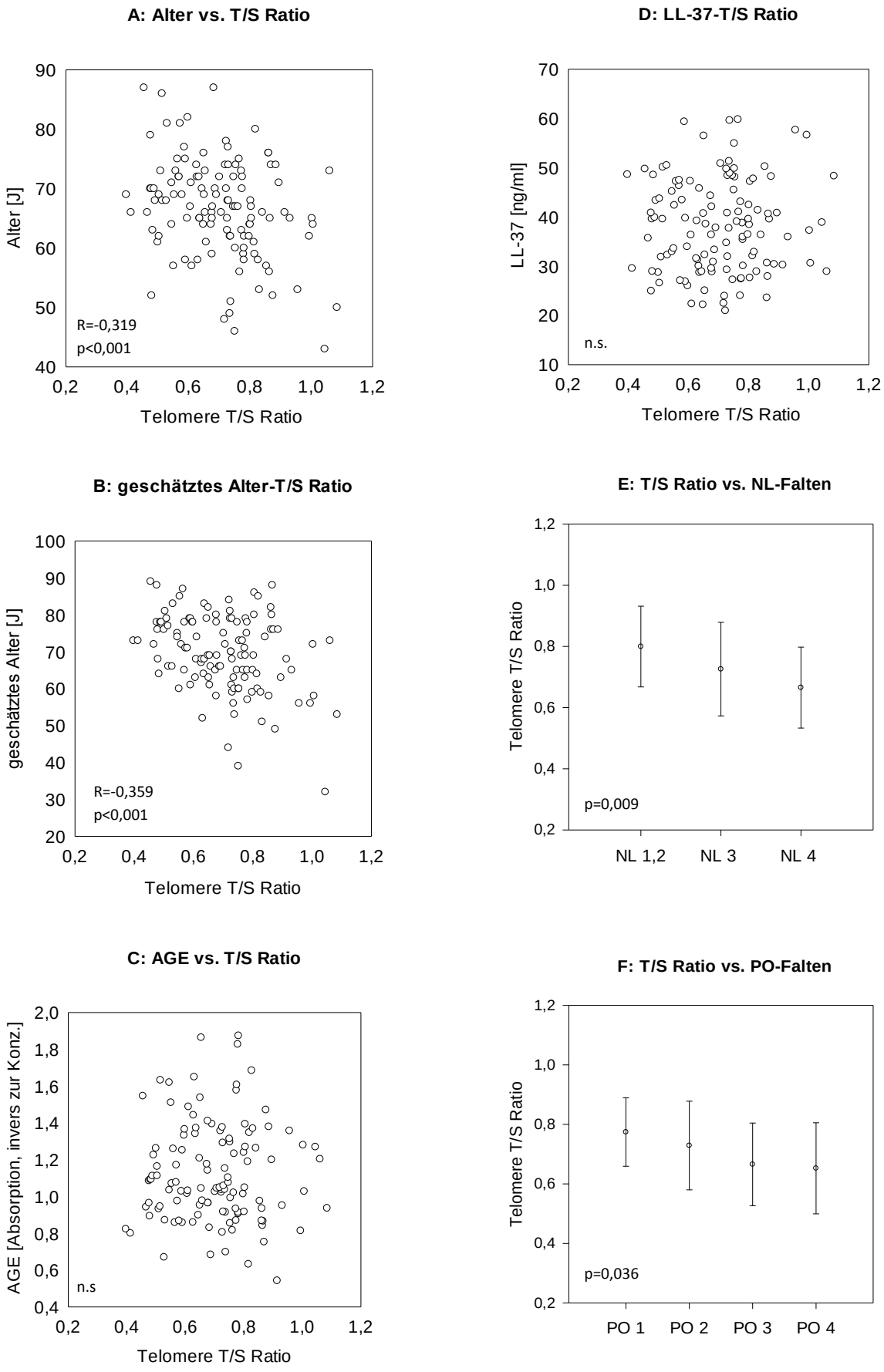


Abb. 4.6: Beziehung der Telomerenlänge zu Alter (A), geschätztem Alter (B), AGE (C), LL-37 (D), PO-Faltenscore (E) und NL-Faltenscore (F)

Die Telomerenlänge zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den erhobenen Komorbiditäten (siehe Tab. 4.4), soweit diese Vergleiche bei den jeweiligen Fallzahlen sinnvoll durchzuführen waren. Die Ausnahmen waren das Vorliegen von Krampfadern, das mit einer signifikant (p=0,020) geringeren Telomerenlänge einher ging (T/S 0,664 vs. 0,726; Abb. 4.7A), sowie die anamnestische Angabe einer Gicht bzw. Harnsäureerhöhung (p=0,010), welche ebenfalls mit geringfügig kürzerer Telomerenlänge (T/S 0,629 vs. 0,716; Abb. 4.7B) assoziiert war. Im Gegensatz dazu korrelierte das chronologische Alter nicht signifikant mit dem Vorliegen von Krampfadern (p=0,269) oder Gicht (p=0,176); daher können die genannten Assoziationen mit den Telomeren nicht direkt auf das Alter zurückgeführt werden. Obwohl die Telomerenlänge nicht mit der anamnestischen Angabe einer Anämie korrelierte, wohl aber ein Zusammenhang zwischen dieser Angabe und dem Hämoglobingehalt bestand (Abb. 4.4E), fand sich ein schwacher jedoch signifikanter Zusammenhang zwischen der T/S Ratio und dem Hb (p=0,0154).

Der zusammengefasste Komplex kardiovaskulärer Erkrankungen (Herzinfarkt, Durchblutungsstörungen am Herzen, Herzrhythmusstörungen, Herzschwäche oder Durchblutungsstörungen an den Beinen) ging nicht mit einer signifikant verkürzten Telomerenlänge einher (T/S 0,697 vs. 0,701; p=0,887; Abb. 4.7C). Soweit für die 39 Patienten, bei denen ein Thorax-CT aus klinisch verfügbaren Aufnahmen vorlag, das Vorliegen eines Lungenemphysems ermittelt werden konnte, zeigte sich ebenfalls keine signifikante Beziehung zur Telomerenlänge (p=0,981; Abb. 4.7D). Das gleiche war der Fall für die Gesamtgruppe der Patienten, bei denen anhand der funktionellen Werte mittels einer Vorhersagefunktion (siehe Kap. 3.6) auf das Vorliegen eines Emphysems geschlossen worden war (p=0,823; Abb. 4.7E). Im Gegensatz dazu ergab sich trotz der geringen Fallzahl ein statistisch signifikanter Unterschied von T/S zwischen Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel; interessanterweise wiesen Patienten mit Antitrypsinmangel längere Telomeren auf (n=8 vs. 113; T/S 0,801 vs. 0,692; p=0,041; Abb. 4.7F). Auch diese Beziehung ist nicht primär auf einen Altersunterschied zwischen der Gruppe mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel zurückzuführen (63 vs. 67 Jahre; p=0,175).

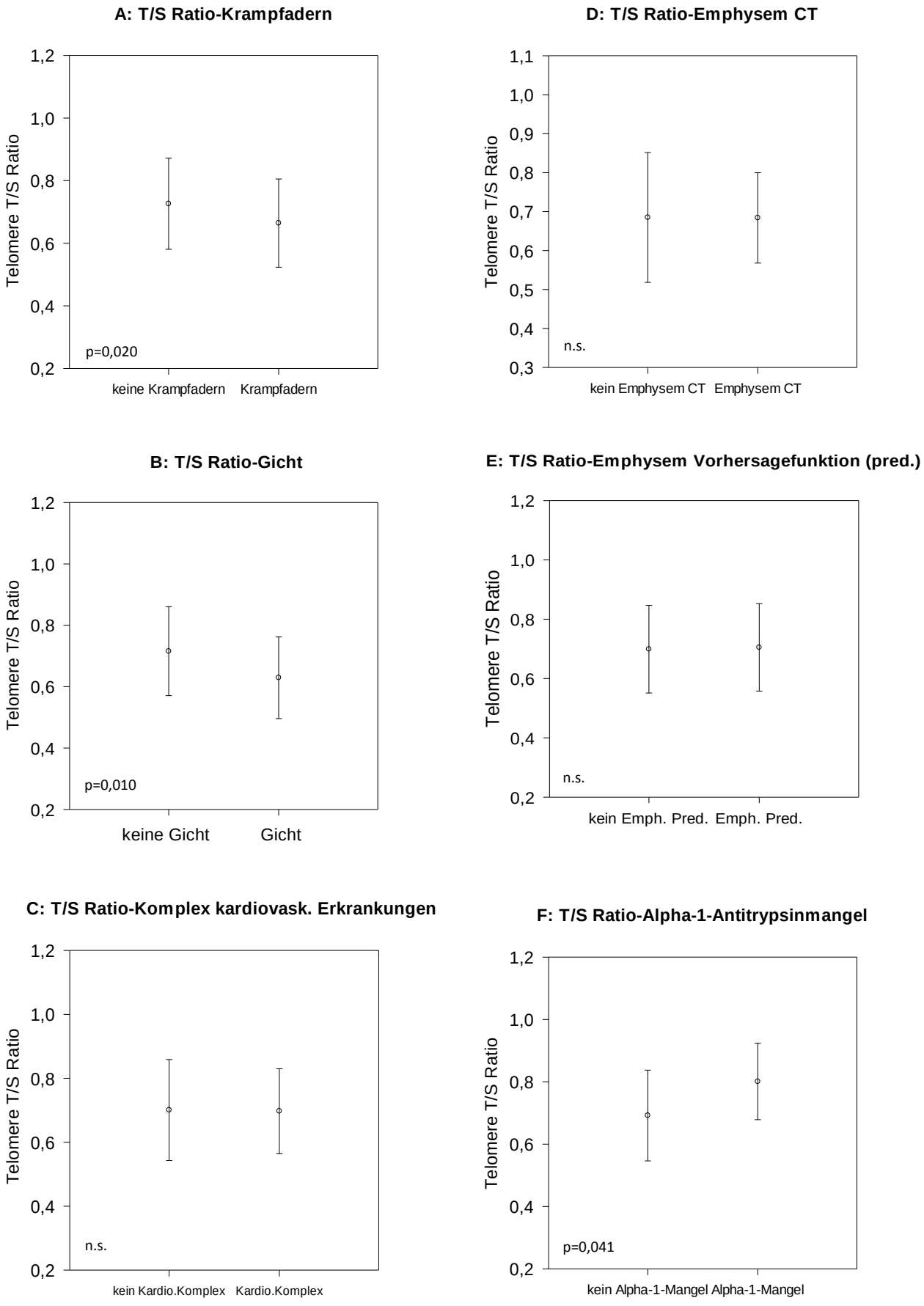


Abb. 4.7: Beziehung der Telomerenlänge zu Krampfadern (A), Gicht (B), Komplex kardiovaskulärer Erkrankungen (C), Emphysem CT (D), Emphysem Vorhersagefunktion (E) und Alpha-1-Antitrypsinmangel (F)

Zwischen den Parametern der Polyneuropathie (Leitgeschwindigkeit, Stimmgabel, Monofilament) und den Telomeren bestanden keine signifikanten Zusammenhänge (Abb. 4.8A). Gleiches war der Fall für die einzelnen Messgrößen der Lungenfunktion, insbesondere FEV_1, FVC, TLC, RV, ITGV und TLCO sowie TLCO/VA, gleich ob diese Werte als Absolutwerte oder als %Soll ausgedrückt wurden (Beispiele in Abb. 4.8B und C). Auch zu den Werten des 6MWD, des T&go, und dem Ergebnis des DemTect-Tests zeigte die Telomerenlänge keine statistisch signifikanten Beziehungen (Abb. 4.8D und E). Gleiches war der Fall für den CAT-Fragebogen sowie den mMRC-Score. Anders sah dies aus für den ABI als Index der vaskulären Funktion. Es bestand nämlich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Telomerenlänge und dem Mittelwert der beiden ABI-Messungen ($p=0,0166$; Abb. 4.8F).

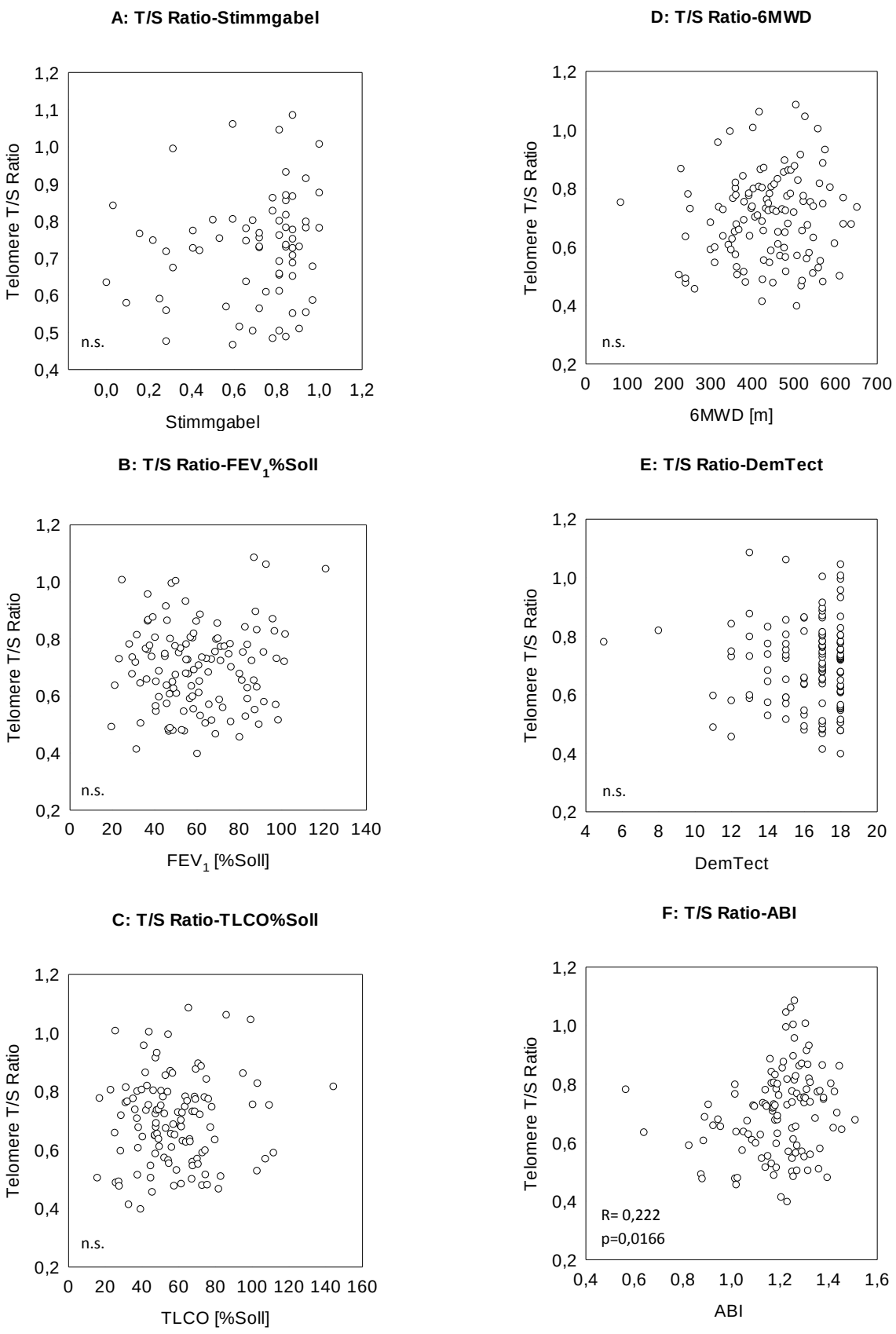


Abb. 4.8: Beziehung der Telomerenlänge zur Messung der Stimmgabel (A), FEV_1%Soll (B), TLCO%Soll (C), 6MWD (D), DemTect (E) und ABI (F)

4.6.2 Advanced Glycation End Products (AGE)

Alter und Komorbiditäten

Die Absorption bzw. Konzentration der AGEs war nicht statistisch signifikant mit dem Alter oder dem geschätzten Alter der Patienten korreliert (P=0,226 bzw. p=0,338; Abb. 4.9A und B). Während die beiden Einzelscores der Hautfalten (PO, NL) keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den AGE-Werten aufwiesen, zeigten sich für ihren Summenscore zumindest der Tendenz nach Unterschiede, wenn man einen Score von 2-4 einem Score von >4 gegenüber stellte; dies war der Fall sowohl für die Gesamtgruppe (p=0,0613; Abb. 4.9C), als auch für die Teilgruppe der Patienten ohne Diabetes (p= 0,0543; Abb. 4.9D). Diese Differenzierung war nötig, weil Patienten mit Diabetes, wie aufgrund der Literaturdaten zu erwarten, eine niedrigere Absorption, d.h. höhere AGE-Konzentration zeigten als Patienten ohne Diabetes (p=0,031; Abb. 4.9E). Zwar wiesen prozentual mehr Männer als Frauen unter den Patienten einen Diabetes auf (16/63 vs. 4/64; p=0,007) doch bestand ein Unterschied der AGE-Absorption zwischen Männern und Frauen (p=0,003) auch dann, wenn nur Patienten ohne Diabetes ausgewertet wurden (p=0,004; Abb. 4.9F); dieser Geschlechtsunterschied war demnach nicht auf einen Diabetes zurückzuführen. Zur Korrelation der AGE-Absorption mit der Telomerenlänge siehe Kap. 5.6.1 sowie Abb. 5.1C.

Da Diabetes bekanntlich mit einer Erhöhung der Werte von HbA1c verbunden ist und HbA1c aufgrund der biochemischen Entstehung in Beziehung zu den AGEs stehen sollte, wurde eine Korrelation zwischen HbA1c und AGE-Absorption erstellt. Hierbei ergab sich eine statistisch signifikante (p=0,0098), jedoch schwache (R=-0,234) Korrelation zwischen beiden Werten; diese war negativ, weil eine hohe Absorption einer niedrigen Konzentration der AGEs entsprach. Analog verhielt es sich mit dem gemessenen Blutglucosespiegel (p=0,0326; R=-0,194)

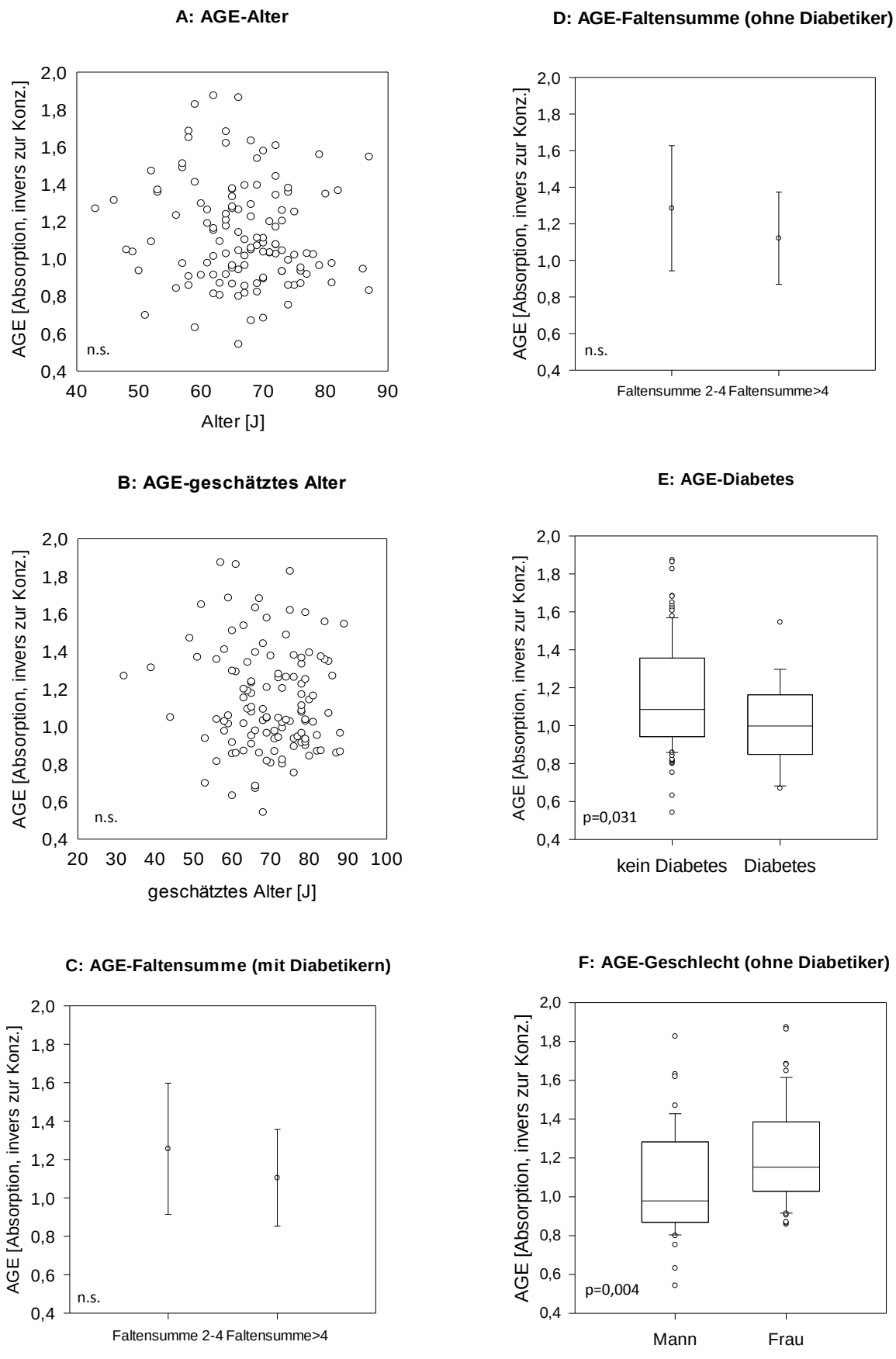


Abb. 4.9: Beziehung der AGEs mit Alter (A), geschätztes Alter (B), Faltensumme mit und ohne Diabetiker (C) und (D) und Geschlecht (F)

Neben dem Diabetes war die AGE-Konzentration mit dem Vorhandensein von Krampfadern assoziiert. Dies war sowohl für alle Patienten der Fall (p=0,010; Abb. 4.10A) als auch dann, wenn die Diabetiker ausgeschlossen wurden (p=0,010; Abb. 4.10B). Ebenso korrelierten die Werte der AGEs mit der anamnestischen Angabe erhöhter Blutfettwerte, die jedoch mit einer niedrigeren AGE-Konzentration einherging (n=65 bzw. 56; 1,185 vs. 1,026; p=0,019). Fasste man Gastritis, Reflux und Magengeschwür zusammen, so fand sich ein signifikanter Unterschied in dem Sinne, dass die Patienten mit dieser Komorbidität geringere AGE-Konzentrationen bzw. höhere Absorptionen aufwiesen (n=58 bzw. 63; 1,176 vs. 0,976; p=0,002). Eine weitere relevante Komorbidität war die Hyperthyreose, die ebenso mit einer höheren AGE-Absorption und daher niedrigerer Konzentration einherging (n=21 bzw. 100; 1,269 vs. 1,035; p=0,002). Es ergaben sich keine weiteren signifikanten Korrelationen zwischen der AGE-Absorption und anderen Komorbiditäten, soweit diese Testung im Vorfeld als sinnvoll erschienen war. Insbesondere gab es keine Beziehung mit kardiovaskulären Erkrankungen.

Lungenfunktionsgrößen

Zwischen den Lungenfunktionsgrößen FVC, TLCO sowie TLCO/VA und den AGEs bestanden keine signifikanten Korrelationen, sowohl für die Absolutwerte als auch für %Soll. Im Gegensatz dazu zeigte das Einsekundenvolumen (FEV_1) als %Soll dargestellt eine signifikante Beziehung zu den Absorptionswerten der AGEs (p=0,0143; Abb. 4.10C). Die Totale Lungenkapazität (TLC), sofern sie als Absolutwert ausgedrückt wurde, war ebenfalls statistisch signifikant mit den AGE-Werten korreliert (p=0,0085; Abb. 4.10D). Ferner zeigten die Messgrößen RV und ITGV als Absolutwerte jeweils signifikante Beziehungen zu den AGEs (R=-0,276; p=0,0022 bzw. R=-0,285; p=0,0015) in dem Sinne, dass hohe Lungenfunktionswerte mit hohen AGE-Konzentrationen bzw. niedrigen Absorptionen assoziiert waren. Diese Korrelation ergab sich zumindest tendenziell auch für die Werte als %Soll (p=0,0621 bzw. p=0,0598). Die Korrelation mit den Absolutwerten von RV und ITGV blieb bestehen, wenn die Patienten mit Diabetes ausgeschlossen wurden (p<0,001 bzw. p<0,001). Ferner bestand eine signifikante Korrelation zwischen AGEs und der Differenz TLC-VA (p=0,0407; R_s=-0,190)

Zusätzliche Messgrößen

Zu den Messgrößen des 6MWD, des T&go, DemTect, ABI (Abb. 4.10E) und mMRC fanden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen. Hingegen war der Score des CAT-Fragebogens mit der Konzentration der AGE assoziiert, allerdings nicht wie zunächst erwartet; vielmehr ergaben sich niedrigere AGE-Konzentrationen bzw. höhere Absorptionen für Patienten mit stärker ausgeprägter COPD-Symptomatik (hohe CAT-Werte) ($p=0,0203$; Abb. 4.10F). Diese Korrelation blieb auch nach Ausschluss der Patienten mit Diabetes bestehen. Die Parameter der Polyneuropathie (Leitgeschwindigkeit, Stimmgabel, Monofilament) standen nicht in signifikanter Beziehung zu den AGE-Werten ungeachtet der Tatsache, dass Polyneuropathien mit Diabetes assoziiert sein können (siehe Kap. 4.2). Ferner fanden sich keine Korrelationen mit dem Emphysemscore, der aus dem CT bestimmt oder anhand einer Prädiktionsfunktion vorhergesagt worden war.

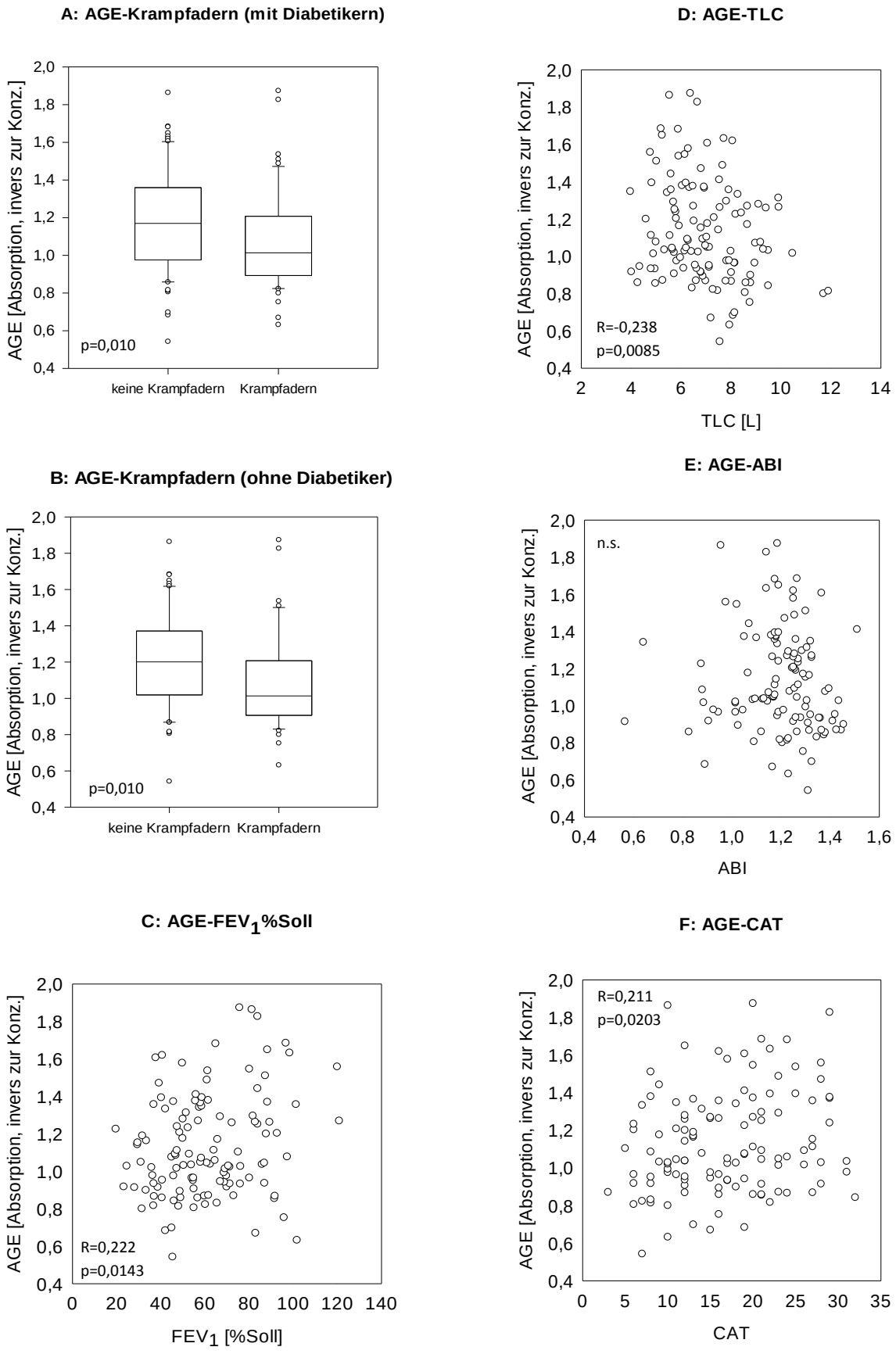


Abb. 4.10: Beziehung der AGEs zu Krampfadern mit und ohne Diabetiker (A) und (B), FEV_1%Soll (C), TLC (D), ABI (E) und CAT (F)

4.6.3 LL-37

Alter und Alterungsmarker und Komorbiditäten

Die Konzentrationen von LL-37 hingen nur tendenziell vom chronologischen Alter (p=0,0814) der Patienten ab, jedoch in statistisch signifikanter Weise von der Differenz des geschätzten Alters und des chronologischen Alters (p=0,0367; R=-0,196; Abb. 4.11A) sowie vom geschätzten Alter (p=0,0075; Abb. 4.11B) der Probanden. Sie zeigten darüber hinaus eine signifikante Beziehung zum Schweregrad der NL-Faltenscores der Patienten (p=0,013; LL-37 41,015 bzw. 40,635 bzw. 35,431). Keine signifikante Beziehung hingegen bestand zwischen der LL-37 Konzentration und dem PO-Faltenscore sowie der Faltensumme aus den beiden einzelnen Scores, Komorbiditäten oder den Messgrößen der Lungenfunktion. Einzige Ausnahme der Komorbiditäten stellte die Anamnese eines Asthma bronchiale dar. Patienten mit Asthma zeigten niedrigere LL-37 Konzentrationen im Plasma als die Patienten ohne (p=0,007; LL-37 32,015 bzw. 39,385). Der Raucherstatus (Nieraucher bzw. Ex-Raucher bzw. Raucher) der Patienten hingegen war in signifikanter Weise mit den LL-37 Konzentrationen im Plasma assoziiert und zwar dergestalt, dass ein deutlicher Anstieg der Konzentration des LL-37 im Plasma von Nierauchern über Ex-Rauchern zu Rauchern beobachtet werden konnte (p=0,001; Abb. 4.11C)

Zusätzliche Messgrößen

Darüber hinaus bestanden keine Korrelationen mit anderen funktionellen Parametern wie 6MWD, T&go, DemTect, ABI, CAT und mMRC sowie Pack-Years. Ferner fanden sich keine Korrelationen mit dem Emphysemscore, der anhand einer Prädiktionsfunktion für alle Patienten vorhergesagt worden war (n=46 vs. 69; p=0,646). Im Gegensatz dazu bestand trotz der kleineren Fallzahl ein signifikanter Zusammenhang der LL-37 Konzentration mit dem Emphysemscore bei denjenigen Patienten, die ein auswertbares CT aus klinischen Gründen erhalten hatten (n=16 vs. 22; p=0,0094; Abb. 4.11D). Die Konzentration von LL-37 zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der Telomerenlänge (p=0,765; Abb. 4.11E) oder der AGE-Konzentration (p=0,175; Abb. 4.11F).

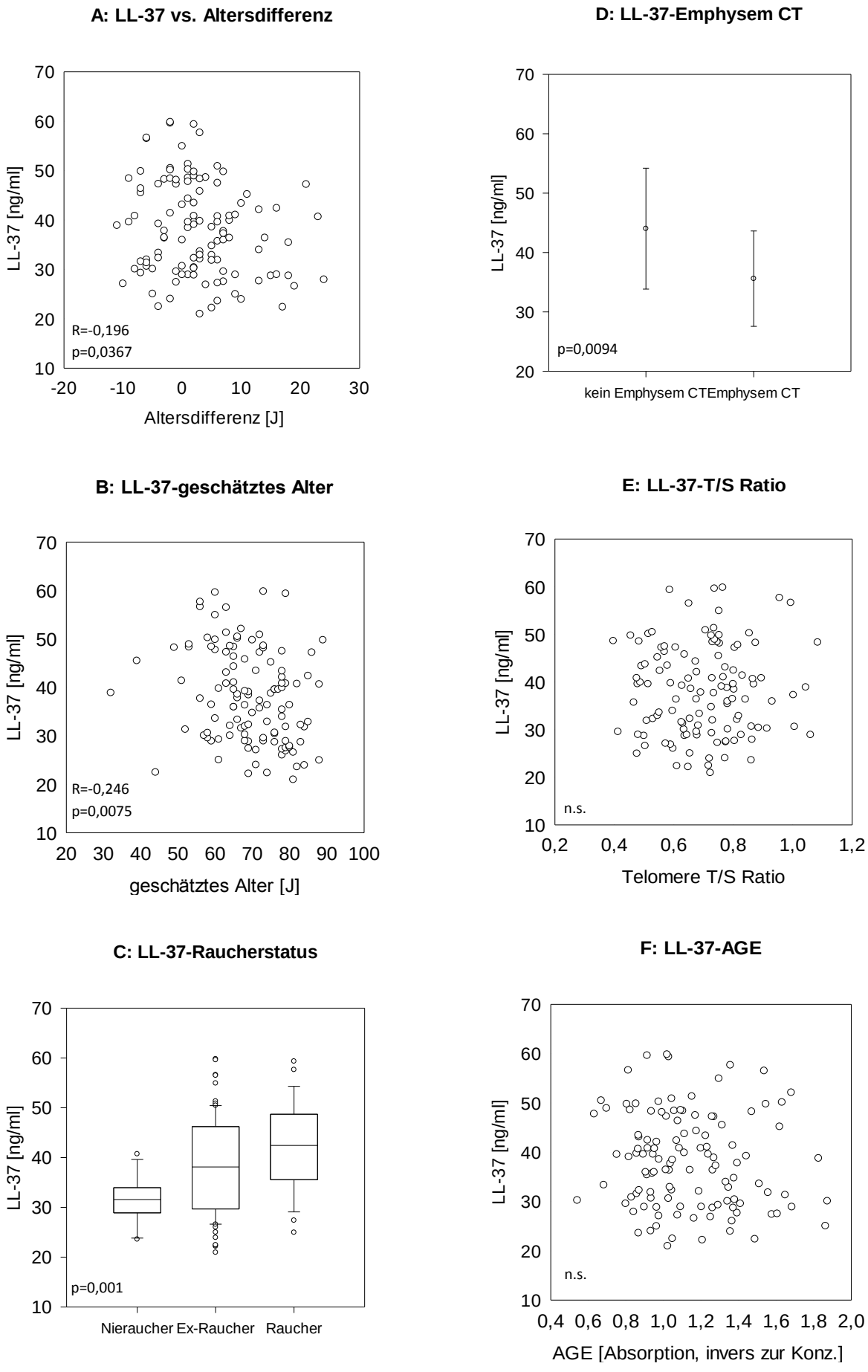


Abb. 4.11: Beziehung des LL-37 zur Altersdifferenz (A), geschätztes Alter (B), Raucherstatus (C), Emphysem CT (D), T/S Ratio (E) und AGEs (F)

4.6.4 Marker der Hautalterung

Raucheranamnese

Dass biologisches Altern durch Zigarettenrauchen gefördert wird, ist gut bekannt. Dementsprechend zeigten sich Unterschiede in der Anzahl der Pack-Years, wenn man die Summenfaltenscores (PO+NL) in die Kategorien 2-4, 5-6 und 7-8 zusammenfasste, um hinreichende Fallzahlen in diesen Kategorien zu erhalten (p=0,024; Abb. 4.12A). Ausschlaggebend für diesen Zusammenhang war insbesondere der Vergleich der Gruppen Faltensumme 2-4 und 7-8 (p=0,032). In analoger Weise zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zahl der Pack-Years und des Schweregrades der NL-Falten (p=0,034; Abb. 4.12B), wobei deren Signifikanz im Unterschied zwischen den Faltenschweregraden NL 1,2 und 4 begründet lag (p=0,032). Das Ergebnis für die PO-Falten hingegen war nicht signifikant für die einzelnen Schweregrade 1, 2, 3 und 4 (p=0,097; Abb. 4.12C). Fasste man die PO-Falten hingegen in die Gruppen der Schweregrade PO 1,2 und 3,4 zusammen, um ausreichend große Fallzahlen zu erreichen, so konnte der Zusammenhang statistisch signifikant belegt werden (p=0,023). Die Differenz zwischen geschätztem und chronologischem Alter stand in einem nichtsignifikanten Verhältnis zu den Pack-Years (Abb. 4.12D).

Körperliche Leistungsfähigkeit

Entsprechend den Erwartungen nahm die körperliche Leistungsfähigkeit, gemessen als 6-Minuten-Gehtest, über alle Patienten mit dem Alter ab (R_S=-0,279; p=0,0017). Die war auch für das geschätzte Alter der Fall (R_S=-0,235; p=0,0092). Allerdings bestand keine signifikante Beziehung zwischen der 6MWD und der Differenz des geschätzten und tatsächlichen Alters (Abb. 4.12E). Für die NL-Falten allerdings ergab sich zumindest die Tendenz eines Zusammenhangs mit der Gehstrecke (p=0,074; Abb. 4.12F).

Lungenfunktion

Die Messwerte der Lungenfunktion nehmen bekanntlich ebenfalls mit dem Alter ab und waren in der vorliegenden Studie teilweise mit dem (vorhergesagten) Bestehen eines Lungenemphysems korreliert (siehe Kap. 4.6). Daher würde man auch eine Beziehung zu Alterungsmarkern vermuten können. In der Tat war die Diffusionskapazität für CO (TLCO) mit dem geschätzten Alter assoziiert (R=-0,254; p=0,005), jedoch nur noch grenzwertig, wenn für die TLCO der Prozentwert vom Soll genommen wurde (R=-0,172; p=0,0614). Aussagekräftiger als die Absolutwerte des Alters bzw. geschätzten Alters war die

Altersdifferenz (geschätztes Alter minus tatsächliches Alter), die ein Maß der vorzeitigen biologischen Alterung darstellt. Diese Altersdifferenz sollte sich auch in den Funktionswerten niederschlagen.

In der Tat war die Altersdifferenz mit der alterskorrigierten TLCO in % des Sollwertes korreliert (p=0,0164; Abb. 4.13A), während dies für die Absolutwerte der TLCO nicht der Fall war. Auch die TLC in % des Sollwertes hing mit der Altersdifferenz signifikant zusammen (p=0,0074; Abb. 4.13B); in diesem Fall war auch der Zusammenhang mit den Absolutwerten der TLC statistisch signifikant (R_S=0,329; p<0,001). Ferner war der Tiffeneau-Wert mit der Altersdifferenz korreliert (p<0,001; Abb. 4.13C). Im Spearman-Test fanden sich für RV und ITGV, ausgedrückt als Absolutwerte oder % vom Sollwert, ebenfalls signifikante Korrelationen mit der Altersdifferenz (jeweils p<0,001).

Über die Altersdifferenz hinaus wurden auch der Faltensummenscore sowie die PO- und NL-Falten auf einen möglichen Zusammenhang mit Einschränkungen der Lungenfunktion untersucht. Hierbei fand sich für die Faltensumme aus NL- und PO-Falten ein statistisch signifikanter Zusammenhang sowohl mit der TLCO ausgedrückt als Absolutwert (R_s=-0,294; p=0,0016), als auch mit der TLCO als % des Sollwertes (p=0,0085; Abb. 4.13D). Im Hinblick auf die Faltensumme und Korrelationen mit den Lungenfunktionsparametern TLC, ITGV und RV ergaben sich keine weiteren statistischen Signifikanzen, lediglich die Tendenz eines Zusammenhanges zwischen dem Absolutwert des RV und der Faltensumme (R_s=0,167; p=0,0697). Analoge Zusammenhänge konnten für den NL-Faltenscore gefunden werden, der ebenfalls in signifikanter Beziehung stand zur TLCO absolut (p=0,005) sowie dem alterskorrigierten Wert ausgedrückt in %Soll (p=0,021; Abb. 4.13E). Für die PO-Falten hingegen ergaben sich keinerlei statistisch signifikante Zusammenhänge.

Zusätzliche Variablen

Gehtest und Lungenfunktion sind im BODE-Score enthalten. Entsprechend fand sich eine, wenn auch schwache, Beziehung zwischen BODE-Score und NL-Falten (p=0,050; Abb. 4.13F). Teilte man den BODE-Score in zwei Gruppen, um eine ausreichend große Fallzahl zu erhalten (0-4 bzw. >4), so ergab sich weiterhin eine schwach signifikante Beziehung zu der Altersdifferenz (p=0,033). Keine signifikanten Beziehungen der Faltenscores fanden sich zu den Ergebnissen des DemTect, ABI sowie des T&go, des CAT und mMRC.

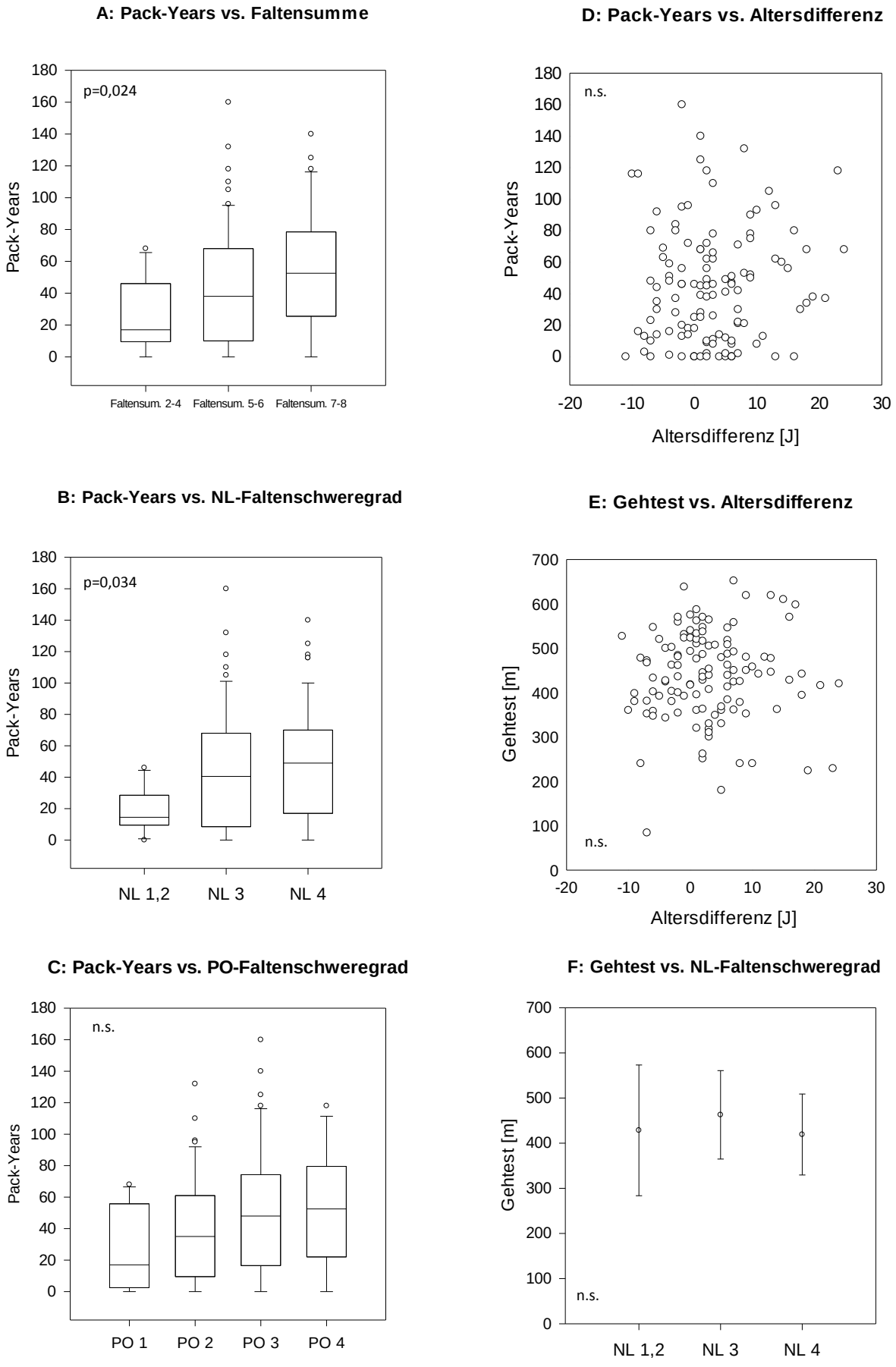
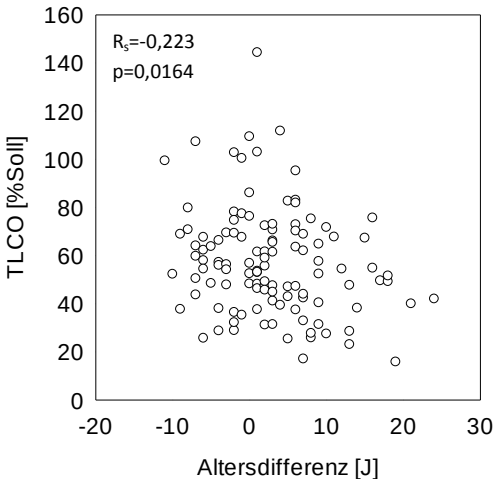
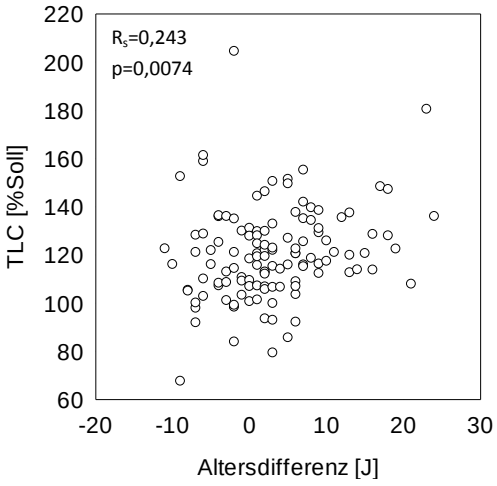


Abb. 4.12: Beziehung von Faltensumme zu den Pack-Years (A), NL-Faltenschweregrad zu den Pack-Years (B), PO-Faltenschweregrad zu den Pack-Years (C), Altersdifferenz zu den Pack-Years (D), Altersdifferenz zum 6MWD (E) und NL-Faltenschweregrad zum 6MWD (F)

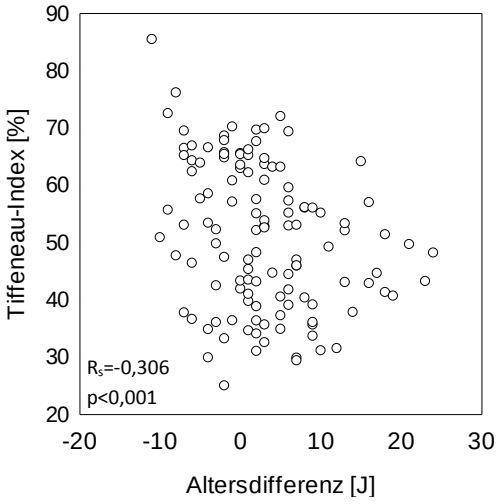
A: TLCO %Soll-Altersdifferenz



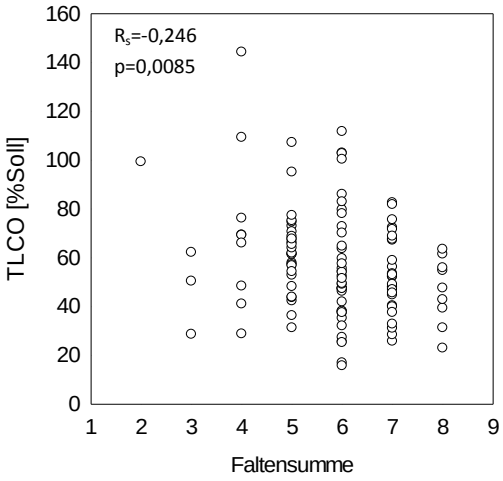
B: TLC %Soll-Altersdifferenz



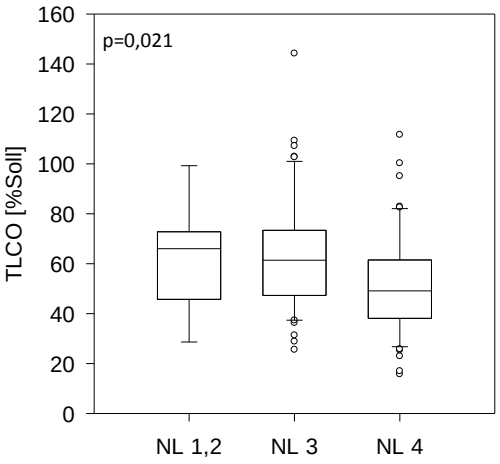
C: Tiffeneau-Index vs. Altersdifferenz



D: TLCO %Soll-Faltensumme



E: TLCO %Soll vs. NL-Faltenschweregrad



F: BODE-Score vs. NL-Faltenschweregrad

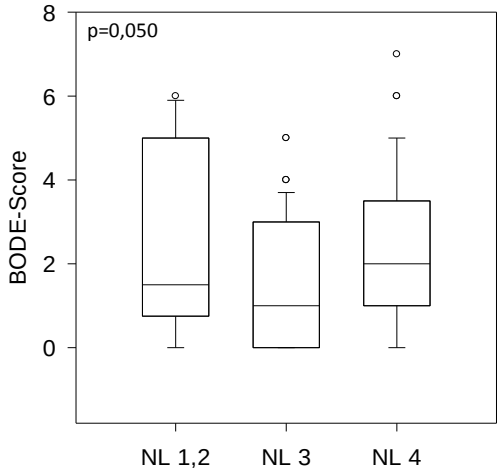


Abb. 4.13: Beziehung der Altersdifferenz zu TLCO %Soll (A), TLC %Soll (B) und Tiffeneau-Index (C), Beziehung der Faltensumme zur TLCO %Soll (D), der Faltenschweregrade NL zu TLCO %Soll (E) und BODE-Score (F)

4.6.5 Lungenfunktion und Emphysemscore

Diffusionskapazität

Da die Diffusionskapazität für CO (TLCO) in vielen Studien eine Beziehung zu der CT-morphologischen Kategorisierung bzw. quantitativen Ausprägung eines Emphysems zeigte, erfolgte zur Prüfung der Konsistenz der Daten eine entsprechende Analyse auch für den vorliegenden Datensatz. In der Tat war die Diffusionskapazität in % des Sollwertes mit dem Emphysemscore assoziiert, sowohl für die Patienten mit einem vorliegenden CT ($p=0,043$; Abb. 4.14A) als auch für die Gesamtgruppe der Patienten, denen ein Emphysem anhand der Vorhersagefunktion zugeschrieben worden war ($p<0,001$; Abb. 4.14B). Einschränkend ist zu bemerken, dass die TLCO in die Vorhersagefunktion Eingang gefunden hatte, jedoch belegt das für die Patienten mit vorliegendem CT gefundene Ergebnis, dass es sich nicht um ein statistisches Artefakt handelt. Ähnliche Beziehungen ergaben sich, wenn statt des altersnormierten Prozentsatzes vom Sollwert die Absolutwerte von TLCO verwendet wurden, wobei hierbei die kleinere Gruppe mit vorhandenem CT nur noch im Trend eine Beziehung zeigte ($p=0,0986$ bzw. $p<0,001$).

Ganzkörperplethysmographie

Die Differenz zwischen TLC und alveolärem Volumen (VA) aus der TLCO-Messung war in der Gesamtgruppe der Patienten signifikant ($p<0,001$) mit der Vorhersage eines Emphysems korreliert ($\Delta=2,69$ l vs. 1,66 l). In der Gruppe der Patienten mit vorliegendem CT war der Unterschied dieser Differenzen geringer ($\Delta= 2,35$ l vs. 1,85 l) und nicht statistisch signifikant.

Die Totale Lungenkapazität (TLC), ausgedrückt als % des Sollwertes, war nicht signifikant mit dem Emphysemscore bei Patienten mit vorliegendem CT korreliert, wohl aber in der Gesamtgruppe der Patienten mit dem vorhergesagten Score ($p<0,001$; Abb. 4.14C); der Wert von TLC ging allerdings ebenfalls in den Vorhersagescore ein. Analoge Ergebnisse fanden sich, wenn der Absolutwert von TLC mit dem Emphysemscore der Patienten mit vorhandenem CT in Beziehung gesetzt wurde (n.s.) bzw. mit dem vorhergesagten Score ($p<0,001$). Für das Intrathorakale Gasvolumen (ITGV) und das Residualvolumen (RV), beide in Form vom % des Sollwertes, ergaben sich in völlig analoger Weise Korrelationen mit dem vorhergesagten Emphysemscore ($p<0,001$ bzw. $p<0,001$). Beide Messparameter gingen nicht in die Vorhersagefunktion ein.

Zusätzliche Parameter

Unter den spirometrischen Parametern zeigte sich der Tiffeneau-Wert (FEV_1/FVC) als signifikant korreliert mit dem vorhergesagten Emphysemscore ($p<0,001$; Abb. 4.14D). Dieser Wert ging zwar ebenfalls in den Vorhersagescore ein, jedoch zeigte sich auch in der Gruppe der Patienten mit vorliegendem CT eine signifikante Beziehung zum Emphysemscore ($p=0,0017$; Abb. 4.14E).

Die Lungenfunktion war auch Bestandteil des BODE-Scores, neben Gehstrecke, BMI und Dyspnoe-Score. Der BODE-Score war ebenfalls verschieden für die Patienten mit und ohne einem anhand der Scorefunktion vorhergesagten Emphysem ($p<0,001$; Abb. 4.14F). Ferner bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne vorhergesagtem Emphysemscore und dem Raucherstatus ($p=0,048$) und ein der Tendenz nach signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Pack-Years (Emphysem=48 Pack-Years vs. kein Emphysem=36 Pack-Years; $p=0,054$)

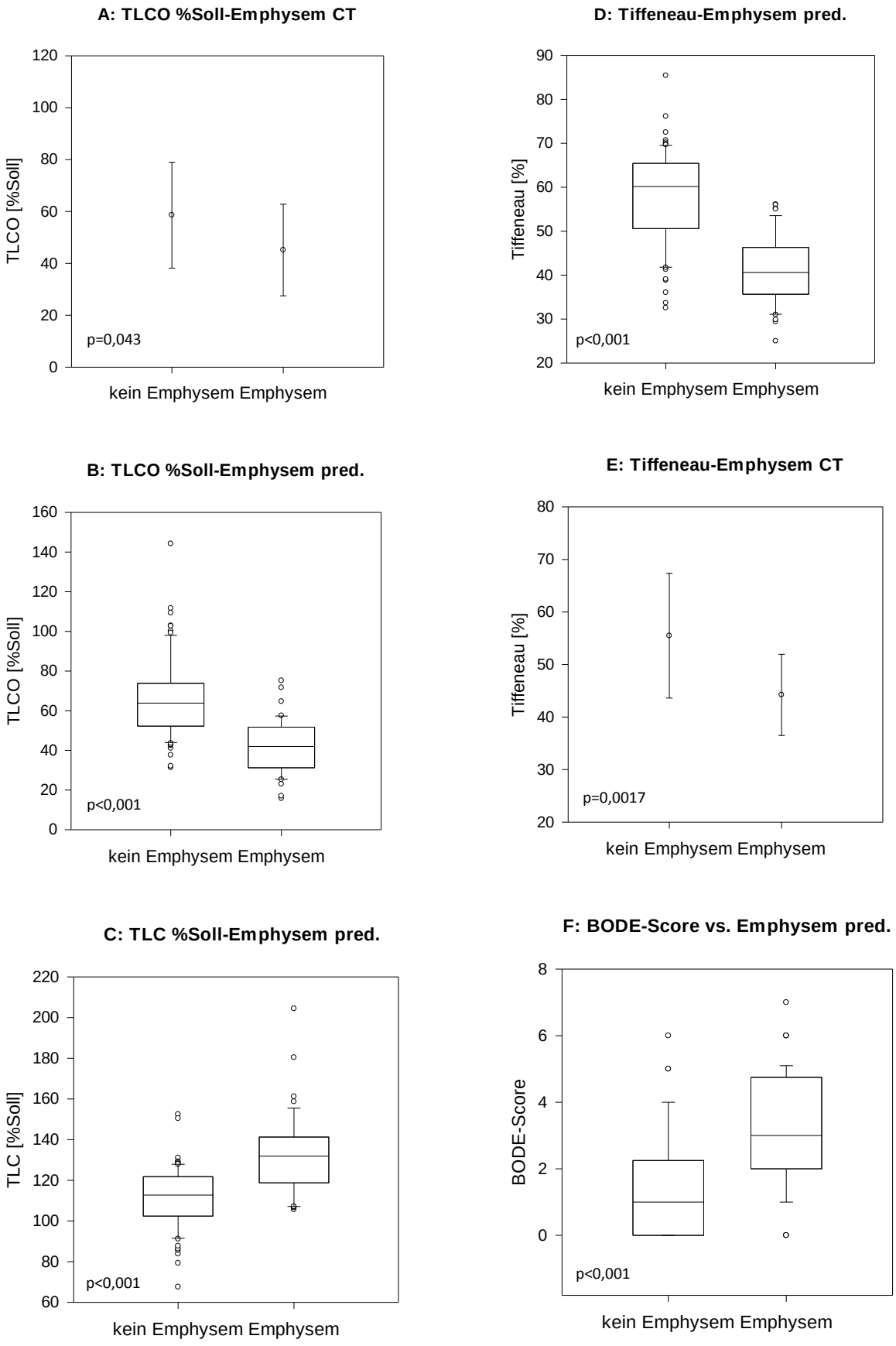


Abb. 4.14: Beziehung des Emphysemscores zu TLCO %Soll (A und B), TLC %Soll (C), zum Tiffeneau-Index (D und E), und BODE-Score (F)

4.7 Beziehungen der Alterungsmarker zu weiteren klinischen Kenngrößen

Über die in Kap. 4.6 aufgeführten Vergleiche hinaus wurden die Marker der biologischen Alterung zu weiteren Messgrößen, vor allem denen des klinischen Labors, in Beziehung gesetzt. Um die Gefahr falsch positiver Assoziationen möglichst gering zu halten, wurden unter der Vielzahl der Möglichkeiten solche ausgewählt, die im Vorfeld pathophysiologisch plausibel erschienen.

4.7.1 Biologische Alterungsmarker versus Blutparameter

Da eine vermehrte entzündliche Aktivität mit einer Alterung im Sinne der Telomerenverkürzung in Beziehung stehen könnte, wurde die Telomerenlänge gegen die Leukozytenzahl aufgetragen. Hierbei fanden sich jedoch keine statistisch signifikanten Beziehungen (p=0,959; Abb. 4.15A). Gleiches war für die Zahl der segmentkernigen Granulozyten der Fall (p=0,504). Eine signifikante Korrelation jedoch bestand mit dem bekannten Entzündungsmarker CRP (R=-0,225; p=0,0133; Abb. 4.15B). Ferner wurde die Telomerenlänge gegen die Werte von Hämoglobin (Abb. 4.15C) und Hämatokrit aufgetragen; auch hierbei fanden sich statistisch signifikante Beziehungen (R=0,220; p=0,0154 bzw. R=0,271; p=0,00264).

Die Werte von AGE korrelierten sowohl mit denen von HbA1c (Abb. 4.15D) als auch mit den aktuellen Werten der Blutglukose (p=0,0098 bzw. p=0,0326). LL-37 zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der Leukozytenzahl (p=0,704), wohl aber mit der Konzentration von CRP (R=0,189; p= 0,0390; Abb. 4.15E). Darüber hinaus fand sich eine Beziehung zwischen LL-37 und den Werten des HDL-Cholesterins (R=-0,513; p<0,001) sowie den Triglyzeriden (R=0,201; p=0,0275). Da Harnstoff unter anderem antioxidative Wirkung hat und Alterung mit oxidativem Stress in Verbindung steht, wurde auch die Harnstoffkonzentration im Blut als Surrogatmarker antioxidativer Kapazität zu der Telomerenlänge und der AGE-Absorption in Beziehung gesetzt. Hierbei fand sich keine signifikante Assoziation mit der Telomerenlänge (p=0,415) oder zu den AGE-Werten (p=0,665; Abb. 4.15F).

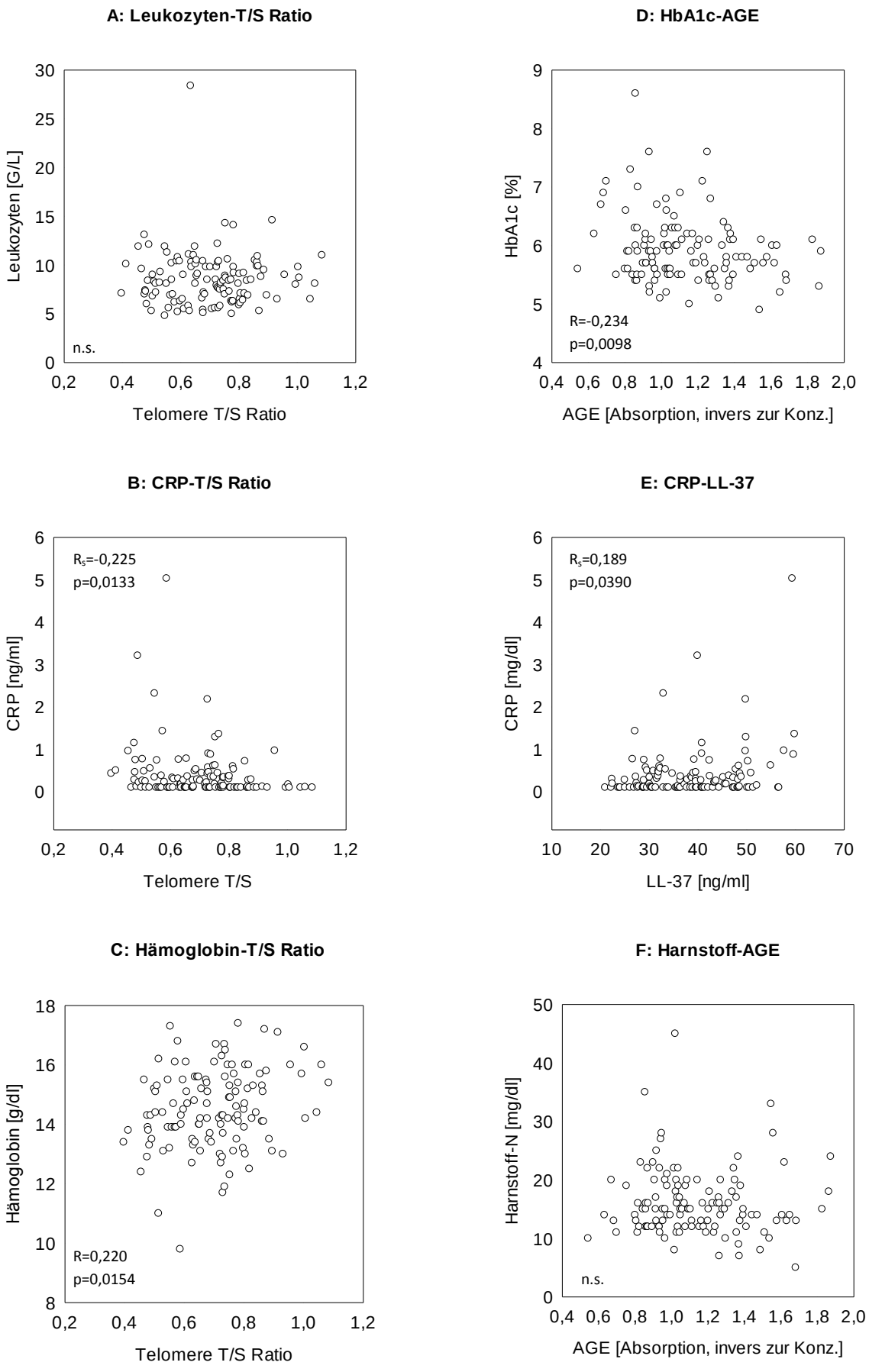


Abb. 4.15: Beziehung der Leukozyten zur T/S Ratio (A), des CRP zur T/S Ratio (B), des Hämoglobins zur T/S Ratio (C), des HbA1c zu den AGEs (D), des CRPs zum LL-37 (E) und des Harnstoffs zu den AGEs (F)

4.7.2 Alterungsmarker versus Adipositas

Der Body-Mass-Index war mit dem GOLD-Stadium statistisch signifikant assoziiert (p=0,039; Abb. 4.16A, siehe Tabelle 4.1). Keine statistisch signifikanten Beziehungen bestanden zu Bauchumfang und Waist-to-Hip Ratio. Der BMI war ebenfalls signifikant korreliert mit dem Vorhandensein eines Lungenemphysems, sofern hierfür der Vorhersagescore verwendet wurde, der für alle Patienten (n=122) anhand der Lungenfunktion errechnet worden war (p<0,001; Abb. 4.16B). Ähnliches ergab sich für den Bauchumfang (p=0,0345). Wurden hingegen nur die Befunde verwendet, die aus den vorliegenden 39 CTs ermittelt worden waren, so ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Die Beziehungen zwischen BMI bzw. verwandten Parametern und dem Bestehen eines Emphysems wurden u.a. auch deshalb ausgewertet, weil diese Korrelationen mit den Alterungsmarkern zeigten. Dies war der Fall für den Bauchumfang (p=0,027; Abb. 4.16C) sowie die Waist-to-Hip Ratio (p=0,0093) in Relation zur T/S Ratio. Für den BMI bestand keine Signifikanz (p=0,221). Hingegen korrelierte der BMI signifikant mit dem geschätzten Alter (p=0,0107; Abb. 4.16D); dies war auch der Fall für die Waist-to-Hip Ratio (p=0,0257), während der Bauchumfang keine signifikante Beziehung zeigte. Keiner der Marker BMI, Bauchumfang und Waist-to-Hip Ratio war statistisch signifikant mit dem tatsächlichen Alter der Patienten korreliert. Die Altersdifferenz stand in signifikanter Beziehung zu BMI (p=0,0183; Abb. 4.16E); hingegen waren die Korrelationen der Differenz mit der Waist-to-Hip Ratio (p=0,105) nur der Tendenz nach signifikant und mit dem Bauchumfang gar nicht signifikant (p=0,353). Weder die beiden einzelnen Faltenscores noch deren Summe standen in statistisch signifikanter Beziehung zu BMI, Bauchumfang oder Waist-to-Hip Ratio.

In analoger Weise wurden die Adipositas-Kenngrößen zu den AGEs und LL-37 in Beziehung gesetzt. Für die AGEs ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen, einzig eine Tendenz eines Zusammenhangs mit der Waist-to-Hip Ratio (p=0,0939). Im Gegensatz dazu war die Konzentration von LL-37 signifikant mit dem BMI (p=0,0041; Abb. 4.16F) sowie dem Bauchumfang (p=0,0243) korreliert, hingegen nur der Tendenz mit der Waist-to-Hip Ratio (p=0,0643).

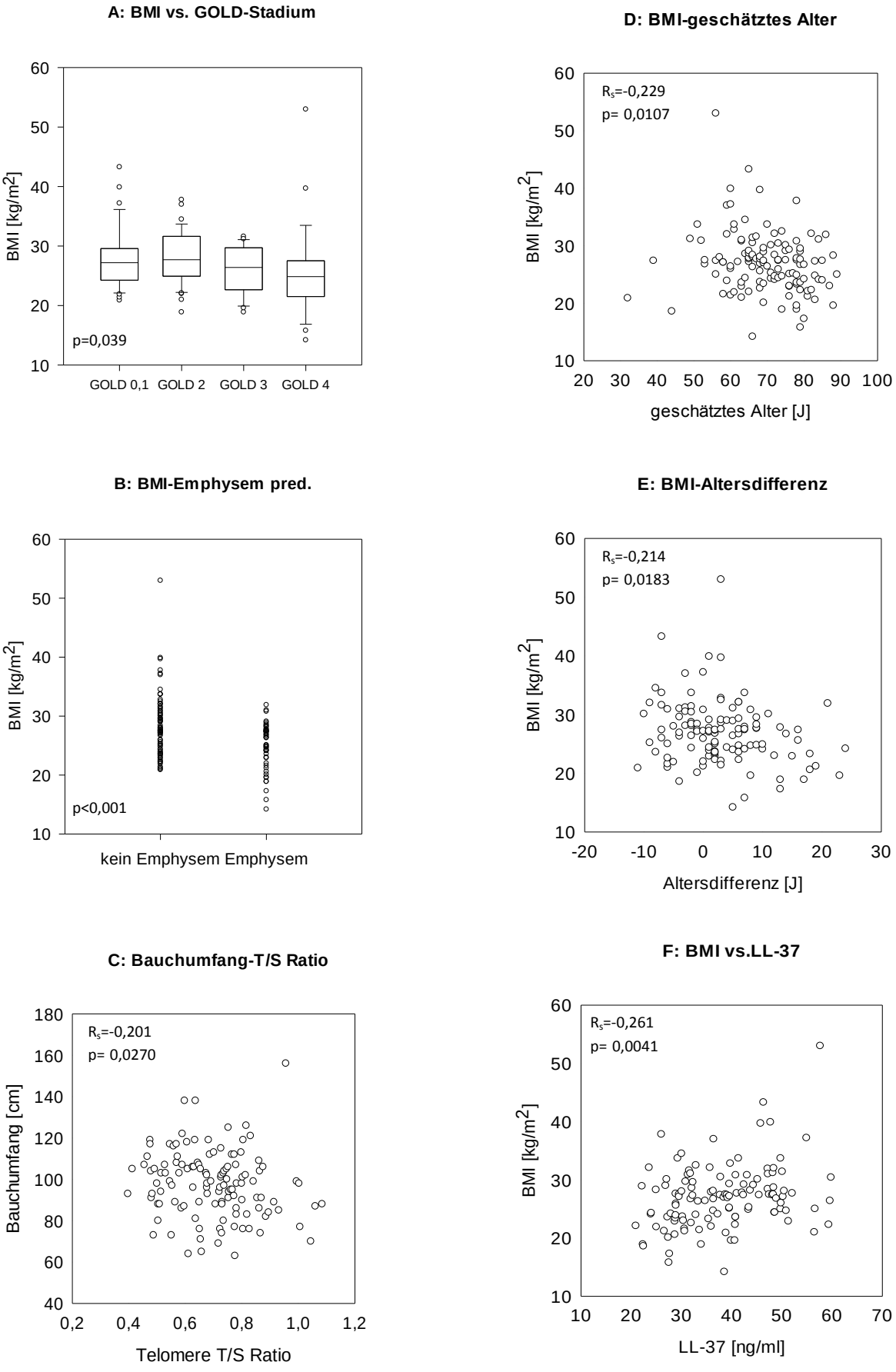


Abb. 4.16: Beziehung des BMI zu den GOLD-Stadien (A), des BMI zu (vorhergesagtem) Emphysem (B), des Bauchumfangs zur T/S Ratio (C), des BMI zum geschätzten Alter (D), des BMI zur Differenz aus geschätztem Alter minus chronologischem Alter (E) und des BMI zu LL-37 (F)

4.7.3 Alterungsmarker versus Emphysemscore

Der Emphysemscore stand in grenzwertiger Beziehung zu den NL-Falten, wenn man die Patienten mit vorliegendem CT (p=0,083) oder den vorhergesagten Emphysemscore zugrunde legte (p=0,059). Keine Beziehung bestand zu den PO-Falten. Die Summe beider Scores korrelierte wiederum grenzwertig mit den Emphysemscores (p=0,136 bzw. p=0,064). Das tatsächliche Alter stand für keinen der beiden Emphysemscores in statistisch signifikanter Beziehung. Gleiches galt für das geschätztes Alter und den Zusammenhang mit dem aus CT-Bildern erhobenen Score. Das geschätzte Alter stand jedoch tendenziell mit dem Vorhandensein eines Emphysems in Beziehung (p=0,056; 72,5 vs. 68 Jahre), wenn man die Vorhersagefunktion des Scores verwendete. Außerdem fanden sich für den vorhergesagten Emphysemscore (p<0,001; Abb. 4.17; vgl. Abb. 4.19 und Abb. 4.22) signifikante Unterschiede in der Differenz des geschätzten und des tatsächlichen Alters. Dies galt nicht für die Patienten mit vorliegendem CT (p=0,232).

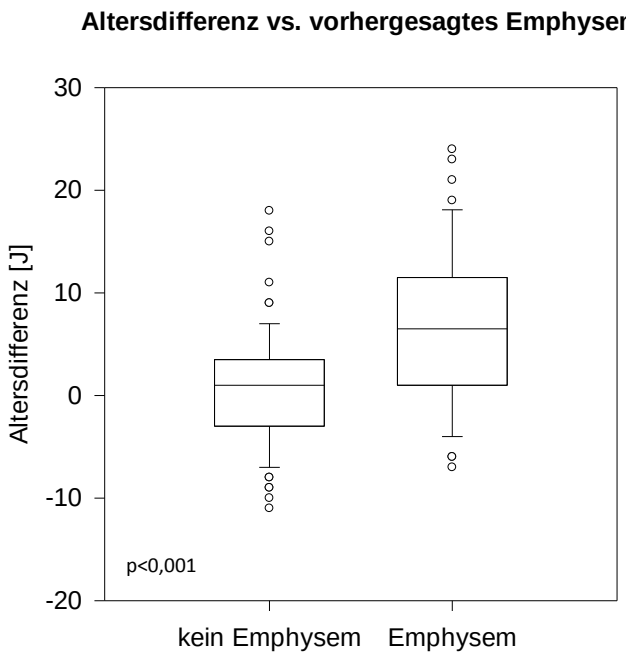


Abb. 4.17: Beziehung der Altersdifferenz zu vorhergesagtem Emphysemscore

4.8 Multivariate Analysen der Alterungsmarker

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die analysierten Marker in der Regel von mehreren Einflussgrößen abhingen und miteinander korreliert waren, wurden multivariate Analysen durchgeführt, in die mehr als zwei Variablen gleichzeitig Eingang fanden. Dies diente nicht alleine dazu, den Einfluss von Variablen zu separieren, die gleichsinnig wirkten, sondern auch den Einfluss von Variablen, die gegenläufig wirkten und damit mögliche Zusammenhänge nicht vortäuschen, sondern verdecken könnten.

Die Auswahl der Variablen erfolgte primär auf der Basis der vorstehend genannten bivariaten Analysen sowie Überlegungen zur pathophysiologischen Plausibilität. Hierbei wurden niemals mehr als fünf unabhängige (i.d.R. zwei) Variable gleichzeitig analysiert, um angesichts des begrenzten Umfangs des Datensatzes das Verhältnis von Fallzahl zu Variablenzahl in der Größenordnung von mindestens 20 zu halten. Da die statistischen Beziehungen zwischen vielen der Marker relativ schwach waren, resultierte ein überschaubarer Satz an multivariaten Analysen. Die Zahl der Analysen wurde ebenfalls begrenzt, um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse nicht übermäßig anwachsen zu lassen. Angewendet wurden vornehmlich logistische Regressionsanalysen (für binäre Outcome-Variablen) und ergänzend lineare Regressionsanalysen (für kontinuierliche Outcome-Variablen).

4.8.1 Emphysemscore, Bauchumfang und Telomeren

Ein geringerer Bauchumfang stand in Beziehung zum Emphysemscore (siehe Kap.4.7.2) und war zugleich im Gesamtkollektiv mit einer größeren Telomerenlänge assoziiert (siehe Kap. 4.7.2). Unter der Hypothese, dass ein Emphysem mit kürzeren Telomeren verbunden sein könnte, war es daher sinnvoll, den (vorhergesagten) Emphysemscore als gemeinsame Funktion von Bauchumfang und Telomerenlänge zu analysieren; möglicherweise war der Zusammenhang mit den Telomeren durch den Zusammenhang mit dem Bauchumfang verdeckt. Die logistische Regressionsanalyse identifizierte den Bauchumfang als nach wie vor statistisch signifikanten Prädiktor ($p=0,045$; $n=117$), während die Telomerenlänge nach wie vor insignifikant blieb. Schränkte man die Analyse auf die Patienten mit vorliegendem CT ein ($n=39$), so fanden sich keinerlei signifikante Zusammenhänge.

4.8.2 Emphysemscore, Bauchumfang und BMI

Wie in Kap. 4.7.2 beschrieben, stand der Emphysemscore in Beziehung nicht nur zum Bauchumfang, sondern auch zum BMI. Um herauszufinden, in welcher Beziehung zueinander diese Korrelationen standen, wurden verschiedene logistische Regressionsanalysen durchgeführt, bei denen immer der (vorhergesagte) Emphysemscore als abhängige Variable fungierte. Verwendete man zur Voraussage simultan BMI und Bauchumfang, so zeigte sich eine signifikante Korrelation mit beiden Parametern ($p<0,001$ bzw. $p=0,009$). Hierbei ging ein erniedrigter BMI mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Emphysems einher. Bei festgehaltenem BMI war der Bauchumfang jedoch gegenläufig korreliert, d.h. Emphysem mit einem relativ höheren Bauchumfang assoziiert.

Es lag nahe, zur näheren Analyse den Index der fettfreien Masse (FFMI), der aus der Bioimpedanzanalyse (BIA) gewonnen wurde, heranzuziehen. Führte man eine logistische Regression des vorhergesagten Emphysemscores mit den Prädiktoren BMI, FFMI und Bauchumfang durch, so blieben BMI und Bauchumfang statistisch signifikant, während FFMI weit von jeder Signifikanz entfernt war ($p=0,322$). Auch weitere lineare oder logistische Analysen ergaben keine über BMI und Bauchumfang hinausgehende Information aus dem FFMI; dies ist der Grund, weshalb der FFMI in der vorliegenden Arbeit nicht explizit eingeschlossen wurde.

Die unterschiedliche Beziehung von Bauchumfang und BMI zum Emphysemscore äußerte sich auch darin, dass bei einer linearen Regressionsanalyse von Bauchumfang gegen BMI (Bauchumfang=2,567*BMI+27,626) bei den Patienten ohne (vorhergesagtes) Emphysem das 95%-Konfidenzintervall der Steigung der Regression (2,210; 2,924) betrug (Abb. 4.18). Hingegen war bei Patienten mit Emphysem (Bauchumfang=3,308*BMI+12,266) die Steigung größer und nicht in dem vorstehenden Konfidenzintervall enthalten; das 95%-Konfidenzintervall betrug (2,851; 3,765) und enthielt dementsprechend die andere Steigung nicht. Dieser Unterschied der Steigungen blieb bestehen, wenn ein extremer Datenpunkt als möglicher Ausreißer weggelassen wurde (siehe Abb. 4.18). Daher hatten Patienten mit Emphysem zwar einen niedrigeren Bauchumfang als solche ohne Emphysem, jedoch war die Beziehung zum BMI eine geringfügig andere. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass in einer oberflächlich gesehen gleichsinnigen Korrelation unterschiedliche Korrelationen verborgen sein können.

4.8.3 Emphysemscore, Bauchumfang, BMI und Altersdifferenz

Beziehung zum Emphysemscore

Der Emphysemscore stand ebenfalls in Beziehung zu der Differenz des geschätzten und tatsächlichen Alters (siehe Kap. 4.7.3). Führte man dementsprechend als Prädiktoren die Altersdifferenz zusammen mit entweder dem Bauchumfang oder dem BMI ein, so ergab sich, ähnlich wie in den bivariaten Analysen, in beiden logistischen Regressionsanalysen ein statistisch signifikanter Zusammenhang des vorausgesagten Emphysemscores mit der Altersdifferenz (p=<0,001 bzw. p=0,001). Ebenso verblieb der BMI bei dieser simultanen Analyse als hochsignifikant mit dem Emphysemscore korreliert (p=0,008), während der Bauchumfang als Prädiktor entfiel (p=0,125). Darin äußerte sich möglicherweise der in Kap. 4.8.2 beschriebene nicht parallele Zusammenhang von BMI und Bauchumfang mit dem Emphysem. Die Tatsache, dass sowohl BMI als auch Altersdifferenz mit der Vorhersage eines Emphysems korreliert waren, ist in Abb. 4.19 dargestellt. Zugleich sieht man, dass die Korrelation zwischen beiden Prädiktoren zwar bestand, aber nicht so stark war, einen von beiden als unabhängigen Prädiktor zu eliminieren.

Beziehung zwischen Altersdifferenz und BMI

Zur Überprüfung erfolgten noch zwei lineare Regressionsanalysen der Altersdifferenz gegen den BMI, getrennt für Patienten mit und ohne positiven Emphysemscore. Hierbei ergab sich bei den Patienten ohne vorhergesagtes Emphysem keinerlei Zusammenhang zwischen beiden Variablen; insbesondere war der Achsenabschnitt der Regression nicht signifikant von Null verschieden. Darin äußerte sich die Tatsache, dass im Mittel bei diesen Patienten das geschätzte und tatsächliche Alter übereinstimmten (siehe Abb. 4.19). Bei den Patienten mit dem vorhergesagten Emphysem war hingegen der Achsenabschnitt der Regression signifikant größer als Null (p=0,018), als Ausdruck der Tatsache, dass diese Patienten biologisch vorgealtert waren. Ferner war der Tendenz nach der Zusammenhang zwischen Altersdifferenz und BMI invers, wenngleich nicht statistisch signifikant. Dies ging mit der Vermutung konform, dass eine stärkere biologische Voralterung mit einem geringeren BMI einherging.

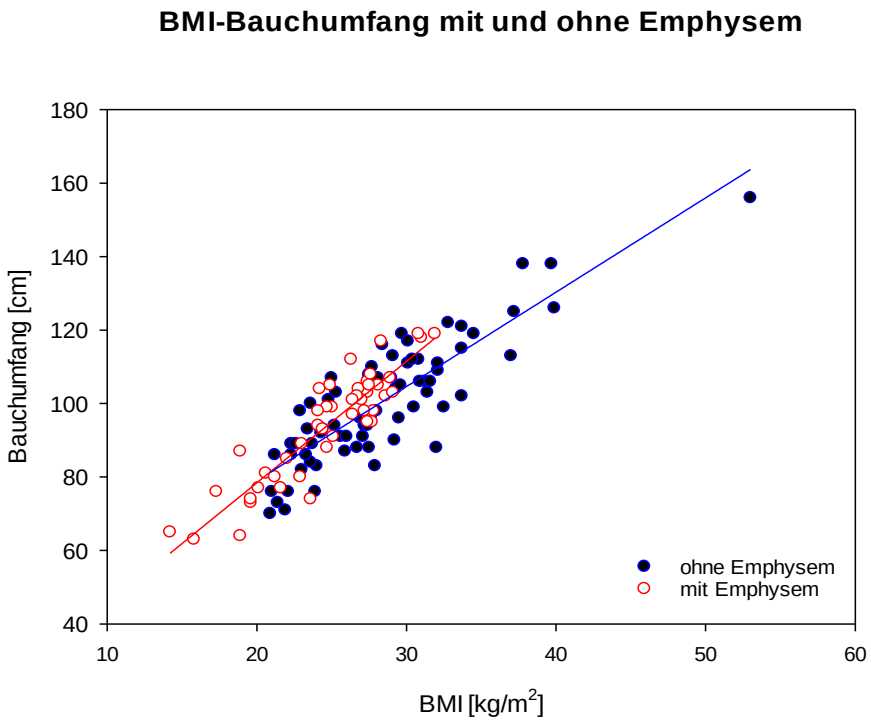


Abb. 4.18: Beziehung von Bauchumfang zum BMI in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem. Die Linien zeigen die Regressionsgeraden für die beiden Untergruppen mit und ohne vorhergesagtes Emphysem

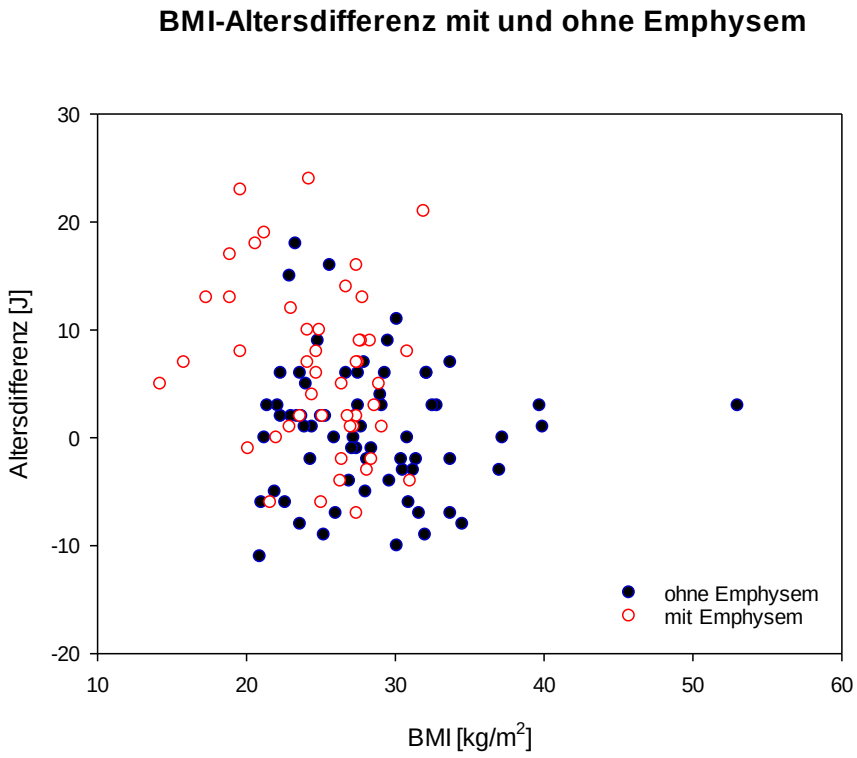


Abb. 4.19: Beziehung von Altersdifferenz zum BMI in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem

4.8.4 Emphysemscore, LL-37 und Altersdifferenz

LL-37 und Altersdifferenz

Da die Konzentration von LL-37 im Blut zumindest bei den Patienten mit vorliegendem CT mit dem Emphysemscore zusammenhing und ebenso zumindest mit dem geschätzten Alter, wurde eine simultane Analyse mit dem Emphysemscore als abhängiger Variable und LL-37 sowie der Altersdifferenz als Prädiktoren durchgeführt. Hierbei war die Altersdifferenz nach wie vor (siehe Kap. 4.7.3) hochsignifikant ($p<0,001$) mit dem Emphysemscore korreliert, wenn man die Gesamtgruppe der Patienten analysierte. Hingegen fand sich kein Zusammenhang mit LL-37. Analysierte man umgekehrt nur die Patienten mit vorliegendem CT, so blieb wie in der bivariaten Analyse LL-37 signifikant mit dem Emphysemscore korreliert ($p=0,025$), während die Altersdifferenz nicht statistisch signifikant war.

LL-37 und Raucherstatus

LL-37 war ebenfalls mit dem Raucherstatus korreliert (siehe Abb. 4.11C). Da zugleich eine signifikante Beziehung zwischen Raucheranamnese und Emphysemscore bestand (Kap. 4.6.5), erfolgte eine logistische Regressionsanalyse mit LL-37 und der Raucheranamnese (Nieraucher, Ex-Raucher, Raucher) als unabhängigen Variablen. In der Gesamtgruppe der Patienten ergaben sich hierbei keinerlei signifikante Zusammenhänge. Beschränkte man die Analyse auf die Patienten mit vorliegendem CT (n=39), so fand sich hingegen nach wie vor eine signifikante Beziehung des Emphysemscores zu LL-37 ($p=0,009$). Interessanterweise war zugleich die Tendenz eines Zusammenhanges mit dem Raucherstatus zu sehen ($p=0,093$), wenn dieser zusammen mit LL-37 analysiert wurde. Wenn hingegen der Raucherstatus als alleiniger Prädiktor in der Gruppe der Patienten mit CT genommen wurde, ergab sich keinerlei Hinweis auf einen signifikanten Zusammenhang. Das gleiche war der Fall für den vorhergesagten Emphysemscore in der Gesamtgruppe der Patienten.

Wenn man statt des Raucherstatus die Pack-Years zusammen mit LL-37 einsetzte, fand sich in der logistischen Regression des (vorhergesagten) Emphysemscores in der Gesamtgruppe ein signifikanter Zusammenhang mit den Pack-Years ($p=0,044$), nicht hingegen mit LL-37 ($p=0,479$). Zog man stattdessen den Emphysemscore von den Patienten mit vorliegendem CT heran, so fand sich hingegen wieder ein signifikanter Zusammenhang mit LL-37 ($p=0,017$), jedoch nicht mit den Pack-Years ($p=0,838$).

Diese Daten legen nahe, dass die Beziehung zwischen LL-37 und Pack-Years auf der einen Seite und dem Emphysemscore auf der anderen Seite für den Emphysemscore bei den Patienten mit vorliegendem CT und den vorhergesagten Emphysemscore in der Gesamtgruppe der Patienten verschieden war. In diesen komplexen Beziehungen äußerte sich zugleich die Tatsache, dass ein niedriger Wert von LL-37 sowie ein höherer Wert der Pack-Years mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Emphysems einhergehen konnte. Zugleich aber war das Rauchen mit höheren Werten von LL-37 assoziiert. Daher lagen hier zwei antagonistische Effekte vor, die in der Tat in der obenstehenden Regressionsanalyse des Raucherstatus und LL-37 versus Emphysemscore zutage taten.

Diese Beziehungen sind aus Abb. 4.20 ersichtlich, ebenso wie die Tatsache, dass besagtes Ergebnis kritisch abhing von dem einen Patienten, der CT-morphologisch kein Emphysem aufwies und angab Nieraucher zu sein.

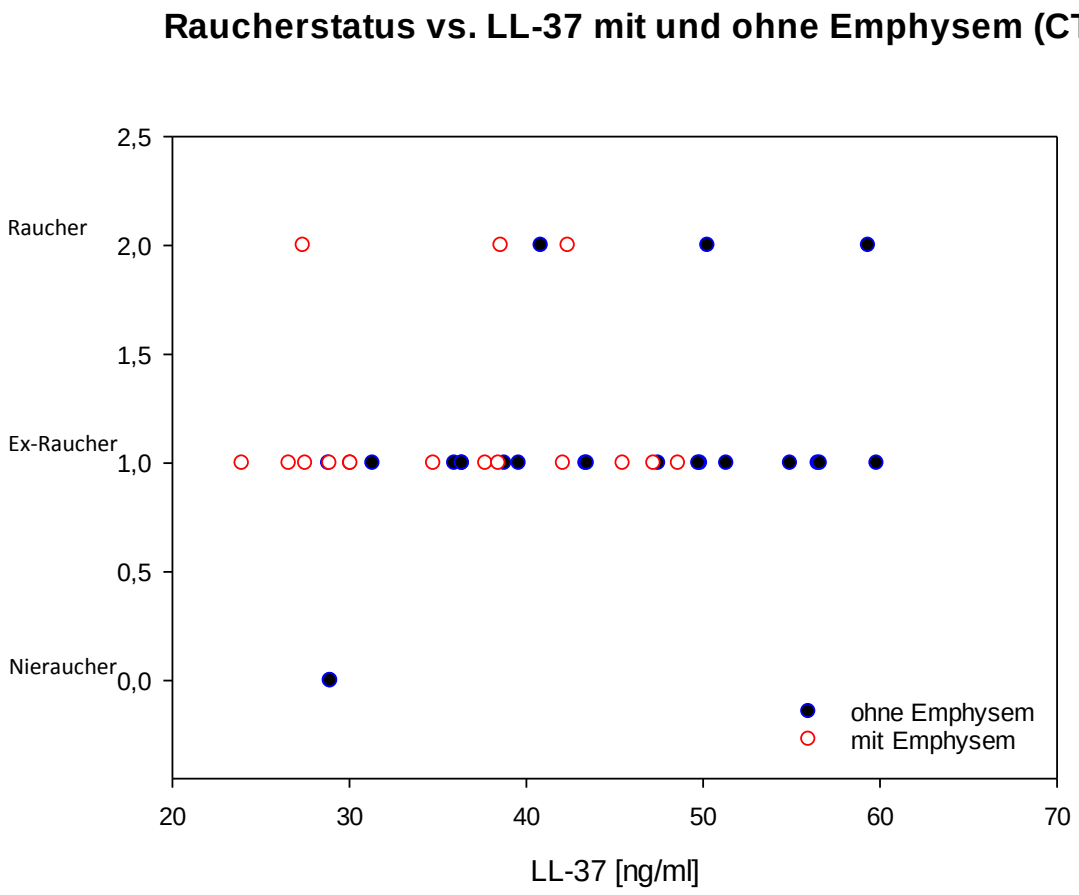


Abb. 4.20: Beziehung des Raucherstatus zu LL-37 in Patienten mit und ohne CT-morphologisches Emphysem

4.8.5 Emphysemscore, Diffusionskapazität und Ganzkörperplethysmographie

In bivariaten Analysen war der vorhergesagte Emphysemscore mit der Diffusionskapazität und der Differenz TLC-VA assoziiert. Da diese beiden Parameter ebenfalls miteinander in Beziehung stehen, wurden sie in einer logostischen Regression als Prädiktoren des vorhergesagten Emphysemscores in der Gesamtgruppe der Patienten verwendet. Sowohl TLCO in % vom Sollwert ($p<0,001$) als auch die Differenz TLC-VA ($p=0,002$) erwiesen sich als signifikante Prädiktoren eines Emphysems. Zwar waren beide Prädiktoren miteinander korreliert (Abb. 4.21), jedoch war die Korrelation nicht so stark, dass sie ihr Auftreten als unabhängige Prädiktoren verhindert hätte.

4.8.6 Zusammenfassende Analyse des Emphysemscores

Um den relativen Stellenwert der möglichen Prädiktoren des Emphysems vergleichend festzustellen, erfolgte eine logistische Regressionsanalyse mit den fünf Prädiktoren, die jeweils repräsentativ für eine bestimmte Klasse von Messgrößen standen. Dies waren AGEs, T/S Ratio, Altersdifferenz, BMI und die Differenz TLC-VA. Hierbei verblieben n=106 Patienten mit vollständigen Daten. Es fand sich ein signifikanter Zusammenhang des vorhergesagten Emphysemscores mit der Differenz TLC-VA ($p<0,001$) sowie der anhand der Gesichtshaut geschätzten Differenz zwischen geschätztem und tatsächlichem Alter ($p=0,024$). Der Tendenz nach verblieb auch der BMI noch als Prädiktor ($p=0,08$), während T/S Ratio und AGEs weit von einer Signifikanz entfernt blieben. Auch wenn die Differenz TLC-VA nicht direkt Eingang in den vorhergesagten Emphysemscore fand, stellte sich die Frage inwieweit die interne Korrelation der Lungenfunktionsparameter das Ergebnis beeinflusste, da sowohl TLC als auch TLCO in dem Vorhersagescore verwendet worden war.

Aus diesem Grund erfolgte eine weitere Analyse in der die Differenz TLC-VA als Prädiktor weggelassen wurde. Hierbei verblieben die Altersdifferenz ($p=0,002$) sowie der BMI ($p=0,010$) als signifikante Prädiktoren, während T/S Ratio und AGEs nach wie vor nicht signifikant waren. Wenn man ebenfalls die Telomerenlänge als Prädiktor eliminierte oder die AGEs, änderte sich an diesem Bild nichts.

Diese beiden Messgrößen wurden daher in der folgenden Analyse weggelassen, mit der der relative Wert der Lungenfunktion gegenüber BMI und Altersdifferenz bestimmt werden sollte. Hierbei zeigten sich die Differenz TLC-VA ($p<0,001$) und die Altersdifferenz ($p=0,032$) als signifikante Prädiktoren, und gleichzeitig der BMI als der Tendenz nach signifikant

(p=0,069). Diese Beziehungen zum Emphysemscore sind in Abb. 4.22 illustriert. Sie waren in der Untergruppe der Patienten mit vorliegendem CT aufgrund der geringeren Fallzahl nur noch der Tendenz nach zu sehen.

4.8.7 COPD-Klassen und Alterungsmarker

Alle Patienten mit COPD

Die Einteilung in die GOLD-Klassen war zumindest in der Gesamtgruppe signifikant mit der Vorhersage eines Emphysems korreliert. Entsprechend fand sich in der logistischen Regression ein Zusammenhang zwischen den GOLD-Klassen (dichotom 0-2 vs. 3-4) und der Differenz zwischen geschätztem und tatsächlichem Alter (p=0,025), jedoch nicht mit der T/S Ratio. Wenn man als Prädiktoren die Altersdifferenz und den BMI verwendete, ergab sich für die Altersdifferenz ein grenzwertiger Zusammenhang (p=0,061) hingegen kein Zusammenhang mit dem BMI. Da diese Analysen denjenigen mit dem (vorausgesagten) Emphysemscore weitgehend parallel liefen und keinen offensichtlichen Informationsgewinn brachten, wurde im Folgenden die Untergruppe der Patienten ohne vorhergesagtes Emphysem (n=66 mit vollständigem Datensatz) separat analysiert.

Wenn man in der logistischen Regression die Altersdifferenz und die T/S Ratio, alternativ die Altersdifferenz und den BMI zu der dichotomen COPD-Klassifikation in Beziehung setzte, fanden sich keinerlei statistisch signifikante Zusammenhänge. Dies war auch der Fall, wenn die Altersdifferenz als alleiniger Prädiktor verwendet wurde. Die Ergebnisse der Korrelation mit den COPD-Klassen deuten an, dass die Zusammenhänge mit den verschiedenen Markern in der Hauptsache durch das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein eines (vorhergesagten) Emphysems bedingt waren und weniger durch die COPD-Klassifikation als solche.

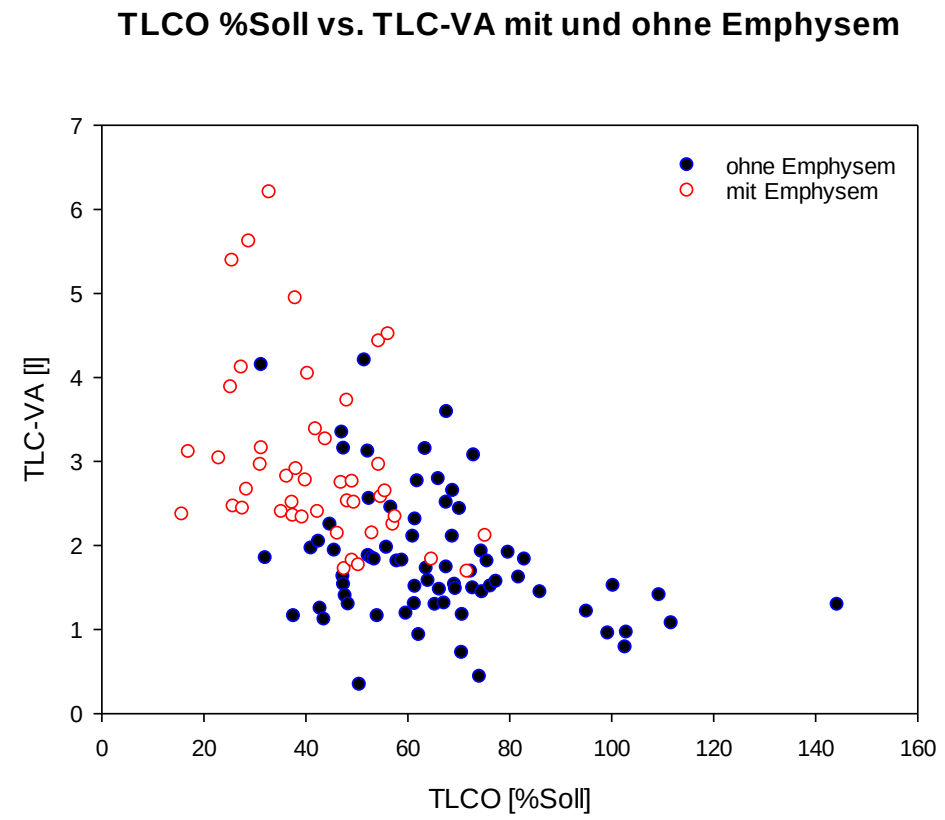


Abb. 4.21: Beziehung der Differenz TLC minus VA zur TLCO %Soll in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem

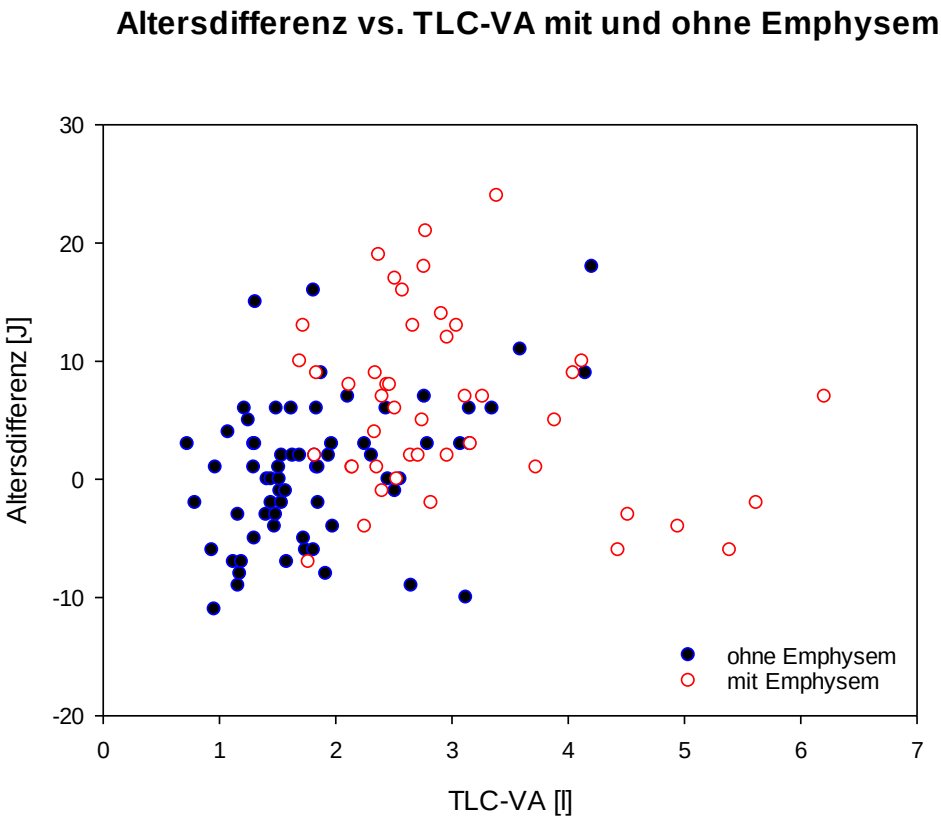


Abb. 4.22: Beziehung der Altersdifferenz zur Differenz TLC minus VA in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem

Patienten mit COPD GOLD 3 oder 4

Andererseits fanden sich keine signifikanten Beziehungen zum vorhergesagten Emphysemscore mehr, wenn die Analyse auf Patienten der GOLD-Stadien 3 und 4 eingeschränkt wurde. Dies war der Fall, wenn die Altersdifferenz und T/S Ratio simultan analysiert wurden und ebenfalls, wenn Altersdifferenz und BMI simultan analysiert wurden (Abb. 4.23; vergleiche Abb. 4.19); in letzterem Falle fand sich für den BMI noch ein grenzwertiger Unterschied zwischen Patienten mit und ohne vorhergesagtem Emphysem (p=0,053). In diesem Ergebnis spiegelte sich die Tatsache, dass ein vorhergesagtes Emphysem hauptsächlich in den höheren COPD-Klassen auftrat und innerhalb dieser Klassen mit den zur Verfügung stehenden Fallzahlen keine weitere Differenzierung mehr möglich war.

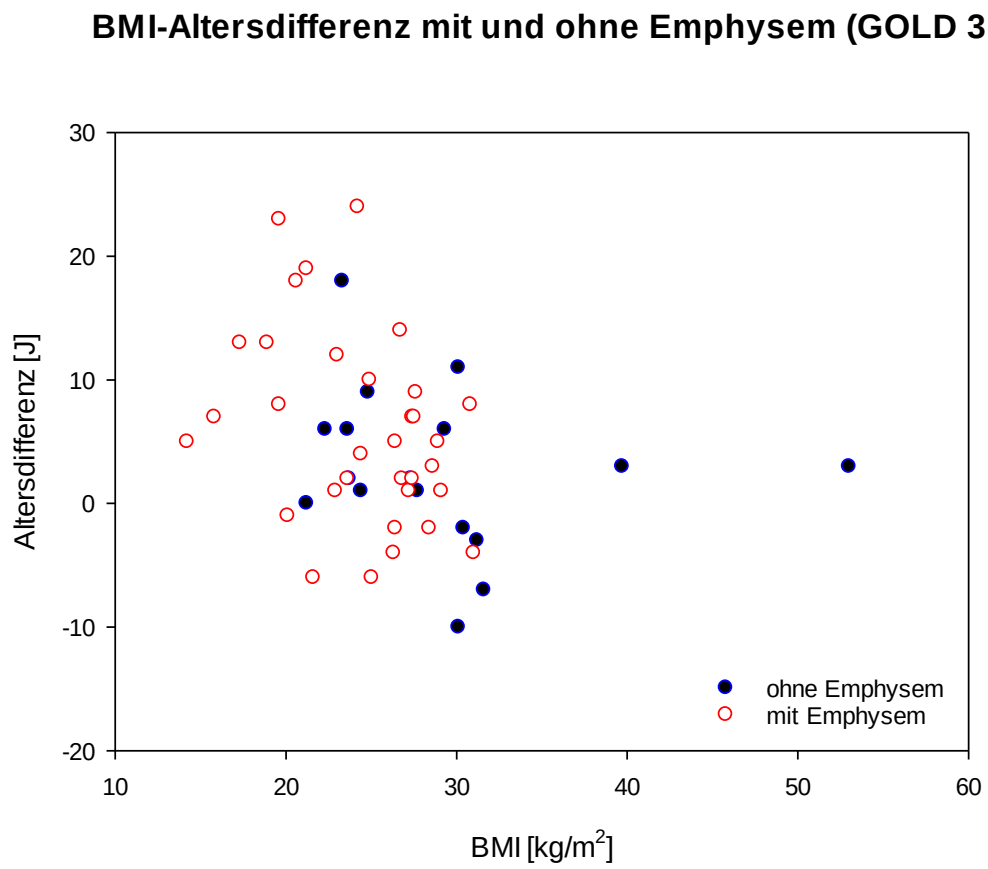


Abb. 4.23: Beziehung der Altersdifferenz zum BMI bei schwergradigen COPD-Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem

4.8.8 Komorbiditäten versus biologische Alterungsmarker

Ausgewertet wurden die Komorbiditäten der Krampfadern, des Diabetes und der Gicht. Die anderen Komorbiditäten wurden nicht multivariat analysiert, da die Beziehungen sehr schwach oder nicht existent waren und/oder die Fallzahlen für eine sinnvolle Analyse zu gering.

Krampfadern

Da die Komorbidität „Krampfadern“ sowohl mit der Telomerenlänge als auch der AGE-Konzentration korreliert war (siehe Kap. 4.6), wurden die beiden letztgenannten Parameter in einer logistischen Regression als Prädiktoren dieser Komorbidität analysiert. Hierbei ergab sich nach wie vor ein signifikanter Zusammenhang mit der T/S Ratio (p=0,022), jedoch war die Korrelation mit den AGEs nur noch grenzwertig signifikant (p=0,052).

Ebenso waren die Telomeren mit der Komorbidität der Krampfadern und dem Knöchel-Arm-Index (ABI) korreliert (siehe Kap. 4.6.1), jedoch nicht der ABI mit den Krampfadern. Um zu eruieren, ob hier gegenläufige Einflüsse am Werk waren, erfolgte eine logistische Regressionsanalyse mit Krampfadern als Outcome und ABI und Telomeren als Prädiktoren. Hierbei ergab sich, dass nach wie vor die Telomerenlänge mit dem Auftreten von Krampfadern assoziiert war (p=0,034), hingegen keinerlei statistische Signifikanz für den ABI vorlag.

Diabetes

Als nächstes wurde die anamnestische Angabe eines Diabetes analysiert. Zur Prüfung der Datenkonsistenz wurde Diabetes zu den Laborwerten von HbA1c und dem Glucosespiegel in Beziehung gesetzt. Hierbei ergab sich ein signifikanter Zusammenhang mit beiden Messgrößen (p<0,001 bzw. p=0,013). Ersetzte man HbA1c durch die umfassendere Kategorie der AGEs, so blieb der Glucosespiegel signifikant korreliert (p<0,001), während die AGEs nicht mehr signifikant mit dem Diabetes zusammenhingen.

Da die Komorbidität „Diabetes“ in den bivariaten Analysen mit den AGEs sowie verschiedenen Indikatoren einer Polyneuropathie zusammenhing, erfolgte auch hier eine simultane logistische Regressionsanalyse. Wenn man AGEs und das Ergebnis der Stimmgabeltestung als Prädiktoren verwendete, verblieben beide als statistisch signifikante Variablen (p=0,041 bzw. p=0,017). In analoger Weise waren AGEs und

Nervenleitgeschwindigkeit signifikant (p=0,045 bzw. p=0,007) mit einem Diabetes assoziiert (Abb. 4.24). Analysierte man AGEs, Stimmgabel-Resultat und Nervenleitgeschwindigkeit gleichzeitig, so verblieben AGEs (p=0,048) und Nervenleitgeschwindigkeit (p=0,042) als signifikante Prädiktoren, während das Ergebnis des Stimmgabel-Tests entfiel. Unabhängig von den pathophysiologischen Zusammenhängen zwischen AGEs und Polyneuropathie (siehe Diskussion Kap. 5.2.5) belegen diese Ergebnisse, dass es sich bei Nervenleitgeschwindigkeit und AGEs um statistisch unabhängige Prädiktoren handelt. Wenn man die AGEs durch HbA1c ersetzte, ergab sich ein ähnliches Bild, in dem Nervenleitgeschwindigkeit (p=0,036) und HbA1c (p=0,019) als unabhängige Prädiktoren verblieben.

Gicht

Als weitere Komorbidität von systemischer Bedeutung, die mit Telomerenlänge und AGEs assoziiert war (siehe Kap. 4.6), wurde die Angabe von Gicht identifiziert. Wenn das Vorhandensein einer Gicht in einer logistischen Regressionsanalyse als Funktion dieser beiden Variablen analysiert wurde, ergab sich nur noch die T/S Ratio als signifikanter Prädiktor (p=0,015), während die AGEs entfielen. Die T/S Ratio verblieb auch als signifikanter Prädiktor (p=0,030), wenn das Alter als zusätzliche Vorhersagevariable eingeführt wurde. Das Auftreten einer Gicht ist bekanntlich mit dem Harnsäurespiegel im Blut assoziiert. Obwohl bei den Patienten mit der Komorbidität „Gicht“ die Harnsäurewerte überwiegend im Normbereich lagen (Median=6,2, Max.=11,0), fand sich bei der simultanen Analyse von T/S Ratio, AGEs und Harnsäure neben dem hochsignifikanten Zusammenhang mit dem Harnsäurespiegel (p=0,004) immer noch ein signifikanter Zusammenhang mit der T/S Ratio (p=0,041; Abb. 4.25).

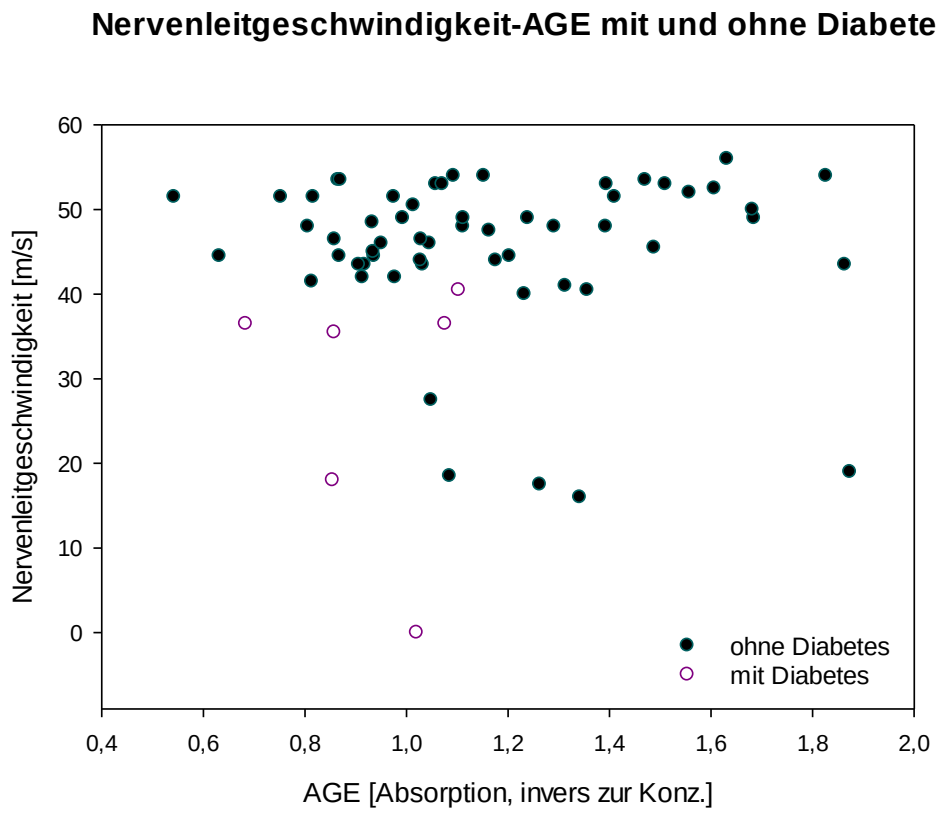


Abb. 4.24: Beziehung der Nervenleitgeschwindigkeit zu AGEs in Patienten mit und ohne Diabetes

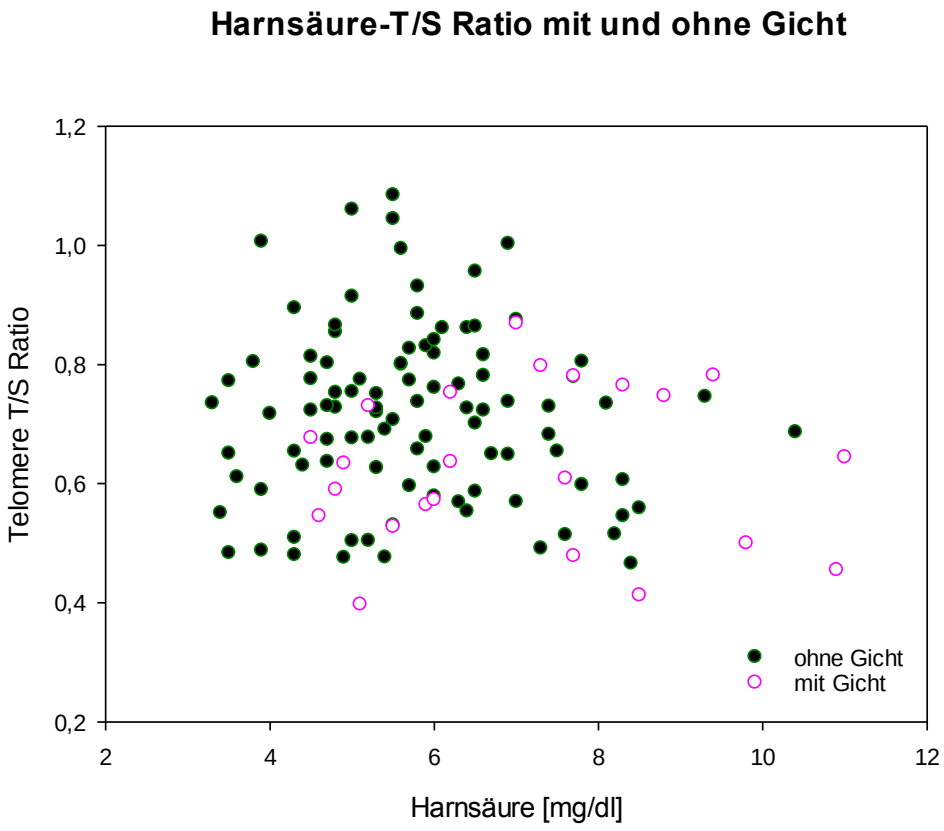


Abb. 4.25: Beziehung des Harnsäurespiegels im Blut zu der T/S Ratio in Patienten mit und ohne Gicht

Die Korrelationsanalysen ergaben vielfache Zusammenhänge zwischen den verschiedenen biologischen und klinischen Markern. Eine zusammenfassende Darstellung der Beziehungen zwischen den Alterungsmarkern findet sich in Tabelle 4.10. Der Zusammenhang der Alterungsmarker sowie des Emphysemscores mit ausgewählten klinischen Charakteristika der Patienten ist in Tabelle 4.11. dargestellt. In Tab. 4.12 sind Beziehungen ausgewählter Parameter zu den COPD-Stadien dargestellt.

4.9 Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel

In dem untersuchten Studienkollektiv von n=127 Patienten befanden sich n=8 Patienten mit der anamnestischen Angabe eines Alpha-1-Antitrypsinmangels (3 Männer/5 Frauen; Alter 63±11 Jahre; FEV_1 %Soll (SD) 52±22%; TLCO %Soll 40±15%; GOLD 1 n=1, GOLD 2 n=4, GOLD 4 n=3). Dieser relativ hohe Anteil ist darauf zurückzuführen, dass in der Endphase der Rekrutierung seitens der Studienzentrale in Marburg speziell der Einschluss dieser Patienten forciert bzw. gefördert wurde. Während für die nationale Gesamtkohorte auf diese Weise n=161 Patienten eingeschlossen werden konnten, war die Anzahl in den einzelnen Studienzentren verständlicherweise nur klein. Umso erstaunlicher ist es, dass auch mit den 8 Patienten dieses Kollektivs sich signifikante Zusammenhänge entweder ergaben oder zumindest andeuteten. Da die funktionellen Charakteristika von Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel vielfach untersucht sind, interessierte hier primär der Zusammenhang mit den untersuchten Alterungsmarkern.

<u>Lungenfunktionscharakteristika</u>

Die Auftragung von TLCO %Soll vs. FEV_1 %Soll zeigte zum einen, dass die Patienten überwiegend einen größeren Schweregrad der Erkrankung gemäß des FEV_1 aufwiesen und zugleich bei gegebenem FEV_1 eine schlechtere Diffusionskapazität (Abb. 4.26). Eine Kovarianz-Analyse (ANCOVA) mit TLCO %Soll als abhängiger Variabler, Alpha-1-Antitrypsinmangel als kategorialer Variabler und FEV_1 %Soll als Kovariate ergab, dass eine signifikante Beziehung zwischen FEV_1 %Soll und TLCO %Soll bestand ($p<0,001$). Der Unterschied der Steigungen ($p=0,710$) zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant, jedoch war das Niveau der beiden Regressionsgeraden signifikant unterschiedlich ($p=0,034$). Dies belegte, dass Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel tatsächlich eine relativ stärkere Einschränkung der Diffusionskapazität aufwiesen.

Diese Beobachtung schien mit der Annahme eines vermehrten Auftretens von Emphysem vereinbar. Da nur drei Patienten ein CT des Thorax vorliegen hatten, wurde zur Beantwortung dieser Frage der vorhergesagte Emphysemscore (Kap. 3.6) herangezogen. Während unter den Patienten ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel 42 von 115 auswertbaren Patienten einen positiven Emphysemscore zeigten, traf dies bei Alpha-1-Antitrypsinmangel auf 6 von 7 auswertbaren Patienten zu (Unterschied zwischen den Gruppen: p=0,029). Zwar ist einschränkend zu bemerken, dass Funktionsparameter, darunter TLCO %Soll, den vorausgesagten Emphysemscore determinierten und insofern diese Analyse sich im Rahmen der Lungenfunktion bewegt, doch sind die genannten Ergebnisse mit der Annahme eines vermehrten Vorkommens von Lungenemphysem völlig vereinbar.

Alterungsmarker

Keine Beziehungen fanden sich zwischen den AGEs sowie LL-37 und dem Vorhandensein eines Alpha-1-Antitrypsinmangels. Im Gegensatz dazu ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Telomerenlänge (p=0,0409) beim Vergleich der Gruppen (Abb. 4.7F und 4.27). Zugleich bestand im direkten Gruppenvergleich kein statistisch signifikanter (p=0,120) Unterschied der Altersdifferenz (Abb. 4.27), jedoch ein tendenzieller Zusammenhang mit den PO- bzw. NL-Falten oder ihrer Summe (p=0,082 bzw. p=0,099 bzw. p=0,066). Abbildung 4.27 legt eine Kovarianz-Analyse der Altersdifferenz versus Telomeren nahe, da zumindest der Tendenz nach eine Beziehung zwischen beiden bestand (Kap. 4.6.1), jedoch fand sich bei dieser Wahl der Kovariaten kein signifikanter Unterschied der Altersdifferenz zwischen Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel.

Führte man jedoch als Kovariate zum Zwecke der Reduktion der Streuung TLCO %Soll ein, da dieser Parameter signifikant mit der Altersdifferenz korreliert war (Kap. 4.6.4), so ergab sich zum einen eine Bestätigung des signifikanten Zusammenhangs zwischen Altersdifferenz und TLCO %Soll (p=0,003; Abb. 4.28), ohne Unterschied der Steigung zwischen den Gruppen (p=0,863). Vor allem jedoch ergab sich nach dieser Adjustierung ein signifikanter Unterschied der Altersdifferenz zwischen den Gruppen mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel (p=0,029). Ein ähnliches, wenngleich weniger ausgeprägtes Ergebnis fand sich, wenn als Kovariate FEV_1 %Soll gewählt wurde. Mit der Kovariaten TLCO %Soll ergab sich ein völlig analoges Ergebnis auch für die Faltensumme. Die Korrelation zwischen Faltensumme und TLCO %Soll war mit p<0,001 hochsignifikant und zugleich war die Faltensumme zwischen

den Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel verschieden (p=0,003) in dem Sinne, dass die Erstgenannten kleinere Werte für die Faltensumme aufwiesen.

Versuchte man, durch eine logistische Regressionsanalyse den relativen Stellenwert der Prädiktoren TLCO %Soll, Altersdifferenz und T/S Ratio in Hinsicht auf Alpha-1-Antitrypsinmangel zu bestimmen, so verblieb die TLCO %Soll als dominanter Prädiktor (p=0,007), während die T/S Ratio (p=0,065) und die Altersdifferenz (p=0,053) nur noch an der Grenze der Signifikanz lagen. Bedenkt man die Einschränkung durch die kleine Fallzahl, so erscheint dennoch die Annahme gerechtfertigt, dass T/S Ratio und Altersdifferenz beide in unabhängiger Weise bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel gegenüber den Kontrollpatienten verändert war.

Die beschriebenen Befunde verdeutlichen, dass die anhand der Gesichtshaut bestimmte Altersdifferenz sowie Faltensumme bei gleichem Schweregrad der Diffusionsstörung bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel geringer ausfielen als bei Patienten ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel, d.h. diese Patienten zeigten keine Anzeichen einer vorzeitigen Hautalterung in Verbindung mit ihrer Erkrankung. Entsprechend verbesserte sich die bereits beschriebene (Kap. 4.7.3) Beziehung zwischen vorhergesagtem Emphysemscore und Altersdifferenz über den bereits gefundenen hochsignifikanten Zusammenhang hinaus, wenn die Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel weggelassen wurden. Den genannten Ergebnissen korrespondierte das Resultat einer logistischen Regressionsanalyse des vorhergesagten Emphysemscores auf Altersdifferenz und Alpha-1-Antitrypsinmangel als Prädiktoren. Hierbei fand sich neben der Beziehung zwischen Alpha-1-Antitrypsinmangel und Emphysemscore (p=0,007) auch diejenige zur Altersdifferenz (p<0,001).

TLCO %Soll vs. FEV_1 %Soll mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel

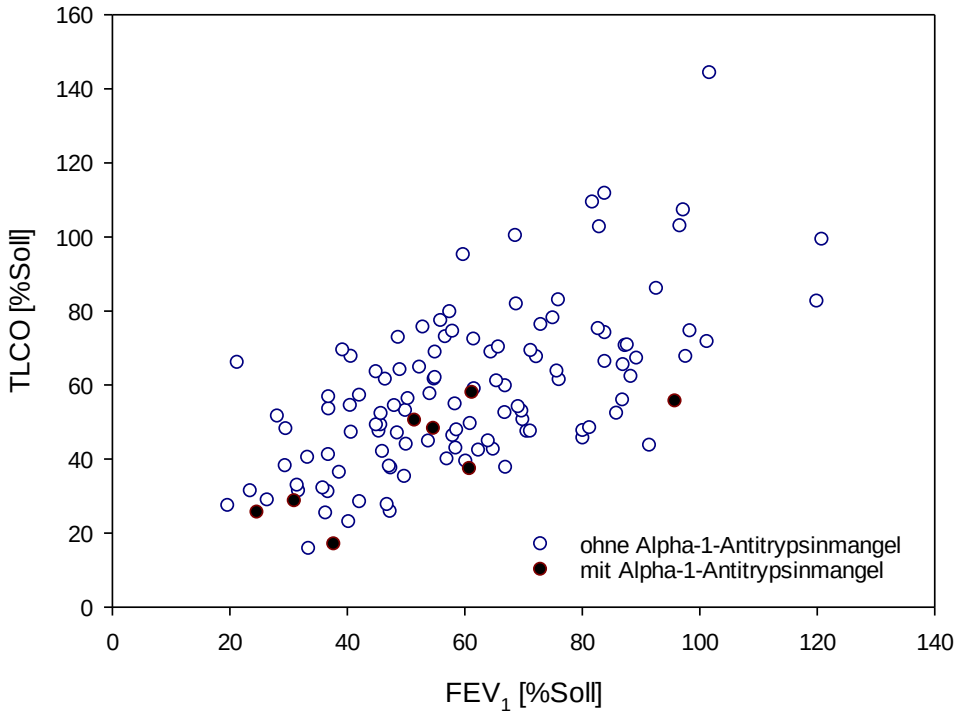


Abb. 4.26: Beziehung der TLCO %Soll zum FEV1 %Soll in Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel

Altersdifferenz vs. T/S Ratio mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel

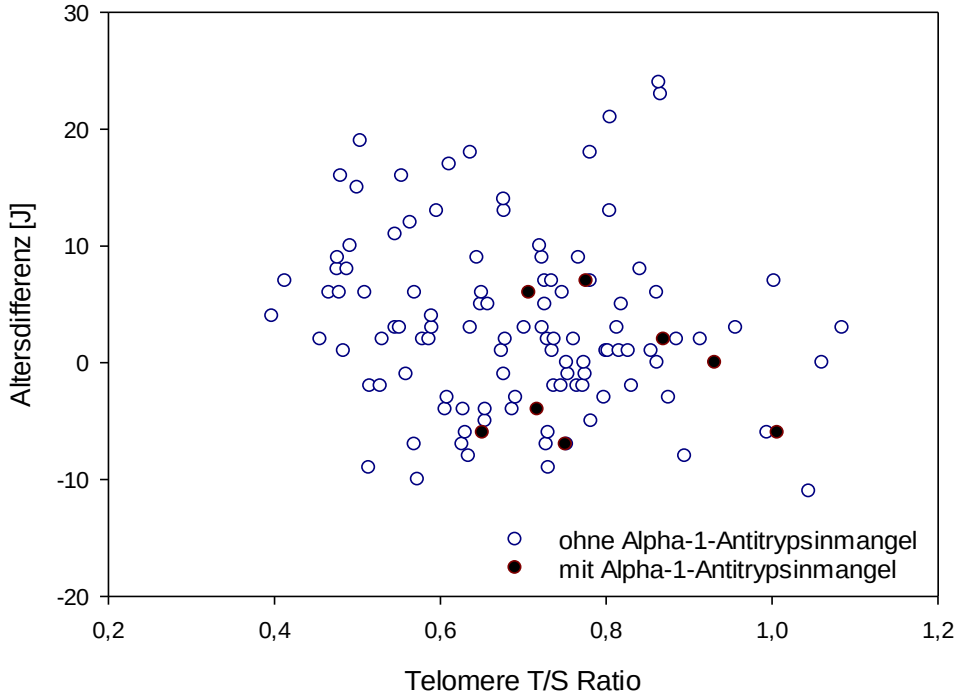


Abb. 4.27: Beziehung der Altersdifferenz zur T/S Ratio in Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel

Altersdifferenz vs. TLCO %Soll mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel

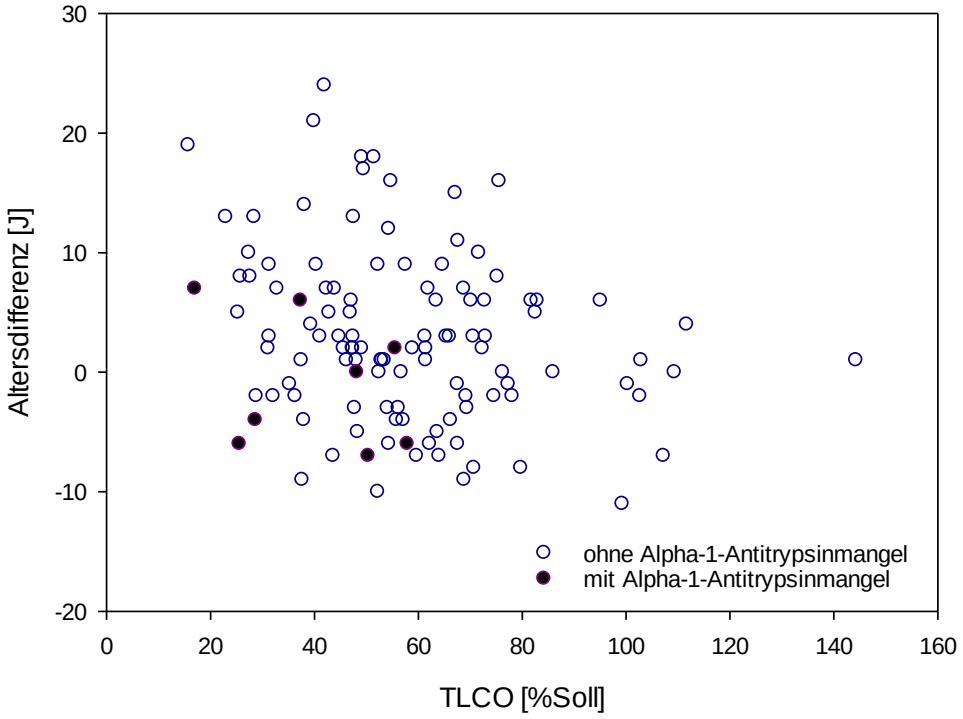


Abb. 4.28: Beziehung der Altersdifferenz zur TLCO %Soll in Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel

4.10 Zusammenfassende Tabellen

Tab. 4.10: Zusammenfassende Darstellung der Korrelationen der verschiedenen Alterungsmarker miteinander

	T/S Ratio	AGE	LL-37	Alters-differenz	NL-Falten	PO-Falten	Falten-summe
T/S Ratio	n.d.	-	-	+	**	*	***
AGE		n.d.	-	-	-	-	+
LL-37			n.d.	*	*	-	-
Δ Alter				n.d.	**	***	***
NL-Falten					n.d.	***	n.d.
PO-Falten						n.d.	n.d.
Faltensum.							n.d.

n.d. =nicht durchgeführt, da entweder trivial oder nicht sinnvoll, da die Variablen ineinander enthalten waren; +=p≤0,10; *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001

Tab. 4.11: Zusammenfassende Darstellung der Korrelationen der Alterungsmarker mit ausgewählten klinischen Charakteristika

	T/S Ratio	AGE	LL-37	Alters-differenz	NL-Falten	PO-Falten	Falten-summe	Emph.-Score
Alter	***	-	+	n.d.	***	*	***	-
Diabetes	-	*	-	-	-	-	-	-
Krampf-adern	*	**	-	-	-	-	-	-
Raucher-anamn.§	-	-	***	-	*	*	*	*
BODE-Score	-	-	-	*	*	-	-	***
BMI	-	-	**	*	-	-	-	***
TLCO %Soll	-	-	-	*	*	-	**	***
Emph.-Score$	-	-	(**)	***	+	-	+	n.d.

n.d. =nicht durchgeführt, da entweder trivial oder nicht sinnvoll, da die Variablen ineinander enthalten waren; +=p≤0,10; *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001; §=Raucherstatus oder Pack-Years; $=vorhergesagter Score mit Ausnahme von ()=nur in der Untergruppe der Patienten mit vorliegendem CT

Tab. 4.12: Zusammenfassende Darstellung der Korrelationen der GOLD-Stadien mit ausgewählten Patientencharakteristika

	COPD GOLD-Stadium (gegebenenfalls zusammengefasst)
Tatsächliches Alter	-
T/S Ratio	-
AGE	*
LL-37	-
TLCO %Soll	***
sRtot	***
ITGV %Soll	***
BMI	*
6MWD	**
T&go	*
ABI	-
BODE-Score	***
Altersdifferenz	**
Faltensumme	-
Leukozyten	-
Lymphozyten	***
Segmentierte Granulozyten	***
CRP	+
Emphysemscore$	***

+=p≤0,10; *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001; $=vorhergesagter Score

4.11 Ergebnisse der Elektronischen Nase

Auswertbare Messungen mit der Elektronischen Nase Cyranose® 320 lagen bei bis zu 64 Patienten vor. Die Daten wurden in dieser explorativen Analyse primär auf der Basis der 32 einzelnen Sensorsignale ausgewertet. Eine Faktorenanalyse, wie sie in den vorangegangenen Arbeiten [101, 103] erfolgt war, wurde in dieser Arbeit nicht angewendet, da sie keine stabilen, gut interpretierbaren Ergebnisse erbrachte. Die Auswertung erfolgte mittels sequenzieller multivariater Regressionsanalysen der Einzelsensoren gegen einzelne Bedingungen. Die Komorbiditäten Diabetes und Herzerkrankungen, die Gegenstand der vorherigen Arbeiten waren, wurden nicht erneut ausgewertet, da die Fallzahlen zu gering waren. Als unabhängige Variable wurden gemäß der Fragestellung dieser Arbeit die Marker der biologischen Alterung herangezogen. Aufgrund der insgesamt begrenzten Fallzahl und der starken Korrelation zwischen den Sensorsignalen erfolgten die Analysen nur in dem Sinne, Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zu erhalten.

Tabelle 4.13 zeigt, welche der 32 Sensoren für bestimmte Bedingungen einen signifikanten Zusammenhang ergaben. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der vielfachen Tests und der Kolinearitäten die p-Werte mit Vorsicht zu betrachten sind. Unter den Alterungsmarkern fanden sich Korrelationen einzelner Sensoren mit LL-37, den AGEs, der T/S Ratio und dem Summenscore der Hautfalten. Keine Korrelation bestand mit der Altersdifferenz (geschätztes minus tatsächliches Alter). Verglich man die signifikanten Sensoren zwischen diesen Markern, so fanden sich praktisch keine Überlappungen, die auf ein konsistentes Bild hingedeutet hätten. Zusätzlich zeigten der BMI, der vorhergesagte Emphysemscore sowie das Ergebnis des Rydel-Seiffer-Stimmgabeltests eine Reihe signifikant korrelierter Sensoren. Hierbei traten die meisten Sensoren bei dem Emphysemscore auf, eine Überlappung mit den Sensoren, die für die Alterungsmarker signifikant waren, fand sich jedoch nur für zwei Sensoren (S8 und S9). Diese Beobachtungen sowie die Daten weitergehender Analysen deuten darauf hin, dass das untersuchte Patientenkollektiv im Vergleich zu den vorher untersuchten Kollektiven, bei denen die Elektronische Nase klare Ergebnisse erbracht hatte, zu heterogen war, um zu robusten Befunden zu gelangen.

Tab. 4.13: Signifikanzen der Cyranose® 320 mit verschiedenen Alterungsmarkern bzw. klinischen Parametern

Sensor	LL-37	AGE	T/S	Falten-summe	BMI	Emphysem-score	Rydel-Seiffer Stimmgabel
	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05	p≤0,05
n	37	38	35	55	64	36	47
S1							
S2							
S3							
S4							
S5							X
S6						X	X
S7							
S8				X		X	
S9			X	X	X	X	
S10							
S11		X					
S12			X				X
S13			X				
S14		X				X	
S15							
S16	X				X		
S17							
S18							
S19						X	
S20							
S21			X				
S22		X				X	
S23							X
S24						X	X
S25							
S26							
S27						X	
S28							
S29							
S30							
S31							
S32							

5 Diskussion

Die vorliegende Analyse erfolgte im Rahmen der COSYCONET-Kohortenstudie an der Subpopulation der Patienten mit COPD, die im Klinikum Innenstadt der LMU untersucht wurde. Hierbei wurden umfangreiche Daten gemäß dem Studienprotokoll von COSYCONET erhoben; diese Daten dienten als Referenz für die weitergehenden Analysen, die der Hauptgegenstand dieser Arbeit waren. Zum einen wurden als -etablierte oder potentielle- biologische Alterungsmarker die Telomerenlänge von Blutleukozyten sowie die Konzentrationen von Advanced Glycation End Products (AGE) und des Peptids LL-37 im Blut bestimmt. Zum anderen wurden phänomenologische Alterungsmarker auf der Basis von Fotos des Gesichts erhoben, die unter standardisierten Bedingungen bei den Probanden erstellt wurden. Darüber hinaus wurden die ungeklärte Frage der Häufigkeit und Ausprägung von Polyneuropathien bei den Patienten mit COPD und ihre Beziehung zu den Alterungsmarkern untersucht. Als weiterer potentieller Marker sowohl von Komorbiditäten als auch von Alterung wurden die Profile volatiler Kohlenwasserstoffe (VOC) in der Ausatemluft mit Hilfe einer Elektronischen Nase erfasst.

Die 127 in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten wiesen Schwergrade der COPD zwischen den GOLD-Klassen 0 und 4 auf. Ihre Charakteristika in Hinsicht auf anthropometrische Indices, Lungenfunktion, körperliche Leistungsfähigkeit und andere funktionelle Charakteristika sowie Parametern des klinischen Labors entsprachen den Werten, die man typischerweise bei derartigen Patienten beobachtet (siehe Kap. 4.1.1,2,3 und 4.5).

Die Telomerenlänge korrelierte zwar nicht mit den COPD-Stadien, wohl aber mit semiquantitativen Indices der Hautalterung. Die Advanced Glycation End Products (AGEs) wiesen ebenfalls eine, wenn auch schwächere Beziehung zur Hautalterung auf. Ferner korrelierten sie mit dem COPD-Stadium. Parameter der Hautalterung wiesen zumindest der Tendenz nach eine Beziehung auf zum Vorhandensein eines Emphysems, das aus CT-Aufnahmen erschlossen wurde, die bei den Patienten aus den verschiedensten klinischen Gründen erstellt worden waren. Wenn keine CT-Aufnahme vorlag, wurde ein, aus Lungenfunktionsgrößen errechneter Vorhersagescore für ein Emphysem verwendet, der für die gesamte COSYCONET-Kohorte entwickelt worden war. Die verschiedenen Alterungsmarker waren nicht mit den Parametern der Polyneuropathie oder anderen

Komorbiditäten korreliert, mit der Ausnahme des Vorliegens von Krampfadern. Letzteres war signifikant mit Telomerenlänge sowie AGE-Konzentration assoziiert.

Die Prüfung der erhobenen Parameter gegeneinander sowie gegen Komorbiditäten und Funktionsgrößen ergab, dass die Parameter im Rahmen der statistischen Sicherheit, die mit maximal n=127 Probanden erreichbar war, ein konsistentes Bild zeigten. Die Ergebnisse dieser Studie legen vor allem nahe, dass phänomenologische Alterungsmarker, die anhand der Hautbeschaffenheit des Gesichtes relativ leicht erhoben werden können, eine Beziehung zu molekularbiologischen bzw. biochemischen Alterungsmarkern aufweisen. Erstaunlicherweise war ihre Beziehung zu einem Lungenemphysem stärker als die der biologischen Marker, wenngleich nicht so stark, dass eine verlässliche Vorhersage im Einzelfall möglich wäre.

5.1 Vergleich der Patientencharakteristika mit bekannten Daten

Die kennzeichnenden Größen der COSYCONET-Subkohorte der LMU München wiesen im Wesentlichen die Veränderungen auf, die aus unzähligen anderen Studien bei Patienten mit COPD bekannt sind. Im Gegensatz zu vielen Studien waren in der vorliegenden Population auch Patienten des (früheren) COPD-Schweregrades 0 eingeschlossen, d.h. Patienten, die gemessen an dem Kriterium eines Tiffeneau-Wertes von 0,7 noch eine normale Lungenfunktion aufwiesen, jedoch Symptome einer chronischen Bronchitis berichteten. Allerdings handelte es sich hierbei nur um 6 Patienten (Tab. 4.1). Die Altersverteilung mit Werten zwischen 65 und 70 Jahren entsprach ebenfalls derjenigen vieler COPD-Kohorten. Der Verteilung der Schweregrade korrespondierten entsprechende Unterschiede der Lungenfunktion über das die GOLD-Klassen definierende FEV_1 hinaus: So fanden sich signifikante Unterschiede in TLCO %Soll, ITGV %Soll und dem spezifischen Atemwegswiderstand sRtot. Ferner bestanden die bekannten Unterschiede der 6-Minuten-Gehstrecke (6MWD), denen Unterschiede im Timed-Up and Go-Test (T&go) entsprachen. Da die GOLD-Stadien sich ebenfalls hinsichtlich der Funktion wie auch des BMI signifikant unterschieden, ist nicht verwunderlich, dass der BODE-Score, als zusammenfassende Größe aus BMI, Lungenfunktion, Gehstrecke und mMRC-Fragebogen, ebenfalls Unterschiede aufwies. Zusätzlich fanden sich Unterschiede in den Laborparametern wie der Zahl der Lymphozyten und Granulozyten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen den genannten Standard-Messgrößen nicht näher analysiert, da sie einesteils weitgehend bekannt sind und anderenteils komplexere Analysen, schon wegen der erforderlichen Fallzahlen, dem Gesamtdatensatz von COSYCONET vorbehalten sind. Die Arbeit fokussierte auf die im Methodenteil und dem nachfolgenden Ergebnisteil dargestellten Alterungsmarker, seien diese molekularer (T/S Ratio), biochemischer (AGE, LL-37) oder phänomenologischer Natur (Hautalterung des Gesichtes). Darüber hinaus wurde die Frage der Polyneuropathie mit verschiedenen, klinisch praktikablen Methoden angegangen, da unklar war, inwieweit Änderungen der peripheren Nervenfunktion bei Patienten mit COPD vorkommen und evtl. in Beziehung zu Alterungsprozessen stehen.

5.2 Ergebnisse der Alterungsmarker

Der Zusammenhang zwischen den Alterungsmarkern ist in Tabelle 4.10 zusammenfassend dargestellt. Es deutet sich an, dass die Marker der Hautalterung, d.h. die Altersdifferenz, die NL-Falten, PO-Falten und folglich auch der Summenscore miteinander zusammenhängen sowie in einer Beziehung zu T/S Ratio stehen. Hingegen korrelieren die AGEs und LL-37 nicht oder nur schwächer mit den Indices der Hautalterung. Daher scheint es, dass sie eine eigenständige und unabhängige Information tragen. Dies konnte durch Hauptkomponenten-analysen bestätigt werden, in denen neben T/S Ratio, AGEs, LL-37 und der Altersdifferenz entweder NL- und PO-Falten oder deren Summe mitgeführt wurden. In jedem Fall ergaben sich zwei Hauptkomponenten, von denen die eine primäre den Indices der Hautalterung und der T/S Ratio zuzuordnen war, die andere hingegen, die einen wesentlich kleineren Teil der Varianz erklärte, im Wesentlichen den AGEs und LL-37 zuzuordnen waren.

Es ist eine gängige klinische Erfahrung, dass Raucher, vor allem Patienten mit COPD, oft den Eindruck erwecken älter zu sein, als sie tatsächlich sind [108]. Daran knüpft sich die Frage, ob bei diesen Patienten eine Diskrepanz zwischen tatsächlichem Alter und biologischem Alter vorliegt. Bei Patienten mit COPD ist diese Frage bereits seit einer Reihe von Jahren untersucht [35]. Hierbei zeigte sich, dass Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem Zeichen einer vorzeitigen Alterung aufwiesen. Dieses äußerte sich in kultivierten Lungenfibroblasten dieser Patienten in einer reduzierten Proliferationsrate und Anzahl maximaler Teilungen sowie einer vermehrten Anfärbung für den Seneszenz-Marker ß-

Galactosidase [109-111]. Auch an anderen Zellen als Fibroblasten [112] konnten solche Veränderungen nachvollzogen werden, teilweise auch in Zellkultur-Modellen mit Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt.

Da das Emphysem beim Menschen i.d.R. erst nach langjährigem Zigarettenrauchen auftritt (Ausnahme Alpha-1-Antitrypsinmangel), stellt sich die Frage, inwieweit auch das Lebensalter per se eine Rolle spielt; so wäre denkbar, dass das Regenerationsvermögen mit dem Alter abnimmt. Die zu dieser Frage vorliegenden Tierversuchs-Daten deuten zumindest teilweise in die Richtung, dass das Lebensalter eine untergeordnete Rolle spielt im Gegensatz zu der Länge der Belastung [113]. Die lokale Alterung im Zuge eines Krankheitsprozesses kann auch an anderen Organen beobachtet werden, beispielsweise liegen Daten im Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen [114] und Nierenerkrankungen vor [115, 116]. Interessanterweise kann dieser Alterungsprozess beispielsweise durch Advanced Glycation End Products (AGEs, siehe Kap. 5.2.1) vermittels des entsprechenden Rezeptors (RAGE) verstärkt werden [117]. Inwieweit die Alterung einzelner Organe mit einer generellen biologischen Alterung verbunden ist, ist derzeit unklar und sicher von vielen Einflussfaktoren abhängig. Bemerkenswert ist, dass einige Marker der systemischen Entzündung, die bei Erkrankungen wie COPD diskutiert werden [118], von Gerontologen als Alterungsmarker betrachtet werden [119]. Bei induzierter Alterung stellt sich darüber hinaus die Frage, inwieweit die Alterung verschiedener Organe durch eine systemische Alterung vermittelt wird oder einfach durch den gemeinsamen Einfluss einer Noxe wie zum Beispiel Zigarettenrauch. Immerhin gibt es neben den bekannten Assoziationen zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und COPD beispielsweise auch Daten über eine schwache Assoziation mit Nierenerkrankungen [120-122].

5.2.1 Assoziationen mit den AGEs im Serum

Die Veränderung der AGE-Konzentration bei Patienten mit Diabetes ist gut bekannt [123] und war in den vorliegenden Daten nachzuvollziehen. Wie zu erwarten, zeigten die AGE-Werte auch einen Zusammenhang mit der Konzentration von HbA1c (Kap. 4.6.2) sowie dem aktuellen Blutglucosespiegel. Unabhängig von der Frage, inwieweit die AGEs als Alterungsmarker brauchbar sind, und ungeachtet der technischen Probleme, die dazu führten, dass von den AGE-Werten nur relative (inverse) Konzentrationen angegeben werden konnten, hingegen keine Absolutwerte (siehe Kap. 3.4.4), belegen diese

Beobachtungen, dass die genannten Werte hinreichend korrekt gemessen wurden. Indirekt bestätigen sie auch die Korrektheit der anamnestischen Angabe eines Diabetes, die in der vorliegenden Studie nicht mit Hilfe klinischer Tests verifiziert werden konnte. Die Korrektheit dieser Angabe äußerte sich auch darin, dass von den 20 Patienten mit angegebenem Diabetes (Tab. 4.4) 18 Patienten entsprechende Medikamente einnahmen (Tab. 4.5) und von den Patienten ohne Diabetes-Anamnese niemand.

Außerhalb pneumologischer Fragestellungen sind AGEs immer wieder im Zusammenhang mit der Funktion als potentielle Alterungsmarker untersucht worden, vor allem bei Diabetes und neurologischen Erkrankungen (siehe Kap. 1.3). Wenn auch die AGEs in der vorliegenden Studie nicht oder nur grenzwertig mit den anderen Alterungsmarkern korrelierten (Tab. 4.10), so fand sich doch ein signifikanter Zusammenhang mit den (zusammengefassten) COPD-Stadien (Tab. 4.12 sowie Kap. 4.4). Für das Blut liegen derzeit nur wenige publizierte Daten zu AGEs oder ihren Rezeptoren (RAGE) vor. In einer Querschnittsstudie mit Patienten aus COPDGene fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CT-morphologischen Ausprägungen eines Emphysems und der Konzentration der löslichen RAGEs (sRAGE), deren Konzentration mit zunehmendem Emphysem abfiel. Wenn man die AGEs im Plasma in verschiedene Fraktionen zerlegte, trat ein komplexer, teils gegenläufiger Zusammenhang mit dem Bestehen einer COPD zutage [124]. Die Rezeptoren für AGEs (RAGE) wurden verschiedentlich gemessen und bei Patienten mit COPD verändert gefunden [125, 126], auch in Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion [127]. Allerdings scheint es klar, dass es sich hierbei weniger um einen Alterungsmarker als um einen Entzündungsmarker handelt [125].

AGEs selber, die eher Alterungsmarker darstellen dürften, wurden weniger untersucht. In der Haut wurde bei Patienten mit COPD eine vermehrte Konzentration mittels Fluoreszenz nachgewiesen [128]. In einer anderen Arbeit allerdings war die Konzentration von AGEs in der Haut negativ mit dem Auftreten einer COPD korreliert [124]. Ferner wurden bei Patienten mit COPD vermehrt AGEs in Proben der Atemwege sowie der Alveolarwände nachgewiesen, und diese Anfärbungen korrelierten mit den Einschränkungen in FEV_1 [58]. Die vorliegenden Daten gehen eher mit der Annahme konform, dass eine stärkere Ausprägung der COPD mit höheren Konzentrationen der AGEs auch im Plasma einhergeht. Insgesamt jedoch waren die Assoziationen verschiedenen Parameter mit der AGE-

Konzentration schwach, sodass fraglich erscheint, ob die Messung von AGEs im Blut einen wesentlichen Informationsgewinn bei der COPD bringt.

Unerklärlich ist derzeit auf der Basis der vorliegenden Literaturdaten die Beobachtung, dass bei Patienten mit der anamnestischen Angabe von Krampfadern die AGE-Werte erhöht waren. Im Prinzip erscheint dies nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass Krampfadern mit dem Lebensalter korreliert sein sollten. Im vorliegenden Kollektiv bestand dieser Zusammenhang nicht. Sofern das Auftreten von Krampfadern mit veränderten venösen Druckverhältnissen einhergeht, ist ein Zusammenhang von biologischer Alterung bzw. zellulärer Seneszenz und Krampfadern denkbar [129, 130]. Auch für Gefäßerkrankungen in Zusammenhang mit Diabetes ist eine Assoziation mit dem Prozess der Glykation von Proteinen belegt [131], allerdings unterscheiden sich die Effekte je nach Protein und Zelltyp und der Zusammenhang mit Krampfadern ist allenfalls indirekt. Ferner fand sich in den vorliegenden Daten auch kein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und AGEs (Kap. 4.6.2), obwohl in der Literatur ein solcher Zusammenhang beschrieben wurde [53, 132, 133].

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die direkte Messung der AGEs, um einen Eindruck über das Ausmaß der internen Belastung durch Hyperglykämie, vor allem aber durch oxidativen Stress zu gewinnen, der üblicherweise mit der Entstehung einer COPD in Verbindung gebracht wird [35, 134]. Sehr viel üblicher in der Literatur ist die Messung von entweder gewebeständigen (RAGE) oder löslichen (sRAGE) Rezeptoren für AGEs. Diese vermitteln vielfältige entzündliche Antworten [135], deren Rolle vor allem bei kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang mit Diabetes untersucht wurde [136-139]. Da hierbei die regulatorische Antwort in Relation zu spezifischen Erkrankungen und weniger ein allgemeiner Alterungsprozess zu dominieren scheint, zogen wir die Messung von AGEs vor. Dies galt auch gegenüber der Alternative der Messung von Pentosidin, die eine der Komponenten der AGEs darstellt. Die Beziehung zwischen der Menge der vorhandenen AGEs und der Expression und Aktivität der RAGEs ist Gegenstand derzeitiger Forschung und nur ungenügend verstanden.

5.2.2 Assoziationen mit LL-37 im Plasma

LL-37 ist ein antimikrobielles Peptid (Cathelicidin, 37 Aminosäuren), das hauptsächlich wegen seiner bakteriziden Effekte und seiner Rolle in der Regulation von Entzündung erforscht worden ist [140]. Störungen des Haushaltes von LL-37 wurden bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen berichtet, so auch bei Asthma, exogen-allergischer Alveolitis sowie Psoriasis [141]. In der Tat ist nicht nur Asthma eine Komorbidität von COPD, die in dem vorliegenden Kollektiv von immerhin fast 23 Prozent der Patienten angegeben wurde (Tab. 4.4), sondern auch Psoriasis [142]. Die Rolle von LL-37 bei der COPD, wurde in verschiedenen Arbeiten diskutiert [143, 144]. Andererseits wurde LL-37 als Alterungsmarker vorgeschlagen, wie in der Einleitung dargestellt [49]. Neuere Daten legen jedoch nahe, dass zumindest beim „gesunden Altern“ der Haushalt von LL-37 und ß-Defensin-2 nicht beeinträchtigt ist [145]. Somit verbleibt LL-37 eher als Marker eines induzierten Alterns, das in Zusammenhang mit Krankheitsprozessen beschleunigt abläuft. Zellbiologische und biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivität von LL-37 durch Rauchen verändert wird [146], jedoch sind kaum diesbezügliche Daten zu LL-37 im Blut verfügbar. Die Assoziation von LL-37 mit verschiedenen Erkrankungsmarkern ist in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Von besonderer Bedeutung ist die Fähigkeit von LL-37, Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien zu neutralisieren. Eine spekulative Erklärung für die Beobachtung, dass in der vorliegenden Studie LL-37 bei Rauchern erhöht war (Abb. 4.11C), wäre die Annahme, dass das im Zigarettenrauch bekanntlich vorhanden LPS zu einer generellen Aufregulation von LL-37 führt.

Ebenfalls beobachtet wurde in der vorliegenden Studie ein Zusammenhang zwischen LL-37 und BMI (Abb. 4.16F) sowie Bauchumfang. Auch hier liegen kaum Daten aus der Literatur vor, zumindest jedoch wurde ein positiver Zusammenhang zwischen BMI sowie anderen Indikatoren eines Übergewichtes und der mRNA-Expression von LL-37 in Leukozyten des peripheren Blutes von Patienten gezeigt, die auf kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht wurden [147]. Der Zusammenhang war geringfügig unterschiedlich für Männer und Frauen; mit der zur Verfügung stehenden Fallzahl ließ sich in der vorliegenden Studie kein diesbezüglicher Unterschied erkennen.

Als weiterer Befund trat in den Daten dieser Studie ein statistisch robuster Zusammenhang zwischen LL-37 und dem CT-Score zutage, der bei Patienten bestimmt worden war anhand von CT-Aufnahmen, die aus verschiedensten klinischen Indikationen erfolgt waren (Abb. 4.11D). Interessanterweise war dieser Zusammenhang anhand des vorhergesagten Emphysem-Scores, der bei nahezu allen Patienten vorlag, in keiner Weise erkennbar. Daher stellt sich die Frage nach Faktoren, die mit der Klassifikation des vorhergesagten Emphysem-Scores interferierten. Mit den vorliegenden Daten war diese multivariate Fragestellung nicht beantwortbar. Immerhin ließ sich bei den Patienten mit vorhandenem CT visualisieren, dass Rauchen und Emphysem mit gegenläufigen Änderungen des Spiegels von LL-37 verbunden waren (Abb. 4.20). Rauchen ging mit einer Erhöhung, Emphysem mit einer Erniedrigung von LL-37 einher.

Die Korrelationen von LL-37 mit anderen Alterungsmarkern waren nur gering ausgeprägt. Immerhin fanden sich zwar schwache, aber statistisch signifikante Beziehungen zu dem Schweregrad des NL-Faltenscores sowie der Altersdifferenz, die aus den Fotos des Gesichtes geschätzt worden waren. Allerdings war die Beziehung negativ in dem Sinne, dass eine stärker ausgeprägte Hautalterung mit einem geringeren Wert von LL-37 einherging. Da die vermehrte Hautalterung mit einer stärkeren Tendenz zum Emphysem verbunden war (Kap. 4.7.3) und LL-37, wie oben beschrieben, im Gegensatz zu Rauchen negativ mit dem Emphysemscore verbunden war, treten auch hier die gegenläufigen Effekte verschiedener statistischer Einflussfaktoren zutage. Rauchen war nämlich, sofern es als Faktor isoliert betrachtet wurde, plausibler Weise ebenfalls mit einer Erhöhung der Emphysemwahrscheinlichkeit assoziiert (Tab. 4.11, Kap. 4.6.5), obwohl man aus den LL-37-Daten eher das Gegenteil erwartet hätte (vgl. Abb. 4.11C und D).

Als Zwischenfazit lässt sich konstatieren, dass die Beziehungen zwischen den biochemischen Alterungsmarkern und den klinischen Charakteristika der Patienten im Allgemeinen schwach waren und teilweise paradox bzw. gegenläufig verliefen. Dies lässt Zweifel daran aufkommen, ob LL-37, wie andernorts vorgeschlagen [49], ein brauchbarer Marker für den biologischen Alterungsprozess bei Patienten mit COPD darstellt.

5.2.3 Assoziationen der Telomerenlänge von Blutleukozyten

Methode und Literaturdaten

Die Länge der Telomeren gilt seit langem als ein Marker des biologischen Alters bzw. der zellulären Seneszenz [35, 148] und wird auch bei der COPD diskutiert [34, 149]. Störungen des Telomerenerhalts, vor allem durch genetische Defizienzen, sind mit diversen Krankheitsbildern assoziiert, die von Lungenfibrose bis Anämie reichen können [150-152].

Die Bestimmung der Telomerenlänge ist durch moderne PCR-Methoden wesentlich weniger aufwendig geworden als mit den klassischen Immunoblots (Telomere Restriction Fragment Length, TRFL) [109]. Auch unter den PCR-Methoden gibt es verschiedene Versionen, die entweder relative oder absolute Längenbestimmungen erlauben [97, 98, 153]. In dieser Arbeit wurde zunächst die attraktiv erscheinende absolute Längenbestimmung nach Referenz [153] verfolgt. Allerdings ließ sich trotz Rückfrage beim Autor mit der Methode der absoluten Längenbestimmung kein reproduzierbares, glaubwürdiges Messprotokoll etablieren. Ferner sei bemerkt, dass diese Methode seit der Erstpublikation im Jahr 2008 in der Literatur wenig Anklang fand. Aus diesem Grunde wurde die relative Telomerenbestimmung gewählt, deren Etablierung allerdings ebenfalls die Überwindung einer Reihe von Hürden erforderte, die im Methodenteil (Kap. 3.4.1) beschrieben sind, und eine beträchtliche Zeit in Anspruch nahm. Dass die Bestimmung der Telomerenlänge ein nicht triviales Unterfangen ist, ist auch in der Literatur dokumentiert [154].

Als Ergebnis resultierte ein detailliertes Protokoll, das kein offenbares Verbesserungspotential mehr besaß (siehe Kap. 3.4.2) und plausible, hinlänglich reproduzierbare Werte lieferte. Ungeachtet dessen war die Streuung der Telomerenlängenbestimmung nach wie vor groß. Diese Tatsache ist auch aus anderen Studien bekannt und einer der wesentlichen Gründe, warum oft sehr große Kollektive erforderlich waren, um signifikante Beziehungen zu extrahieren [155]. Dies trifft insbesondere für den Fall zu, dass die Studienpopulation heterogen ist, beispielsweise aufgrund von Komorbiditäten, die ihrerseits mit der Telomerenlänge korreliert sein können.

Die Telomerenlänge ist in verschiedenen Gewebetypen des Organismus verschieden und diese wiederum von derjenigen von Blutleukozyten [156]. Ferner gibt es auch zwischen verschiedenen Typen von Leukozyten, beispielsweise Granulozyten und Lymphozyten, systematische Unterschiede [157], allerdings scheinen die Veränderungen in verschiedenen Zelltypen bzw. Geweben zumindest im Mittel parallel zu verlaufen. Es ist aus den genannten Gründen einerseits schwierig, ein Gewebe zu identifizieren, das repräsentativ für den

biologischen Alterungsprozess des Gesamtorganismus ist. Andererseits würde die Entnahme von Gewebeproben aus einzelnen Organen i.d.R. invasive Prozeduren erfordern und damit für einen klinischen Breiteneinsatz ungeeignet sein. Die Gesamtstudie COSYCONET ebenso wie die zusätzlichen Untersuchungen an der Teilkohorte der LMU München waren jedoch vom Ansatz her von dem Gedanken geleitet, nur solche Probennahmen-Prozeduren und Messabläufe einzuschließen, die entweder bereits etabliert sind oder von denen man sich zumindest vorstellen konnte, dass sie in der Breite etabliert werden könnten. Als Fazit dieser Überlegungen fiel die Entscheidung darauf, die relative Telomerenlänge in Blutleukozyten ohne weitere Fraktionierung zu bestimmen, wie dies bereits in einer Vielzahl anderer Studien erfolgt ist.

Unter der Annahme, dass chronische Erkrankungen mit vermehrtem oxidativem Stress einhergehen oder mit einer vorzeitigen Alterung des Gesamtorganismus oder einzelner Organe, ist die Telomerenlänge in vielen Studien als Kenngröße gemessen worden [158]. Bereits vor Jahren wurde gezeigt, dass die Telomerenlänge von Blutleukozyten mit der Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist, auch wenn man nach Geschlecht und Altersklassen differenziert. Ferner zeigten sich Zusammenhänge bei Patienten mit Herz-Kreislauferkrankungen, die in späteren Studien bestätigt wurden [159, 160]; sogar Zusammenhänge mit dem Ansprechen auf eine Therapie wurden berichtet [160]. Die Beziehung zwischen Telomerenlänge und Risikofaktoren ist ebenfalls Gegenstand vieler Studien gewesen. So fand sich eine inverse Beziehung zwischen Bauchumfang und Telomerenlänge [161], eine parallele Beziehung zwischen körperlicher Aktivität und Telomerenlänge [162], sowie eine inverse Beziehung zwischen chronischem psychischem Stress und Telomerenlänge [163]. Allerdings wird das Bild dadurch kompliziert, dass zwar in einer Querschnittsanalyse signifikante Beziehungen beispielsweise zwischen Rauchen, Körpergewicht sowie physischer Aktivität und Telomerenlänge auftraten, jedoch diese Messgrößen nicht mit Änderungen der Telomerenlänge im Verlauf von 10 Jahren korreliert waren [164]. Dies ist mit der Annahme kompatibel, dass frühzeitig erworbene oder erbliche Faktoren einen gewissen Einfluss auf die Telomerenlänge ausüben. Beispielsweise wurde berichtet, dass gesunde Nachkommen von Patienten mit früheinsetzender koronarer Herzerkrankung im Mittel kürzere Telomeren aufwiesen als diejenigen von Kontrollpersonen [165].

Es ist denkbar, dass die bloße Tatsache eines langjährigen Zigarettenrauchens bereits genügt, um sich in einer im Mittel kürzeren Telomerenlänge von Blutleukozyten niederzuschlagen. In der Tat konnte an kleinen Kollektiven gezeigt werden, dass Raucher kürzere Telomeren aufweisen als Nichtraucher unabhängig von dem Vorliegen einer Atemwegsobstruktion [166]. Entsprechend zeigten Patienten mit COPD, die i.d.R. Raucher oder Ex-Raucher waren, kürzere Telomeren als altersangepasste gesunde Kontrollpersonen; diese Beziehung war offenbar im Wesentlichen auf das Rauchen zurückzuführen [36]. Zusätzlich fand sich bei Patienten mit COPD eine geringere Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD), die zu der Annahme passen würde, dass Telomeren vor allem auch durch oxidativen Stress verkürzt werden können.

Zu oxidativem Stress als kausalem Faktor passt die Beobachtung, dass Telomeren vor allem bei Rauchern im Vergleich zu Ex-Rauchern und Nierauchern verkürzt sind [167]. In einer anderen Studie fand sich allerdings keine Abhängigkeit vom Rauchstatus, jedoch zeigten verglichen mit altersangepassten Kontrollpersonen Patienten mit COPD über alle Altersklassen kürzere Telomeren; ferner war die Telomerenlänge invers mit verschiedenen Entzündungsmarkern im Blut korreliert [168]. In einer weiteren Arbeit, die nur Raucher umfasste, fand sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Telomerenlänge und Atemwegsobstruktion bei Patienten mit bzw. ohne COPD; keine Beziehung bestand zum Vorliegen eines Emphysems [169]. Gemäß diesen Beobachtungen ist es nicht überraschend, dass auch die Mortalität innerhalb einer Population von Patienten mit leichter bis mittelschwerer COPD mit der Telomerenlänge assoziiert war, wobei auch hier der Rauchstatus eine untergeordnete Rolle spielte [170].

Diese Daten belegen einen Zusammenhang zwischen COPD sowie Rauchen und der Telomerenlänge von Blutleukozyten. Ihre teilweise Inkonsistenz dürfte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass in den meisten Fällen die Studienpopulationen relativ klein, zuweilen deutlich unter n=100, lagen und die Telomerenlänge als summarischer biologischer Marker, dessen Messung zugleich mit einer gewissen Variabilität behaftet ist, i.d.R. relativ große Populationen erfordert, wenn verschiedene Faktoren in ihrem Einfluss getrennt werden sollen. Diese Variabilität führte dazu, dass beispielsweise in einer neueren Metaanalyse [155] zwar signifikante Beziehungen zwischen Asthma, COPD sowie Lungenfunktion und der Telomerenlänge gefunden werden konnten, dies jedoch nur aufgrund einer Datenbasis von mehreren zehntausend Probanden bzw. Patienten gelang.

Eigene Befunde

Aus den genannten Gründen war es keineswegs selbstverständlich, dass man in der LMU-Kohorte von COSYCONET signifikante Beziehungen identifizieren werden könne. Dies war der Grund, weshalb viel Energie und Zeit in die Optimierung der Telomeren-Analyse investiert wurde, um wenigstens von der methodologischen Seite aus die Streuung so gering wie nur möglich zu halten. Gemittelt über alle Patienten stand die Telomerenlänge nicht in Beziehung zu den AGEs und LL-37 (Tab. 4.10). Zu diesem Bild passte auch, dass AGEs gar nicht und LL-37 nur schwach mit Parametern der Hautalterung korrelierten, während die Telomerenlänge sowohl mit den NL- als auch den PO-Falten und ihrer Summe assoziiert war und der Tendenz nach auch mit der Altersdifferenz (geschätztes minus tatsächliches Alter) (Tab. 4.10).

In diesem Sinne war die Telomerenlänge als molekularer Marker enger mit den rein phänomenologischen Markern der Haut verbunden als mit den biochemischen Markern AGE und LL-37. Diese Korrelation dürfte allerdings wesentlich über das Lebensalter vermittelt sein, denn wie in anderen Studien [36, 155, 166, 168] fand sich eine hochsignifikante Korrelation mit dem Alter (Tab. 4.11). Die in dieser Studie verwendeten PO- und NL-Faltenscores waren absolute Scores und daher nicht altersstandardisiert; daher ist eine Korrelation mit den Telomeren über das Alter zu erwarten. Im Gegensatz dazu ist die Altersdifferenz per definitionem für das Lebensalter normiert. Die Beobachtung, dass die Altersdifferenz zumindest tendenziell mit der Telomerenlänge von Blutleukozyten korrelierte, spricht für eine genuine Beziehung zwischen beiden Alterungsmarkern. Gleichwohl war der Informationsgehalt des Parameters „Telomerenlänge“ in dem relativ kleinen untersuchten Kollektiv von COPD-Patienten begrenzt und aufgrund der Vielzahl der durchgeführten Analysen der Gefahr falsch positiver Antworten ausgesetzt.

Die Telomerenlänge korrelierte mit dem Auftreten von Krampfadern (siehe Tab. 4.11). Über einen direkten Zusammenhang zwischen beiden Entitäten scheint aus der Literatur nichts bekannt. Es liegt nahe, das Alter als gemeinsamen, vermittelnden Faktor anzunehmen, zumal die T/S-Ratio mit dem Alter korrelierte.

In dem untersuchten Kollektiv bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Krampfadern und dem Lebensalter. Das Argument des eingeschränkten Altersbereichs ist nur begrenzt gültig, denn es gilt ja in gleichem Maße für die Telomerenlänge. Für das

Auftreten von Krampfadern sind verschiedene Risikofaktoren beschrieben, darunter das Auftreten von (venösem) Bluthochdruck [130]. In dem hier untersuchten Kollektiv bestand allerdings kein signifikanter (p=0,323) Zusammenhang zwischen den anamnestischen Angaben von Bluthochdruck und Krampfadern. Die Angabe von Bluthochdruck war insofern verlässlich, als die Patienten mit und ohne diese Angabe Unterschiede zumindest in dem systolischem Blutdruck (p=0,020) zeigten. Im diastolischen Blutdruck bestand kein Unterschied, jedoch lagen die medianen Werte im Normbereich (70 bzw. 71 mmHg). Dennoch war der Zusammenhang zwischen Telomerenlänge und Gefäßstatus insofern konsistent, als auch eine, zwar schwache, aber signifikante Korrelation zum Knöchel-Arm-Index (ABI) bestand (Abb. 4.8F). Auf der anderen Seite war der ABI nicht signifikant (p=0,779) zwischen Patienten mit und ohne Krampfadern verschieden. In einer simultanen Analyse von Telomerenlänge und ABI in Relation zu Krampfadern bestätigten sich diese Ergebnisse.

Die Tatsache wiederum, dass eine Assoziation zwischen AGEs und Krampfadern gefunden wurde (siehe Kap. 4.6.2) unterstützt die Annahme, dass die genannten biologischen Alterungsmarker mit dieser Komorbidität verbunden sind, wenngleich auf eine komplexe Weise, weil zugleich die T/S Ratio nicht mit den AGEs korreliert war. Eine logistische Regressionsanalyse (Kap. 4.8.8) unterstützte trotz des numerisch begrenzten Datensatzes die Interpretation, dass T/S Ratio und AGEs unabhängige Prädiktoren der Komorbidität „Krampfadern“ in dem untersuchten Kollektiv waren.

In dem untersuchten Kollektiv von COPD-Patienten fand sich auch eine Assoziation zwischen Telomerenlänge und Hämoglobingehalt, allerdings nicht zum Bestehen einer Anämie. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit populationsbezogenen Daten an Personen des Alters ≥ 85 Jahre, in denen sich die Telomerenlänge zwischen Personen mit und ohne Anämie nicht signifikant voneinander unterschieden [171]. Die in dieser Studie beobachtete Assoziation zwischen Telomerenlänge und der Angabe einer Gicht kann derzeit nicht weiter erklärt werden. Erklärungen über die der Gicht zugrunde liegenden Stoffwechselabnormalitäten sind plausibel, aber für die Telomeren derzeit nicht durch Literaturbefunde belegbar.

Die vorgenannten Ergebnisse belegen, dass die Angabe der Komorbidität „Krampfadern“ in statistisch robuster Weise mit der Telomerenlänge von Blutleukozyten korreliert war, und im Vergleich dazu die Assoziationen mit anderen Parametern gering oder abwesend waren. Möglicherweise ist diese Assoziation, deren Auffinden dem breiten Einschlussspektrum und

der detaillierten Abfrage der Komorbiditäten in dieser Studie zu verdanken war, pathophysiologisch speziell für diese Erkrankung bedeutsam, möglicherweise jedoch spiegelt sie nur einen der multiplen, allgemeinen Zusammenhänge wider, wie sie inzwischen für die Telomerenlänge über ein enormes Spektrum von Erkrankungen gefunden wurden [154].

5.2.4 Parameter der Hautalterung des Gesichts

Unter dem Aspekt einer systemischen biologischen Alterung bietet sich die Untersuchung der Hautbeschaffenheit besonders an, da sie leicht zugänglich ist und auch nichtinvasiv analysiert werden kann. Inzwischen liegt eine Vielzahl von Methoden zur Quantifikation vor allem altersassoziierter Veränderungen der Gesichtshaut sowie der Haut anderer Körperteile vor [76-82]. Neben visuellen Scoring-Systemen, die auch auf Fotos des Gesichtes angewendet werden können, gibt es andere Methoden [172], beispielsweise die Herstellung von Abgüssen, die beleuchtet werden und aus deren Schattenprofil auf die Faltenausprägung zurückgeschlossen werden kann. Darüber hinaus existieren Verfahren, verschiedene altersassoziierte biochemische Produkte, beispielsweise AGEs, in der Haut zu messen. Ergänzt wird die Palette der Verfahren durch invasive Probennahmen, die allerdings in größeren Studien mit Akzeptanzproblemen verbunden sind.

In einer Arbeit aus dem Jahre 2006 wurde bei 145 Probanden, die Raucher oder Ex-Raucher waren und von denen 68 eine COPD aufwiesen, die Beziehung zur Hautalterung des Gesichts mittels eines etablierten visuellen Scoring-Systems (Daniell-Score) untersucht [74]. Hierbei fand sich eine signifikante Beziehung zwischen der Ausprägung der Hautfalten, vor allem im periorbitalen Bereich und dem Auftreten einer COPD sowie dem Ausmaß eines Lungenemphysems. Bemerkenswerterweise wurden nach dem vorliegenden Kenntnisstand diese Beobachtungen bislang nicht reproduziert bzw. als Reproduktionsstudie veröffentlicht, obwohl das verwendete Verfahren im Prinzip einfach anzuwenden ist, sofern erfahrene Beurteiler verfügbar sind.

Ein möglicher vermittelnder Faktor könnte in dem Einfluss von Zigarettenrauch auf die Eigenschaften elastischer Fasern liegen [173], von anderen systemischen Einflüssen abgesehen. Insgesamt liegen für die Beziehung zwischen Hautalterung und altersassoziierten Erkrankungen nur sehr wenige Daten vor, bezeichnenderweise wiederum eine Arbeit, in der eine Beziehung zwischen Hautfalten des Gesichts und Störungen der Nierenfunktion hergestellt wird, die beide als Folge eines oxidativen Stress interpretiert werden [174].

Bei den Patienten der vorliegenden Studie wurde ein möglichst unaufwendiges Dokumentationssystem für die Beschaffenheit der Gesichtshaut gewählt; dies beinhaltete nur zwei Fotos in Schrägansicht mit weitestgehend standardisierter Beleuchtung. Diese Fotos wurden von einer sehr erfahrenen Untersucherin (Prof. Dr. Martina Kerscher) ausgewertet; der Untersucherin standen dabei keinerlei nähere Informationen als das Pseudonym der Patienten zur Verfügung.

Wie aus Tab. 4.10 zu ersehen, zeigten die verschiedenen Scores eine gute bis sehr gute Korrelation miteinander. In den Analysen stellten sich die nasolabialen Falten als den periorbitalen Falten überlegen heraus, indem sich etwas stärkere und konsistentere Beziehungen zu anderen Parametern fanden. Der mit Abstand beste Parameter war die Altersdifferenz, die als Differenz zwischen dem geschätzten Alter und dem tatsächlichen Alter definiert war. Das geschätzte Alter basierte dabei auf dem Gesamteindruck, den die Untersucherin anhand der beiden Fotos gewinnen konnte.

Es fanden sich sowohl Patienten, die jünger geschätzt wurden als sie tatsächlich waren, als auch Patienten, die wesentlich älter geschätzt wurden. Im Mittel waren das geschätzte Alter und das tatsächliche Alter bei den Patienten niedriger COPD-Schweregrade (GOLD 0-2; Kap. 4.3) nicht signifikant voneinander verschieden und die Mittelwerte fast identisch. Da bei Patienten niedrigerer Schweregrade mit einer geringeren Alterung zu rechnen ist, legt dieses Ergebnis nahe, dass die Eichung der Beurteilerin in Hinsicht auf das geschätzte Alter korrekt war. In den höheren COPD-Klassen (GOLD 3-4) bestand ein signifikanter Unterschied zwischen (Kap. 4.3) geschätztem und tatsächlichem Alter von fast 5 Jahren. Dieser Unterschied spiegelte sich auch darin wider, dass die Altersdifferenz mit der COPD-Klassifikation zusammenhing (Tab. 4.12, Kap. 4.3).

Die Vermutung, dass die Parameter der Hautalterung zumindest teilweise mit systemischen Alterungsprozessen zusammenhängen, wurde dadurch bestätigt, dass zumindest NL- und PO-Falten, sowie ihre Summe, signifikant mit der Telomerenlänge assoziiert waren (Tab. 4.10). Keine relevanten Korrelationen bestanden mit den AGEs und nur schwache Korrelationen mit LL-37, was die Altersdifferenz und NL-Falten betraf (Tab. 4.10, Kap. 4.6.3). Wiederum war ein erhöhtes biologisches Alter im Sinne eines erhöhten Hautalters mit einer niedrigeren Konzentration von LL-37 assoziiert. Wie einleitend erwähnt, deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass Haut-Indices und Telomerenlänge auf der einen Seite und

AGEs und LL-37 auf der anderen Seite zwei verschiedene Aspekte des biologischen Alterns beschreiben.

5.2.5 Polyneuropathie

Zur Häufigkeit und Bedeutung einer Polyneuropathie bzw. peripheren Neuropathie bei Patienten mit COPD gibt es ganz unterschiedliche Angaben in der Literatur. So wurden in einer Übersichtstabelle über Polyneuropathie bei COPD aus dem Jahre 2007 Häufigkeiten angegeben, die von 5% aufwärts bis nahezu 100% rangierten; die Autoren selbst fanden in ihrer eigenen Studie eine subklinische periphere Neuropathie bei 5 von 30 Patienten mit COPD [175]. Die Frage nach der Polyneuropathie ist insofern von Interesse, als sie mit dem Schweregrad der Erkrankung und/oder Alter des Patienten korreliert sein könnte. Des Weiteren gibt es Daten dahingehend, dass Patienten mit Polyneuropathie bei gleicher Lungenfunktionseinschränkung eine geringere körperliche Leistungsfähigkeit zeigen als solche ohne Polyneuropathie [24]. Dass eine periphere Neuropathie durch eine vorzeitige Alterung, wie sie bei Patienten mit COPD zu vermuten ist, induziert werden kann, wird durch Daten an einem Mausmodell vorgezogener Alterung nahegelegt [176].

Die Analyse der Polyneuropathie-Daten (Kap. 4.2), die bei max. 74 Patienten vorlagen, ergab eine gute Übereinstimmung zwischen dem klassischen Verfahren der Stimmgabel nach Rydel-Seiffer, der Analyse mittels Monofilament und der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit. Daher kann man von einer Konsistenz dieses Datensatzes ausgehen. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass auch zwischen den Patienten mit und ohne anamnestischer Angabe einer Polyneuropathie statistische Unterschiede bestanden. In den vorliegenden Daten fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Polyneuropathie-Parametern und den COPD-Stadien, ebenso wenig wie mit dem vorausgesagten Emphysemscore. Auch zu anderen Funktionsgrößen der COPD ergaben sich keine signifikanten Beziehungen in dem hier untersuchten, heterogenen Kollektiv von Patienten mit COPD.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich Patienten mit und ohne Diabetes in signifikanter Weise bezüglich aller drei Parameter der Polyneuropathie (Kap. 4.2). Obwohl zwischen AGE-Werten und Diabetes ein Zusammenhang bestand (Kap. 4.6.2), korrelierten die Polyneuropathie-Parameter nicht mit denen der AGEs. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der Stimmgabel-Testung und den AGEs um unabhängige Prädiktoren handelte;

diese Vermutung wurde durch eine entsprechende logistische Regressionsanalyse bestätigt (4.8.8). In analoger Weise stellten sich auch AGEs und Nervenleitgeschwindigkeit als unabhängige Prädiktoren heraus, ebenso wie HbA1c und Nervenleitgeschwindigkeit.

Die Parameter der Polyneuropathie korrelierten ferner nicht mit den Werten von LL-37 und der T/S Ratio, sowie den Faltenscores, der Faltensumme und der Altersdifferenz. Aufgrund dieser Beobachtungen liegt der Schluss nahe, dass eine periphere Neuropathie bei Patienten mit COPD vornehmlich auf bekannte, kausativ wirksame Komorbiditäten wie Diabetes zurückgeht, nicht aber mit dem Schweregrad der COPD oder einem beschleunigten biologischen Alterungsprozess assoziiert ist.

Die erwähnten großen Unterschiede in der Prävalenz einer peripheren Neuropathie bestätigten sich insofern in der vorliegenden Studie, als sich abhängig von der gewählten Definition (anamnestische Angabe, Nervenleitgeschwindigkeit, Stimmgabeltest) Häufigkeiten zwischen ca. 10 und 30% fanden. Dies deutet darauf hin, dass bei der Bewertung von Literaturangaben zur Polyneuropathie die verwendeten Definitionen eine kritische Rolle spielen und keineswegs als äquivalent betrachtet werden können. In der vorliegenden Arbeit ergab sich für keinen der untersuchten Parameter eine Beziehung zu den Markern der biologischen Alterung. Daher kann dieses Ergebnis als relativ robust und unabhängig von einer möglichen Definition von Polyneuropathie angesehen werden.

5.2.6 Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel

Die Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel (n=8) zeigten eine Funktionsänderungen, die mit dem überwiegenden Auftreten eines Emphysems vereinbar waren (Kap. 4.9). Dies äußerte sich in einer relativ zum spirometrischen Schweregrad verringerten Diffusionskapazität und ebenso der vermehrten Vorhersage eines positiven Emphysemscores.

Ein bemerkenswerter Befund war, dass in der Telomerenlänge ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel bestand (Abb. 4.27). Der Befund weniger verkürzter Telomeren geht konform mit einer jüngst veröffentlichten Arbeit, in der ebenfalls die Telomeren von Blutleukozyten bei Patienten mit COPD mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel verglichen wurden [177]. Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass die pathophysiologischen Prozesse, die bei Alpha-1-Antitrypsinmangel zu COPD und Lungenemphysem führen, weniger stark von lokalen oder globalen

Alterungsprozessen begleitet oder fundiert sind als dies bei Patienten ohne Alpha-1-Antitrysinmangel der Fall ist. Worauf dieser Unterschied zurückzuführen ist, muss nach dem derzeitigen Wissen als unklar gelten, zumal auch Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel von oxidativem Stress betroffen sind, der eine der wesentlichen Determinanten der Telomerenlänge darstellt.

Noch bemerkenswerter scheint die Tatsache, dass die Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel auch in einem phänomenologischen Marker wie der Hautalterung wesentlich geringer gealtert erschienen, als die ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel (Abb. 4.28). Dieser Befund war robust in dem Sinne, dass er nicht durch ein vermindertes Auftreten eines Emphysems in dieser Gruppe erklärt werden konnte. Im Gegenteil, ein positiver Emphysemscore wurde diesen Patienten vermehrt zugeschrieben, wodurch die Diskrepanz zu den Patienten ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel erst in vollem Umfang zutage trat. Auch andere mögliche Erklärungsfaktoren trafen nicht zu, vor allem waren diese Patienten nicht statistisch signifikant jünger als die übrigen Patienten.

Die geringe Fallzahl erlaubte es zwar nicht, zweifelsfrei zu entscheiden, ob es sich dabei um unabhängige Variable handelte, jedoch deuteten die Ergebnisse einer entsprechenden logistischen Regressionsanalyse in diese Richtung.

5.2.7 Elektronische Nase

In der gegenwärtigen Studie wurden explorativ mit zwei Verfahren der Elektronischen Nase erhoben. Die Messung mittels Ionen-Mobilitäts-Spektroskopie (Sionex) erfolgte regelhaft, ist aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, da die Analyse der erhaltenen zweidimensionalen Chromatogramme eine eigene Arbeit erfordern würde. Parallel dazu wurde mit einem einfacher auszuwertenden Gerät gemessen, das über ein Array von 32 Polymersensoren verfügte und in zwei vorangegangen Studien positive Ergebnisse erbracht hatte [101, 103]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch auch die Auswertung dieser Daten als wesentlich heterogener und streuungsbehafteter als in den vorangegangenen Arbeiten. Zwar fanden sich eine Reihe von Korrelationen zwischen den Sensorsignalen und verschiedenen Krankheitsbedingungen sowie Biomarkern, doch ließen diese kein konsistentes Bild erkennen und waren aufgrund der starken Korrelation zwischen den Sensorsignalen auch numerisch nicht stabil. Darin äußerte sich vermutlich die Tatsache, dass die vorher untersuchten Kollektive viel homogener waren und sich nur in einer zentralen

Krankheitsbedingung unterschieden, während das hier untersuchte Kollektiv durch die Variation der Schweregrade und die vielen Komorbiditäten sehr viel inhomogener war.

Ein relativ unspezifisch messendes Gerät wie die Cyranose® 320, welches Sensorprofile liefert, jedoch im Allgemeinen keine Aussagen über einzelne Substanzen treffen kann, kommt hier vermutlich an seine Leistungsgrenzen. Das hat insofern Implikationen für einen potentiellen klinischen Einsatz, als derartige Geräte zwar relativ einfach einzusetzen sind, jedoch vermutlich nur an klinisch vorselektiven Kollektiven von Wert sein können.

5.2.8 Synopsis und Wertung der Befunde dieser Studie

Beim Vergleich verschiedener Alterungsmarker in Beziehung auf den Schweregrad der COPD, einen errechneten Emphysemscore, verschiedener Funktionsparameter sowie Komorbiditäten, ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den analysierten Alterungsmarkern. Der putative Marker LL-37, der bei weitem nicht von allen Autoren als Alterungsmarker betrachtet wird, zeigte kein klares Bild in Hinsicht auf die analysierten Zusammenhänge. Die Korrelation mit dem Emphysemscore schien stark von der ausgewählten Gruppe abzuhängen, und die Beziehung zu Rauchstatus und BMI war die am Ehesten plausible Beziehung. Gleichwohl korrelierte LL-37 mit den nasolabialen Falten sowie der aus dem Gesicht geschätzten Altersdifferenz, die als normierter Alterungsmarker zu werten ist.

Ein heterogenes Bild ergab sich ebenfalls für die AGEs, die eher durch Komorbiditäten als durch Alterungsprozesse bedingt schienen. Wenigstens der Tendenz nach korrelierten die AGEs jedoch mit der Faltensumme des Gesichtes, die ebenfalls als Alterungsmarker gelten kann, wenngleich sie eine absolute, nicht auf das Lebensalter normierte Größe darstellt.

Die Telomerenlängen zeigten insofern ein wesentlich konsistenteres Bild, als sie zumindest mit den Faltenscores des Gesichtes und tendenziell der Altersdifferenz zusammenhing. Bei der Analyse der verschiedenen Charakteristika der COPD allerdings schien auch die T/S Ratio keine nennenswerte Zusatzinformation zu enthalten. Dass diese Messung, deren Schwierigkeit auch in der Literatur angemerkt wird, in der vorliegenden Studie valide erfolgte, wird durch den Umstand angedeutet, dass die Telomerenlänge hochsignifikant mit dem Alter abnahm.

Gegenüber den genannten methodologisch aufwendigeren Markern zeigten die Ergebnisse einer visuellen Bewertung von standardisierten Fotos des Gesichtes überraschend

konsistente und verblüffende Ergebnisse. Die beiden verwendeten Faltenscores, ihre Summe und vor allem die aus dem geschätzten minus tatsächlichen Alter geschätzte Altersdifferenz korrelierten zum einen miteinander, als Zeichen ihrer Konsistenz. Darüber hinaus waren die Altersdifferenz und teilweise auch die Faltenscores mit einer Reihe von klinischen Parametern korreliert, darunter dem summarischen BODE-Score, der als wichtige Kenngröße zur Beurteilung einer COPD gilt. Vor allem aber war die Altersdifferenz mit dem vorhergesagten Emphysemscore korreliert, in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass Patienten mit Lungenemphysem nicht nur eine vorzeitige Alterung aufweisen, sondern diese Alterung auch anhand der Hautbeschaffenheit des Gesichtes zu erkennen ist. Die vorliegenden Daten sind die ersten Daten, in denen diese Hypothese, die in einer vorangegangenen Veröffentlichung bereits formuliert wurde, klar bestätigen [74].

Diese Bestätigung wird verstärkt durch die Beobachtungen an Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel. In Übereinstimmung mit neueren Daten über eine weiniger ausgeprägte Verkürzung der Telomeren bei diesen Patienten [177] fanden wir ebenfalls relativ längere Telomeren, zusätzlich jedoch eine mittlere Altersdifferenz nahe Null. Dieser Befund trat auf trotz eines überwiegend positiven Lungenemphysemscores sowie funktionellen Änderungen, die auf ein relativ stärker ausgeprägtes Emphysem hinwiesen. Dies impliziert, dass der zum Emphysem führende Krankheitsprozess der Lunge nicht oder nicht in demselben Maße mit einer vorzeitigen biologischen Alterung einhergeht wie dies bei Patienten ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel offenbar der Fall ist.

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass, auch in Anbetracht des Mangels brauchbarer und handhabbarer biochemischer und molekularer Marker des Alterns, ein rein phänomenologischer Marker wie das aus dem Gesicht geschätzte biologische Alter noch die relativ engste Beziehung zu klinischen Charakteristika der COPD, vor allem Emphysem, aufwies. Künftigen Untersuchungen bleibt vorbehalten zu eruieren, inwieweit eine solche zusätzliche Erhebung einen diagnostischen oder prognostischen Nutzen hat.

6 Zusammenfassung

In den letzten zehn Jahren wurden immer wieder Daten publiziert, die einen Zusammenhang zwischen verschiedenen chronischen Erkrankungen und Prozessen der biologischen Alterung herstellten. Dies gilt auch für die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Sowohl in Gewebeproben bzw. Zellen, die aus der Lunge von Patienten mit COPD gewonnen wurden, als auch in Blutzellen fanden sich Hinweise darauf, dass in Korrelation mit dem Schweregrad der COPD die biologische Alterung verstärkt ist. Für eine mögliche klinische Anwendung werden Marker benötigt, die zugleich praktikabel und aussagekräftig sind. Hierfür kommen nur nicht oder wenig-invasiv zu gewinnende Marker in Frage. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Beziehungen verschiedener dieser biologischen Alterungsmarker untereinander sowie zu den klinischen Charakteristika von Patienten mit COPD.

Als Basis diente die Subkohorte von Patienten mit COPD, die im Rahmen der Nationalen COSYCONET-Kohorte im Studienzentrum LMU Innenstadt rekrutiert wurde. Ausgewertet wurden 127 Patienten (mittleres (SD) Alter 67 ± 8,22 Jahre; 50,4% weiblich; Schweregrade: 5% GOLD 0, 20% GOLD 1, 35% GOLD 2, 20% GOLD 3, 20% GOLD 4).

Diese Patienten unterzogen sich einem ausführlichen Untersuchungsprogramm, das u.a. eine strukturierte Anamnese, Lungenfunktionsmessungen, einen 6-Minuten-Gehtest, die Entnahme von Blutproben sowie eine Reihe von Fragebögen beinhaltete. Neben diesen Daten wurden als Alterungsmarker die Telomerenlänge von Blutleukozyten, die Konzentrationen der Advanced Glycation End Products (AGE) sowie des Peptids LL-37 im Blut erfasst. Ferner wurde die Hautalterung anhand von standardisierten Fotos des Gesichtes bestimmt. Die potentielle Komorbidität Polyneuropathie bei COPD wurde ebenfalls mit drei verschiedenen Verfahren geprüft. Darüber hinaus erfolgten Messungen mit Hilfe einer Elektronischen Nase, mit dem Ziel, Assoziationen zwischen den Sensorsignalen und den gemessenen Alterungsmarkern aufzudecken.

Die in der Literatur angegebenen Verfahren der Telomerenlängenbestimmung mittels qPCR (T/S Ratio) erwiesen sich als nicht verlässlich, daher musste ein eigenes Verfahren entwickelt werden, das eine Synthese aus Literaturvorschlägen und eigenen Erfahrungen darstellte. Die 127 Patienten zeigten in ihren funktionellen Charakteristika, vor allem Lungenfunktion und körperliche Leistungsfähigkeit, Werte in einem Bereich, wie er aus vielen anderen COPD-Studien bekannt ist. Die Parameter der Hautalterung (nasolabiale und periorbitale Falten,

Faltensumme und Altersdifferenz=geschätztes minus tatsächliches Alter) zeigten eine signifikante Korrelation untereinander. Die Konzentration von LL-37 im Blut korrelierte mit zwei Parametern der Hautalterung (nasolabiale Falten und Altersdifferenz), für die AGEs war dies nicht der Fall. Die Telomerenlänge korrelierte sehr gut mit den Faltenscores.

Bezüglich der klinischen Charakteristika der Patienten unterschieden sich die Korrelationen für die einzelnen untersuchten Alterungsmarker. LL-37 war stark von der Raucheranamnese und dem BMI bestimmt, AGEs vom Vorliegen eines Diabetes oder der anamnestischen Angabe von Krampfadern, Telomeren ebenfalls von der Anamnese Krampfadern, ferner von Gicht und dem Hämoglobinwert. Andererseits waren sowohl T/S Ratio als auch die Faltenscores klar mit dem Lebensalter des Patienten assoziiert und insofern valide Alterungsmarker. Da speziell das Vorliegen eines Lungenemphysems in der Literatur mit einer vorzeitigen Alterung zusammengebracht wird, wurde zusätzlich ein Emphysemscore untersucht, der in der Gesamtkohorte von COSYCONET auf der Basis von CT-Aufnahmen entwickelt worden war und eine Vorhersage eines Emphysems erlaubte (Sensitivität 79%). Dieser Score zeigte mit einer Reihe klinischer Charakteristika inklusive des BODE-Score einen Zusammenhang, vor allem aber mit der anhand der Gesichtshaut geschätzten Altersdifferenz als Maß vorzeitiger Alterung. Keine Assoziationen zu den Alterungsmarkern ergaben sich für die Parameter der Polyneuropathie sowie die Messergebnisse der Elektronischen Nase.

Eine zentrale Beobachtung war, dass Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel (n=8) bei gleicher funktioneller Einschränkung sowohl eine längere Telomerenlänge als auch eine geringere Altersdifferenz aufwiesen. Diese Patienten zeigten gleichzeitig in höherem Maße Zeichen eines Emphysems (6/7).

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die untersuchten Alterungsmarker keine äquivalente Information tragen und zugleich von Komorbiditäten und anderen Risikofaktoren beeinflusst sind. Das konsistenteste Bild ergab sich nicht für die molekularen bzw. biochemischen Marker LL-37, AGE und T/S Ratio, sondern für den phänomenologischen, leicht einzusetzenden Marker der Alterung der Gesichtshaut. Der Befund einer relativ geringgradigeren Alterung bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsinmangel war robust und legt nahe, dass die pathophysiologischen Prozesse bei diesen Patienten nicht mit einer vorzeitigen Alterung verbunden sind. Die vorliegende Arbeit ist auch geeignet, Anregungen für Messungen in der COSYCONET-Gesamtkohorte zu geben.

7 Anhang

7.1 Fragebögen

Kompetenznetz Asthma und COPD

COPD REGISTER
ANAMNESE

Patient: ☐☐☐ ☐☐☐ ☐☐☐ Datum: ☐☐.☐☐.☐☐☐☐ (T T . M M . J J J J)

Arzt: _____ Unterschrift: _____

Alle Felder müssen ausgefüllt werden. Verwenden Sie U für Information nicht verfügbar, N für Information nicht zutreffend.

Anamnese

Anamnestische Daten

1. Seit wie vielen Jahren ist bei Ihnen eine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) bekannt? [Jahr(en)] ☐☐☐
2. O2-Therapie in Ruhezustand? ☐
   1 = Ja
   0 = Nein

   2a. Wenn ja, wie viel Liter Sauerstoffffluss? [L/min] ☐☐☐

Wurde bei einem Ihrer Elternteile eine COPD festgestellt?

3. Mutter COPD: ☐
   1 = Ja
   0 = Nein
4. Vater COPD: ☐
   1 = Ja
   0 = Nein

Wurde bei einem Ihrer Elternteile Lungenkrebs festgestellt?

5. Mutter Lungen-TM: ☐
   1 = Ja
   0 = Nein
6. Vater Lungen-TM: ☐
   1 = Ja
   0 = Nein

Nur Frauen:

7. Sind Sie zur Zeit schwanger? ☐
   1 = Ja
   0 = Nein

Exazerbationen

8. Wie oft haben Sie in den letzten 12 * Monaten eine akute Verschlechterung Ihrer Lungenerkrankung erfahren (stärkere Atemnot, vermehrter oder eitriger Auswurf), d.h. wie oft ging es Ihnen über mehrere Tage deutlich schlechter als sonst, so dass Sie besondere Maßnahmen ergreifen mussten[4]? [mal] ☐☐

9. Wie oft mussten Sie deswegen die Notaufnahme aufsuchen oder Ihren Arzt um einen Hausbesuch bitten? [mal] ☐☐

10. Wie oft wurden Sie deswegen ins Krankenhaus aufgenommen? [mal] ☐☐

11. Wie oft wurden Sie deswegen mit Antibiotika behandelt? [mal] ☐☐

12. Wie oft wurden Sie deswegen mit Kortison-Tabletten oder Kortison-Spritzen* behandelt(1)? [mal] ☐☐

13. Wie oft ging die Verschlechterung Ihrer Lungenkrankheit nicht so weit, dass eine der unter Fragen 9-12 genannten Maßnahmen notwendig wurden, Sie aber die Dosis Ihrer Medikamente erhöht haben? [mal] ☐☐

Andere Lungenerkrankungen

Hat ein Arzt bei Ihnen noch eine der folgenden Lungenerkrankungen diagnostiziert?

14. Bronchiektasen: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

15. Lungenfibrose: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

16. Sarkoidose: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

17. Bronchial-/Lungen-CA: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

18. Schlafapnoe: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

19. Andere: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

    19a. Wenn ja, welche Lungenerkrankung: _____

Komorbiditäten

Hat ein **Arzt** jemals eine der folgenden Krankheiten oder Gesundheitsstörungen bei Ihnen festgestellt?

20. Bluthochdruck (Hypertonie): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

21. Durchblutungsstörungen am Herzen, Verengung der Herzkranzgefäße, Angina Pectoris: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

22. Herzinfarkt: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

22b. Herzrhytmusstörungen: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

22c. Herzschwäche: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

COPD REGISTER
ANAMNESE

Patient: ☐☐☐☐☐☐☐☐☐ Datum: ☐☐.☐☐.☐☐☐☐ (T T . M M . J J J J)

Arzt: _____ Unterschrift: _____

Alle Felder müssen ausgefüllt werden. Verwenden Sie U für Information nicht verfügbar, N für Information nicht zutreffend.

23. Schlaganfall: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

24. Durchblutungsstörungen des Gehirns (nur wenn sie bei Ihnen mit Lähmungen oder Sprachstörungen einhergingen und nicht durch Migräne bedingt waren): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

25. Durchblutungsstörungen an den Beinen, arterielle Verschlusskrankheit (Schaufensterkrankheit): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

26. Krampfadern (Varizen, mit oder ohne 'offen' Beine, Ulcus cruris): ☐
    1 = ja
    0 = Nein

27. Venenthrombose: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

28. Asthma bronchiale (Bronchialasthma, Lungenasthma, allergisches Asthma): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

29. Chronische Bronchitis (d.h. Husten nachts ohne Erkältung und mit morgendlichem Auswurf an den meisten Tagen, mindestens 3 Monate im Jahr): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

30. Magenschleimhautentzündung (Gastritis): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

30b. Refluxerkrankung/Sodbrennen: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

31. Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwür, Ulkuskrankheit: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

32. Gallenblasenentzündung oder Gallensteine: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

33. Leberschrumpfung, Leberzirrhose: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

34. Leberentzündung, Hepatitis: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

35. Überfunktion der Schilddrüse oder Nebenschilddrüse (z.B. Kropf): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

36. Unterfunktion der Schilddrüse: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

37. Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) mit Insulinbehandlung: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

38. Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) ohne Insulinbehandlung: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
39. Erhöhte Blutfette, erhöhtes Cholesterin: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
40. Gicht oder Harnsäureerhöhung: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
41. Blutarmut, Eisenmangel: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
42. Nierenbeckenentzündung, Pyelonephritis: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
43. Nierenkolik, Nierensteine: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
44. Krebserkrankungen, bösartiger Tumor (einschließlich Blutkrebs): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
45. Gelenkverschleiß, Arthrose der Hüft- oder Kniegelenke bzw. der Wirbelsäule: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
46. Entzündliche Gelenk- oder Wirbelsäulenerkrankungen (z.B. chronische Polyarthritis, rheumatoide Arthritis, Morbus Bechterew): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
47. Osteoporose: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
48. Migräne (d.h. anfallartige Kopfschmerzen, die wiederholt und meist halbseitig auftreten, in den frühen Morgenstunden beginnen und Stunden bis Tage andauern können): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
49. Epilepsie (Krampfanfälle, zerebrale Anfälle): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
50. Parkinson: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
51. Multiple Sklerose: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
52. Hirnhautentzündung: ☐
    1 = Ja
    0 = Nein
53. Psychische Erkrankungen (z.B. Angstzustände, Depressionen, Psychose): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

COPD REGISTER
ANAMNESE

Patient: | | | | | | | | | | Datum: | | | . | | | . | | | | |
T T M M J J J J

Arzt: _____ Unterschrift: _____

Alle Felder müssen ausgefüllt werden. Verwenden Sie U für Information nicht verfügbar, N für Information nicht zutreffend.

54. Hirnleistungsstörungen (z.B. Gedächtnisschwäche, Unruhe, Orientierungslosigkeit, Verwirrtheit): ☐
1 = Ja
0 = Nein

55. periphere Polyneuropathie: ☐
1 = Ja
0 = Nein

56. Essstörungen (z.B. Bulimie, Anorexia nervosa): ☐
1 = Ja
0 = Nein

Abhängigkeits- bzw. Suchtkrankheiten

57. Alkohol: ☐
1 = Ja
0 = Nein

58. Drogen, Medikamente: ☐
1 = Ja
0 = Nein

59. andere Formen der Sucht bzw. Abhängigkeit: ☐
1 = Ja
0 = Nein

59a. Wenn ja, welche andere Sucht: _____

60. Haben Sie Allergien? ☐
1 = Ja
0 = Nein

wenn ja, welche Allergie:

60a. Heuschnupfen: ☐
1 = Ja
0 = Nein

60b. Nahrungsmittelallergie: ☐
1 = Ja
0 = Nein

60c. Tierhaare: ☐
1 = Ja
0 = Nein

60d. Metalle (Nickel, Chrom usw.): ☐
1 = Ja
0 = Nein

60e. Hausstaub: ☐
1 = Ja
0 = Nein

60f. Andere: ☐
1 = Ja
0 = Nein

Welche andere Allergie: _____

Patient: ☐☐☐☐☐☐☐☐☐ Datum: ☐☐.☐☐.☐☐☐☐ (T T . M M . J J J J)

Arzt: _____ Unterschrift: _____

Alle Felder müssen ausgefüllt werden. Verwenden Sie U für Information nicht verfügbar, N für Information nicht zutreffend.

61. Neurodermitis (juckendes Ekzem bes. in den Ellenbeugen und Kniekehlen, endogenes Ekzem, atopisches Ekzem): ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

62. Haben Sie weitere Krankheiten, die hier nicht genannt wurden? ☐
    1 = Ja
    0 = Nein

wenn ja, welche weiteren Krankheiten:

62a. Erste weitere Krankheit: _____

62b. Zweite weitere Krankheit: _____

62c. Dritte weitere Krankheit: _____

62d. Vierte weitere Krankheit: _____

REGISTER
MEDIKATION VISITE 1

Patient: ☐☐☐-☐☐☐-☐☐☐ Erhebungsdatum: ☐☐.☐☐.☐☐☐☐ (T T . M M . J J J J)

Arzt: _____ Unterschrift: _____

Alle Felder müssen ausgefüllt werden. Verwenden Sie U für Information nicht verfügbar, N für Information nicht zutreffend.

Aktuelle Medikation

Einheit:	1 = µg	2 = mg	3 = g	4 = ml	5 = hub	6 = IE	7 = Tablette / Kapsel	8 = Tropfen
Verabreichung:	1 = p.o.	2 = rectal	3 = s.c.	4 = i.m.	5 = i.v.	6 = nasal	7 = transdermal	8 = inhalativ

Medikament	PZN	Dosis / Tag *	Nur bei Bedarf **(x)**	Einheit	Verabreichung	Dauer der Anwendung		
						Jahre	Monate	Tage
			○					
			○					
			○					
			○					
			○					

* Für Inhalativa Dosis/ Tag in Hüben oder Inhalationskapseln angeben.

REGISTER
MEDIKATION VISITE 1

Patient: ☐☐☐-☐☐☐-☐☐☐ Erhebungsdatum: ☐☐.☐☐.☐☐☐☐ (T T . M M . J J J J)

Arzt: _____ Unterschrift: _____

Alle Felder müssen ausgefüllt werden. Verwenden Sie U für Information nicht verfügbar, N für Information nicht zutreffend.

Medikation in der Vergangenheit

Haben Sie jemals eine (andere) bronchienerweiternde Therapie erhalten? ☐
1 = Ja 0 = Nein

Wenn ja, für wie lange? [Monate] ☐☐
[Wochen] ☐☐

Kortikosteroide und Herzmedikamente

Erhalten Sie zurzeit Kortikosteroide? ☐
1 = Ja 0 = Nein

Wenn Nein:
Haben Sie jemals Kortikosteroide zur Therapie erhalten? ☐
1 = Ja 0 = Nein

Wenn ja, für wie lange? [Monate] ☐☐
[Wochen] ☐☐

Erhalten Sie zurzeit Herzmedikamente? ☐
1 = Ja 0 = Nein

Wenn Nein:
Haben Sie jemals Herzmedikamente erhalten? ☐
1 = Ja 0 = Nein

Wenn ja, für wie lange? [Monate] ☐☐
[Wochen] ☐☐

COPD-Assessment-Test (CAT)

Die nächsten Fragen werden Ihnen helfen, die Auswirkungen der COPD auf Ihr Wohlbefinden und Ihr tägliches Leben festzustellen.
Ihre Antworten können von Ihnen und Ihrem Arzt dazu verwendet werden, die Behandlung Ihrer COPD zu verbessern, damit Sie bestmöglich davon profitieren.

Bitte kreuzen **(x)** Sie auf **jeder** Skala das auf Sie Zutreffende an.

3.	Ich huste nie	⓪	①	②	③	④	⑤	Ich huste ständig
4.	Ich bin überhaupt nicht verschleimt	⓪	①	②	③	④	⑤	Ich bin völlig verschleimt
5.	Ich spüre keinerlei Engegefühl in der Brust	⓪	①	②	③	④	⑤	Ich spüre ein sehr starkes Engegefühl in der Brust
6.	Wenn ich bergauf oder eine Treppe hinaufgehe, komme ich nicht außer Atem	⓪	①	②	③	④	⑤	Wenn ich bergauf oder eine Treppe hinaufgehe, komme ich sehr außer Atem
7.	Ich bin bei meinen häuslichen Aktivitäten nicht eingeschränkt	⓪	①	②	③	④	⑤	Ich bin bei meinen häuslichen Aktivitäten sehr stark eingeschränkt
8.	Ich habe keine Bedenken, trotz meiner Lungenkrankheit das Haus zu verlassen	⓪	①	②	③	④	⑤	Ich habe wegen meiner Lungenkrankheit große Bedenken, das Haus zu verlassen
9.	Ich schlafe tief und fest	⓪	①	②	③	④	⑤	Wegen meiner Lungenerkrankung schlafe ich nicht tief und fest
10.	Ich bin voller Energie	⓪	①	②	③	④	⑤	Ich habe überhaupt keine Energie

modified Medical Research Council (mMRC)

Zunächst möchten wir etwas darüber erfahren, welche Beschwerden Ihre Atmung Ihnen bereitet und wie sie sich auf Ihr Leben auswirken. Wir möchten dadurch herausfinden, was Ihnen an Ihrer Erkrankung aus Ihrer Sicht die meisten Probleme bereitet und nicht, was die Ärzte und das Pflegepersonal zu Ihren Problemen meinen. Denken Sie nicht zu lange über Ihre Antworten nach.

Bitte kreuzen **(x)** Sie für jede Frage **nur eine** Antwort an.

1. Wie würden Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung beschreiben?

   ○ sehr gut ○ gut ○ weniger gut ○ schlecht ○ weiß nicht ○ Antwort verweigert

2. Wie stark leiden Sie unter Atemnot (*MRC-Skala*)?

   ○ Ich leide nie unter Atemnot, außer bei starker Anstrengung

   ○ Ich leide unter Atemnot beim schnellen Gehen oder beim Bergaufgehen mit leichter Steigung

   ○ Ich gehe beim Gehen in der Ebene wegen Atemnot langsamer als Gleichaltrige oder benötige bei selbst gewählter Geschwindigkeit Pausen

   ○ Ich benötige eine Pause wegen Atemnot beim Gehen in der Ebene nach ca. 100 m oder nach einigen Minuten

   ○ Ich bin zu kurzatmig, um das Haus zu verlassen oder mich an- und auszuziehen

Raucheranamnese

Rauchen

Nun haben wir einige Fragen, die sich auf das Zigarettenrauchen beziehen.

67. Haben Sie in den letzten vier Wochen Zigaretten geraucht? ☐

1 = Ja
0 = Nein

wenn ja,

67 (ja_a). Wie alt waren Sie, als Sie mit dem Rauchen begonnen haben? [Jahre] ☐☐

67 (ja_b). Rauchen Sie regelmäßig oder gelegentlich? ☐

1 = regelmäßig
2 = gelegentlich (wöchentlich weniger als 1 Zigarette pro Tag)

67 (ja_c). Wie viele Zigaretten rauchen Sie durchschnittlich pro Tag? [Zigaretten] ☐☐☐

67 (ja_d). Wann haben Sie Ihre letzte Zigarette geraucht? ☐☐.☐☐.☐☐☐☐ ☐☐:☐☐ (T T . M M . J J J J H H : M M)

wenn nein,

67 (nein). Haben Sie jemals Zigaretten geraucht? ☐

1 = Ja
0 = Nein

wenn ja,

67 (nein_a). Wie alt waren Sie, als Sie mit dem Rauchen begonnen haben? [Jahre] ☐☐

67 (nein_b). Haben Sie regelmäßig oder gelegentlich geraucht? ☐☐

1 = regelmäßig
2 = gelegentlich (wöchentlich weniger als 1 Zigarette pro Tag)
88 = weiß nicht

67 (nein_c). In welchem Jahr haben Sie mit dem Rauchen aufgehört? [jjjj] ☐☐☐☐

67 (nein_d). Was war die größte Anzahl an Zigaretten, die Sie täglich über ein Jahr geraucht haben? [Zigaretten] ☐☐☐

68. Haben Sie jemals Zigarren, Zigarillos oder Pfeifen geraucht? ☐

1 = Ja
0 = Nein

69. Raucht jemand in Ihrem Haushalt, Sie selbst nicht eingeschlossen? ☐

1 = Ja
0 = Nein

wenn ja,

69a. Wie viele Zigaretten werden durchschnittlich pro Tag in Ihrem Haushalt geraucht? ☐☐☐

70. Hat früher jemand an Ihrem Arbeitsplatz in Ihrer unmittelbaren Umgebung geraucht, Sie selbst nicht eingeschlossen? ☐

1 = Ja
0 = Nein

71. Haben Ihre Eltern in Ihrer Kindheit geraucht? ☐

2 = Ja, beide
1 = Ja, ein Elternteil
0 = Nein

DemTect-Test und Umrechnungstabelle für Auswertung

DemTect DemTect

Test

1. Wortliste

Ich werde Ihnen jetzt langsam eine Liste mit Worten vorlesen. Danach wiederholen Sie bitte möglichst viele dieser Worte. Auf die Reihenfolge kommt es nicht an.

1. Durchlauf

Teller	Hund	Lampe	Brief	Apfel	Hose	Tisch	Wiese	Glas	Baum
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Vielen Dank. Nun nenne ich Ihnen die gleichen 10 Worte ein zweites Mal. Auch danach sollen Sie wieder möglichst viele Worte wiederholen.

2. Durchlauf

Teller	Hund	Lampe	Brief	Apfel	Hose	Tisch	Wiese	Glas	Baum
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

2. Zahlen umwandeln

Diese Aufgabe finden Sie auf einer Extraseite im Anschluss an die Fragen.

3. Supermarktaufgabe

Nennen Sie mir bitte so viele Dinge wie möglich, die man im Supermarkt kaufen kann. Sie haben dafür eine Minute Zeit.

☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

4.Zahlenfolge rückwärts

Ich werde Ihnen jetzt eine Zahlenreihe nennen, die Sie mir dann bitte in umgekehrter Reihenfolge wiederholen sollen. Wenn ich beispielsweise „vier-fünf" sage, dann sagen Sie bitte „fünf-vier".

1. Versuch	2. Versuch	Ergebnis
7-2	8-6	☐
4-7-9	3-1-5	☐
5-4-9-6	1-9-7-4	☐
2-7-5-3-6	1-3-5-4-8	☐
8-1-3-5-4-2	4-1-2-7-95	☐

5. Erneutes Abfragend der Wortliste

Ganz am Anfang des Tests habe ich Ihnen 10 Worte genannt. Können Sie sich noch an diese Worte erinnern?

Teller	Hund	Lampe	Brief	Apfel	Hose	Tisch	Wiese	Glas	Baum
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Umrechnungstabellen

Umrechnung der Einzelergebnisse in Punkte

Wortliste		
Anzahl genannter Begriffe		Punkte
< 60 Jahre	≥ 60 Jahre	
≤ 7	≥ 6	0
8-10	7-8	1
11-12	9-10	2
≥13	≥ 11	3

Zahlen- Umwandeln		
Anzahl richtiger Umwandlungen		Punkte
< 60 Jahre	≥ 60 Jahre	
0	0	0
1-2	1-2	1
3	3	2
4	4	3

Supermarkt-Aufgabe		
Anzahl genannter Begriffe		Punkte
< 60 Jahre	≥ 60 Jahre	
0-12	0-5	0
13-15	6-9	1
16-19	10-15	2
≥ 20	≥ 16	4

Zahlenfolge rückwärts		
Länge der Zahlenfolge		Punkte
< 60 Jahre	≥ 60 Jahre	
0	0	0
2-3	2	1
4	3	2
≥ 5	≥ 4	3

verzögerter Abruf		
Anzahl genannter Begriffe		Punkte
< 60 Jahre	≥ 60 Jahre	
0	0	0
1-3	1-2	1
4-5	3-4	2
≥ 6	≥ 5	5

Neuropathie-Symptom-Score					
	Ja		Nein		Punkte
Symptomatik Fuß/Unterschenkel *					
Brennen		2		0	
Taubheitsgefühl		2		0	
Parästhesien		2		0	
Schwächegefühl (Ermüdung, Erschöpfung)		1		0	
Krämpfe		1		0	
Schmerzen		1		0	
Lokalisation					
Füße		2			
Unterschenkel		1			
woanders		0			
Exazerbation					
Nachts vorhanden		2			
Tagsüber und nachts vorhanden		1			
Nur tagsüber vorhanden		0			
Durch Symptome aus dem Schlaf geweckt		+ 1			
Besserung der Symptome beim					
Gehen		2			
Stehen		1			
Sitzen oder Hinlegen		0			
	Gesamtscore NSS :				
Gesamtscore NSS 3-4: leichte Symptome 5-6: mäßige Symptome 7-10: schwere Symptome *in jeder Punktespalte kann die maximale Punktzahl nur einmal vergeben werden					

© ÄZQ, BÄK, KBV und AWMF 2013 (Quelle: Bundeärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Vereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftli Medizinischen Fachangestellten (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter – Kurzfassung. Version 1 2012 (Datum: 01.09.2013))

Available from: http://www.diabetes.versorgsleitlinie.de/dm2_neuro.

Internet: http://www.versorgunsleitline.de, http://www.awmf-leitlinien.de

Geschäftsstelle Kompetenznetz Asthma/COPD - Philipps Universität Marburg

Baldinger Str.; 35043 Marburg; Tel. (06421)-586 4536; sandra.soehler@staff.uni-marburg.de

7.2 Funktionelle Messungen (nicht relevant für das Verfassen der Dissertation)

Oberschenkelumfang

Zur Ermittlung der Oberschenkelumfänge wurde das Maßband horizontal an der dicksten Stelle des Oberschenkels, direkt unterhalb der Gluteafalte angelegt. Der Patient stand aufrecht mit unbekleideten Beinen vor dem Untersucher.

EKG

Das EKG konnte Hinweise liefern, ob der Herzmuskel funktionstüchtig war oder möglicherweise eine Verdickung der Herzwand aufwies, ob Entzündungen des Herzmuskels oder Herzbeutels die Erregungsleitung störten, ob die Frequenz der Herzschläge regelmäßig war und ob eine abnorme Belastung des rechten oder linken Herzens vorlag. Mit dem Elektrokardiograph ELI 10 war die Aufnahme eines diagnostischen 12-Kanal-EKGs möglich. Das Gerät verfügte über den VERITAS™-Interpretationsalgorithmus von Mortara Instrument wodurch eine automatische Vorauswertung gewährleistet wurde. Weitere Auswertungen werden von zentraler Stelle vorgenommen. Die Messung erfolgte im Liegen, der Oberkörper musste dafür frei sein und vor dem Aufbringen der Elektroden mit einem Alkoholpad gereinigt werden. Die 6 Brustwandelektroden wurden an den routinemäßigen Stellen angebracht.

Herzultraschall

Die transthorakale Herzultraschall-Untersuchung sollte der weiteren Beurteilung der kardiovaskulären Situation der Studienpopulation dienen. Die Untersuchung wurde von routinierten Ärzten der kardiologischen Abteilungen der Kliniken durchgeführt.

Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA)

Die Bioelektrische Impedanzanalyse (Bioimpedanz, BIA) diente der Bestimmung der Körperzusammensetzung. Unser Körper besteht im Wesentlichen aus Wasser, Muskel- und Fettmasse. Die Analyse ermöglicht eine genauere Differenzierung jener Parameter zu ermitteln. Verwendet wurde hierfür die Nutribox der Firma Data Input. Die Software, sowie Elektroden waren ebenfalls vom selben Hersteller. Der Patient wurde vor der Messung aufgefordert die Füße zu entkleiden und anschließend auf die Liege gebeten. Die rechte Hand und der rechte Fuß wurden mit einem Alkoholpad abgerieben. Anschließend klebte

man je zwei Elektroden auf die Hand und den Fuß und zwar wie in der Herstelleranweisung empfohlen. Nach 10-minütiger ruhiger, horizontaler Lage konnte mit der Messung begonnen werden. Resistance (R), Reactance (Xc) und der Phasenwinkel wurden bei 50 kHz ermittelt.

Blutgase

Mittels Blutgasanalyse (BGA) wurde die Bestimmung der Gasverteilung (Partialdruck) von O_2 (Sauerstoff), CO_2 (Kohlendioxid) sowie des pH-Wertes und des Säure-Basen-Haushaltes (Basenüberschuss, BE) im Blut vorgenommen. Anwendung fand der Analysator ABL800 Basic der Firma Radiometer. Das Ohrläppchen des Patienten wurde mittels Finalgon® Salbe in den hyperämisierten Zustand gebracht. Anschließend wurde Blut in eine mit Antikoagulanz beschichtete Kapillare gezogen und sodann in den Analysator eingebracht. Waren Patienten sauerstoffpflichtig, konnten sie entscheiden, den Sauerstoff mindestens 15 Minuten vor der Messung abzulegen, oder ihn auch während der BGA weiter zu tragen. In diesem Fall musste diese Tatsache sowie die Flussrate des Gerätes notiert werden. Wichtige Messparameter waren der Sauerstoffpartialdruck pO_2 [mmHg], Kohlenstoffpartialdruck pCO_2 [mmHg], der pH-Wert des Blutes und der Basenüberschuss [mmol/l].

Polyneuropathie: Messung des Temperaturempfindens

Für die Reizunterscheidung zwischen warm und kalt wurden 2 Twin-Tip®- Instrumente (Tip-Therm) verwendet. Die metallische Kappe des einen wurde auf einem Temperaturpad auf ca. 15°C gekühlt, die des anderen auf einem circa 40°C warmen Pad gewärmt. Die Reize wurden vor der Untersuchung am Handrücken demonstriert. Dem Patienten wurde erklärt, dass er seine Empfindung mit entweder "Warm", "Kalt" oder "Weiß nicht" angeben sollte, die Option "Weiß nicht" war dabei ausdrücklich als dritte Antwortmöglichkeit anzubieten. Auf beide Messstellen beider Füße wurde in zufälliger Reihenfolge jeweils warm oder kalt aufgesetzt, wobei jede Stelle insgesamt fünfmal in zufälliger Reihenfolge durch die Metallenden berührt wurde. Die Anzahl der korrekt genannten Temperaturwahrnehmungen wurde für die einzelnen Untersuchungsstellen während der Untersuchung notiert.

Abb. A1: Messpunkte am Fuß zur Ermittlung des Temperaturempfindens mittels Twin-Tip® (Tip-Therm)

Sionex Ionenmobilitäts-Spektrometer:

Das Sionex microAnalyzer-Gerät (Sionex Corporation, 8-A Preston Court, Bedford, MA 01730 USA) hat zwei wesentliche Bestandteile, welche eine Auftrennung und Darstellung verschiedener Substanzen ermöglicht.

Die Ionen-Mobilitäts-Spektroskopie (microDMx) ermöglicht die Detektion sehr kleiner Mengen (ppb/ppt) und macht sich die Weg-und Geschwindigkeitsabhängigkeit der Teilchen aufgrund deren Ladung, Ionengröße und –form sowie der Stärke des Driftgasstroms, zu Nutze. Die Analyten werden gasförmig in den Analysator eingebracht. Es erfolgt eine Vortrennung über eine GC-Einheit. Die einzelnen Bestandteile werde ionisiert und gelangen im Anschluss daran in ein elektrisches Gleichstrom-Kompensationsfeld über das ein hochfrequent oszillierendes, asymmetrisches elektrisches Feld gelegt wird. Diese Versuchsanordnung ermöglicht durch entsprechende Adaption der Einstellungen eine weitere, verfeinerte Auftrennung der Probe. Am Elektrometer erzeugen die auftreffenden Ionen ein elektrisches Signal, das die eigentliche Messgröße darstellt. Die Teilcheneigenschaften bedingen unterschiedliche Retentionszeiten und es ergibt sich in Kombination mit der Kompensationsspannung und der gemessenen Signalintensität am Elektrometer ein dreidimensionales Ionenmobilitätsspektrum.

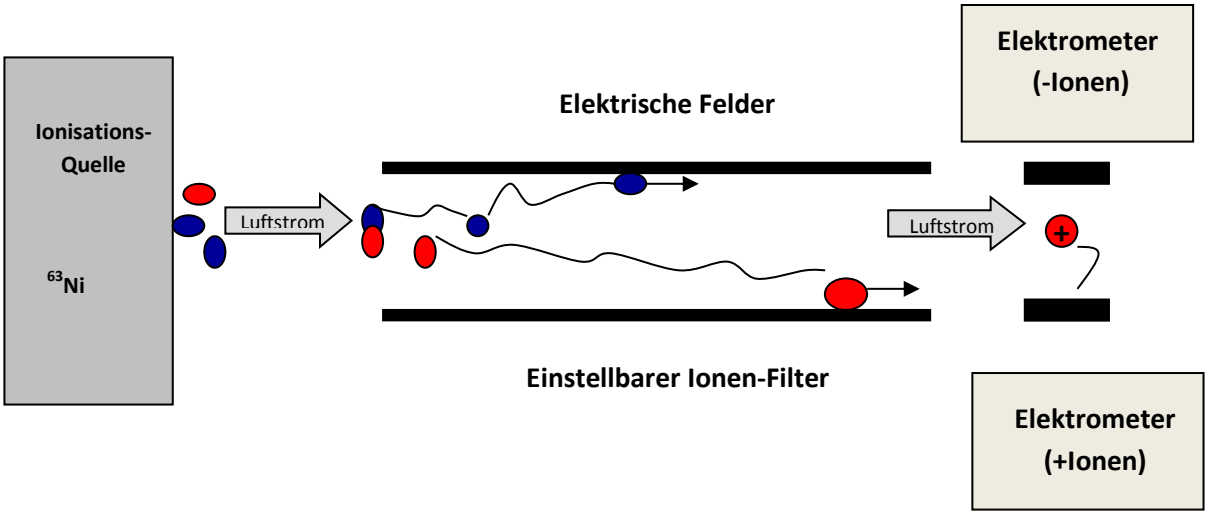


Abb. A2: Schematischer Aufbau eines IMS [101]

Set-up Panel der Messung

Es wird derselbe Aufbau genutzt, wie bereits für die Cyranose® 320 beschrieben wurde. Die Probe wird ebenfalls „online“ direkt aus dem Atemstrom der Patienten gezogen. Der Patient atmete in Ruhe 11 Minuten in ein Plexiglasrohr, wobei eine Naseklemme aufgesetzt war. Die ersten fünf Minuten der Messung dienten als Spülvorgang, erst im Anschluss wurde Probe über einen Schlauch in das Gerät eingezogen. Die Probenahmedauer betrug sechs Minuten. Ein bereits validiertes Programm wurde für die Analyse verwendet. Vor oder direkt im Anschluss an jede Messung wurde eine Raumluftsmessung durchgeführt, um einen Vergleich der gemessenen Substanzen eines Probanden und mögliche in der Raumluft enthaltene Stoffe voneinander abgrenzen zu können.

7.3 Standardkurven/Schmelzprofile der Telomerenlängenbestimmung

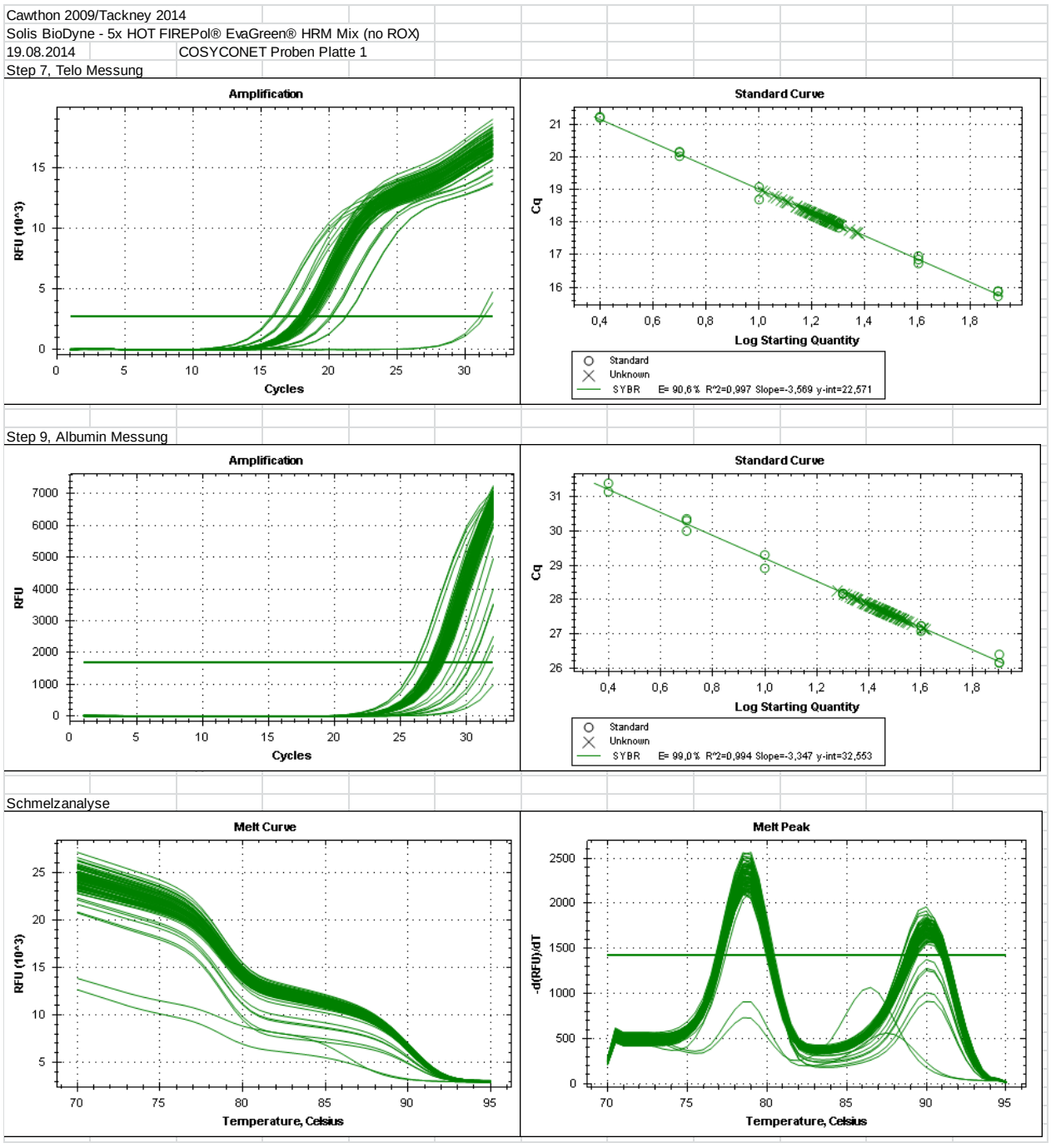
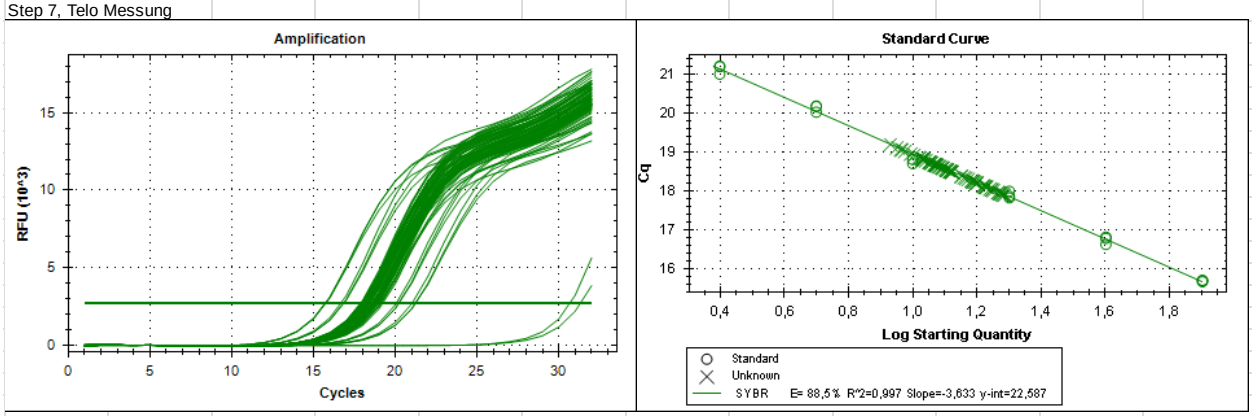
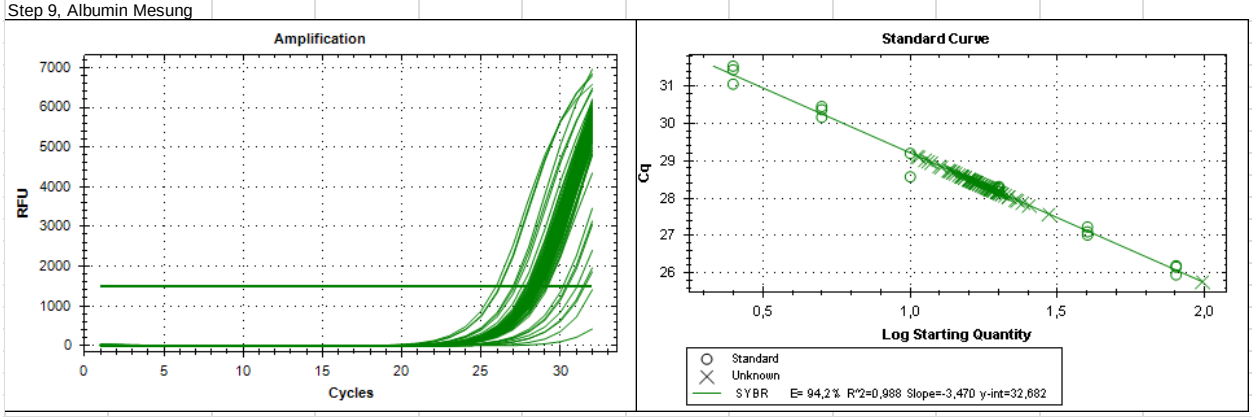


Abb. A3: Platte 1 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie

Cawthon 2009/Tackney 2014
Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX)
02.09.2014 COSYCONET Proben Platte 2
Step 7, Telo Messung



Step 9, Albumin Mesung



Schmelzanalyse

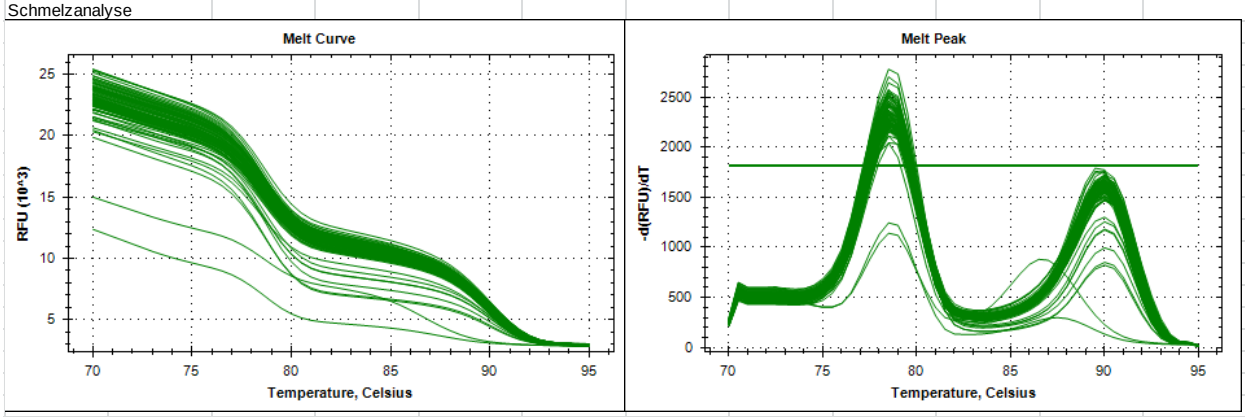
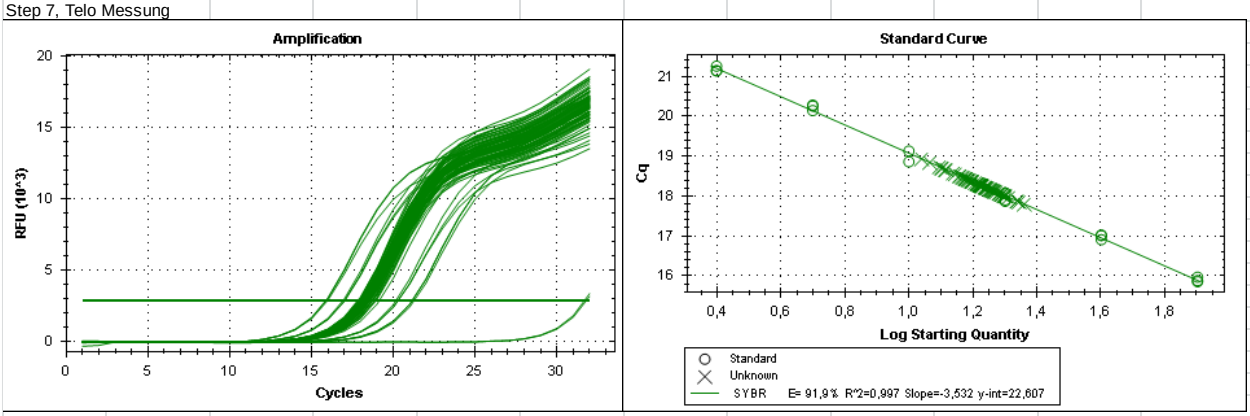
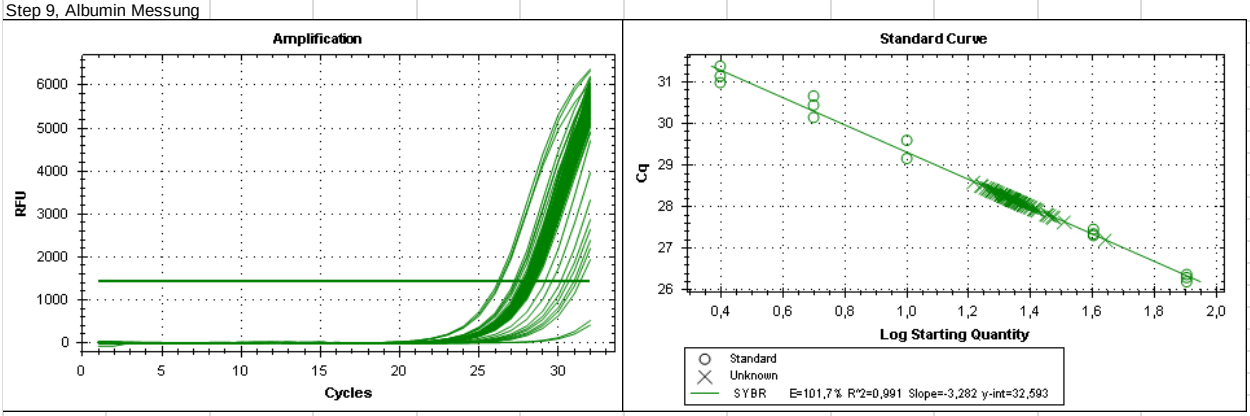


Abb. A4: Platte 2 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie

Cawthon 2009/Tackney 2014
Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX)
04.09.2014 COSYCONET Proben Platte 3
Step 7, Telo Messung



Step 9, Albumin Messung



Schmelzanalyse

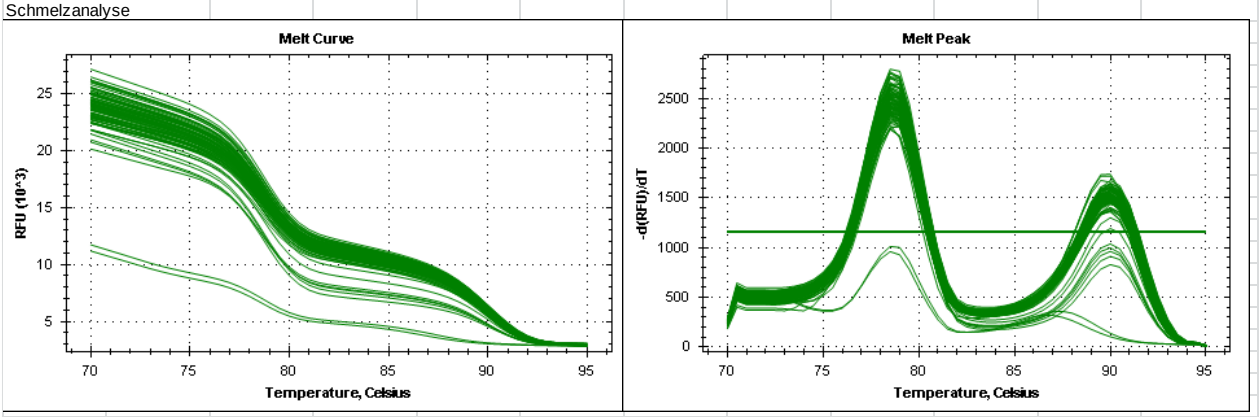
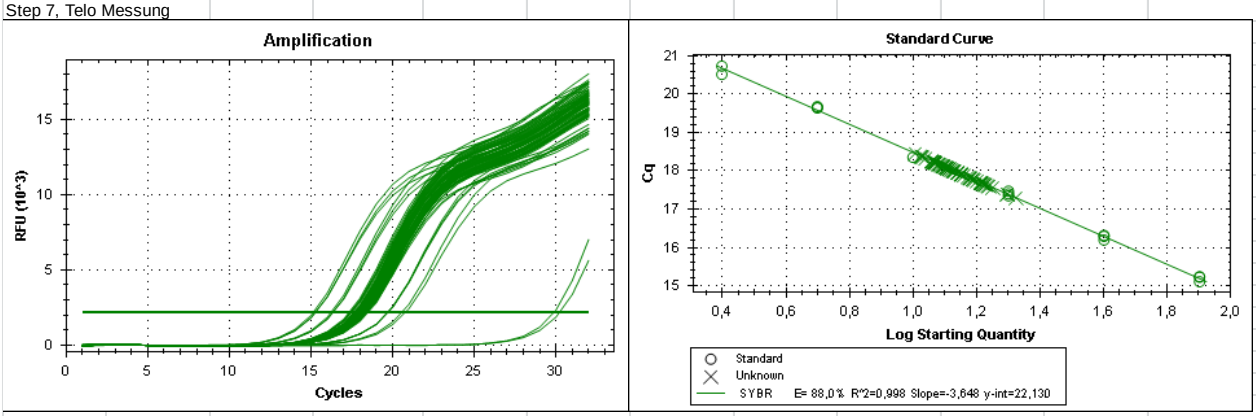
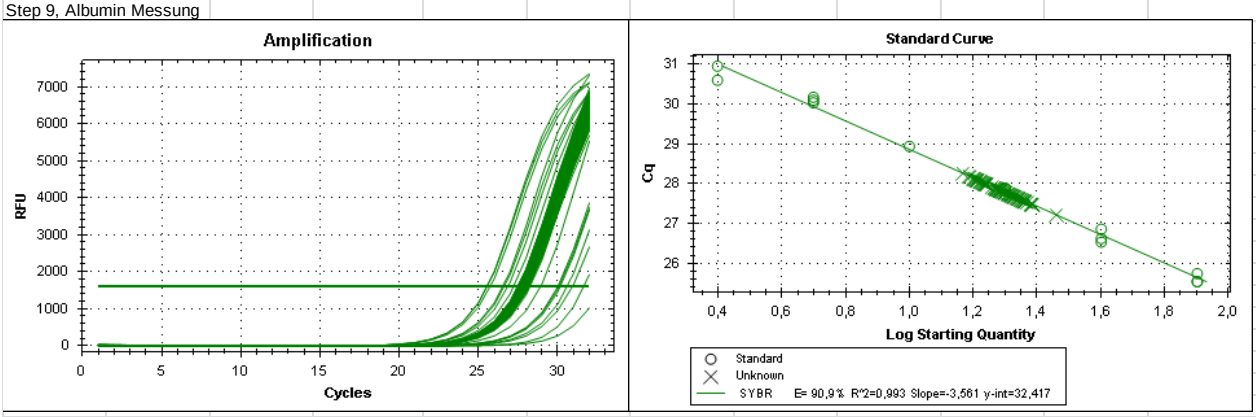


Abb. A5: Platte 3 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie

Cawthon 2009/Tackney 2014
Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX)
10.09.2014 COSYCONET Proben Platte 4
Step 7, Telo Messung



Step 9, Albumin Messung



Schmelzanalyse

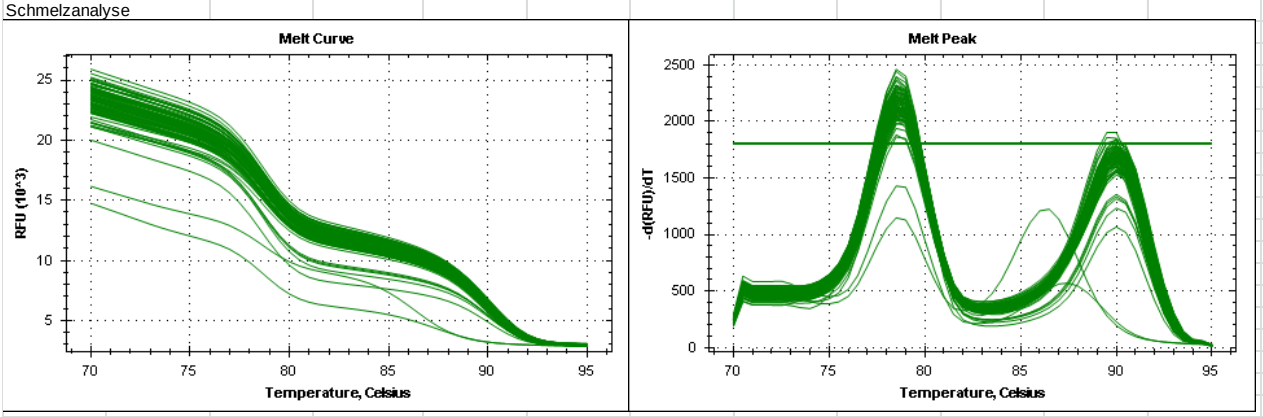
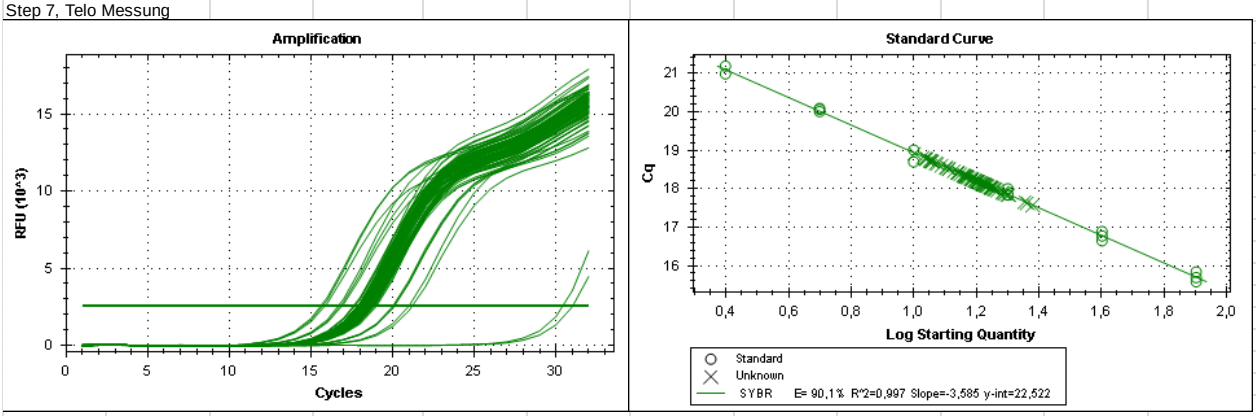
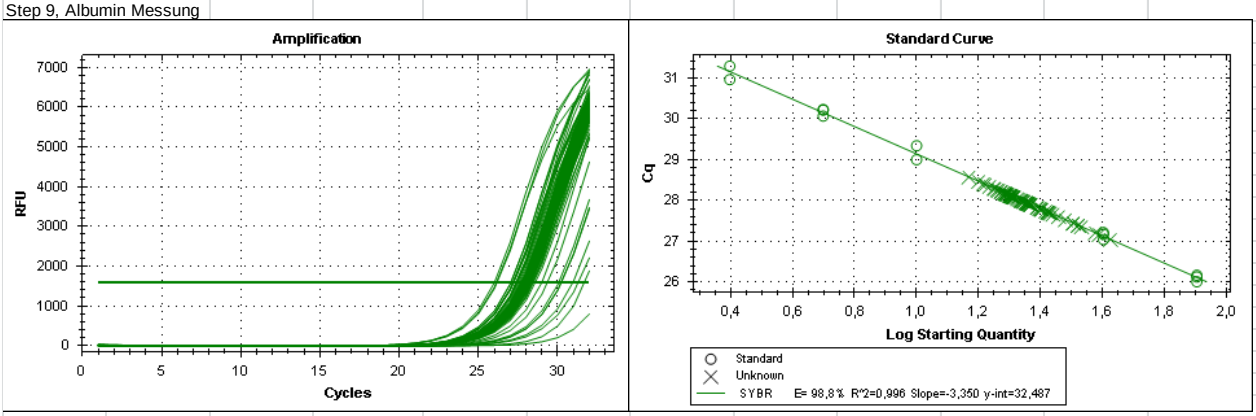


Abb. A6: Platte 4 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie

Cawthon 2009/Tackney 2014
Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX)
12.09.2014 COSYCONET Proben Platte 5
Step 7, Telo Messung



Step 9, Albumin Messung



Schmelzanalyse

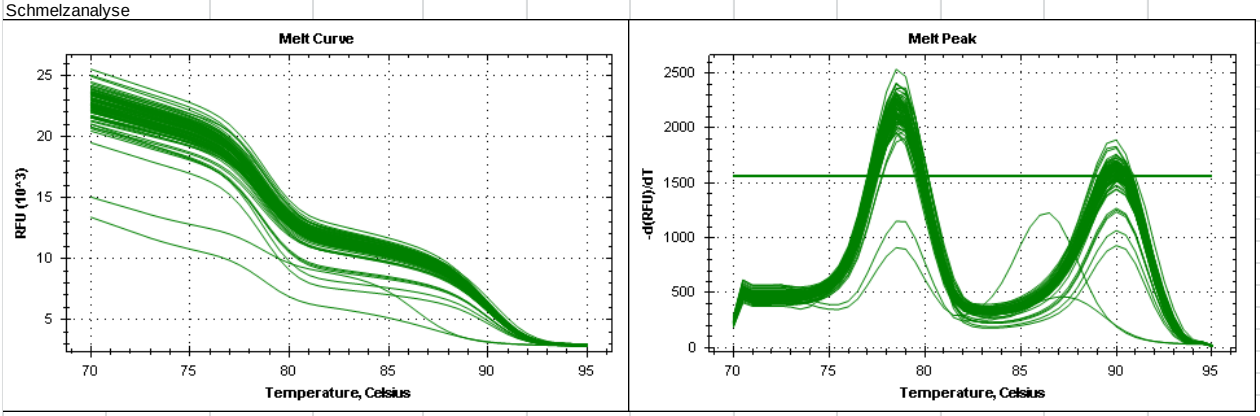
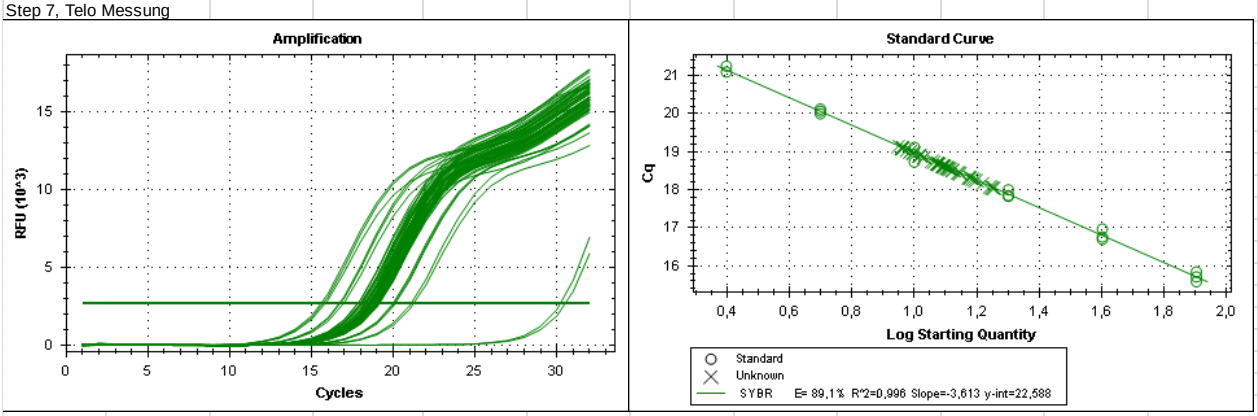
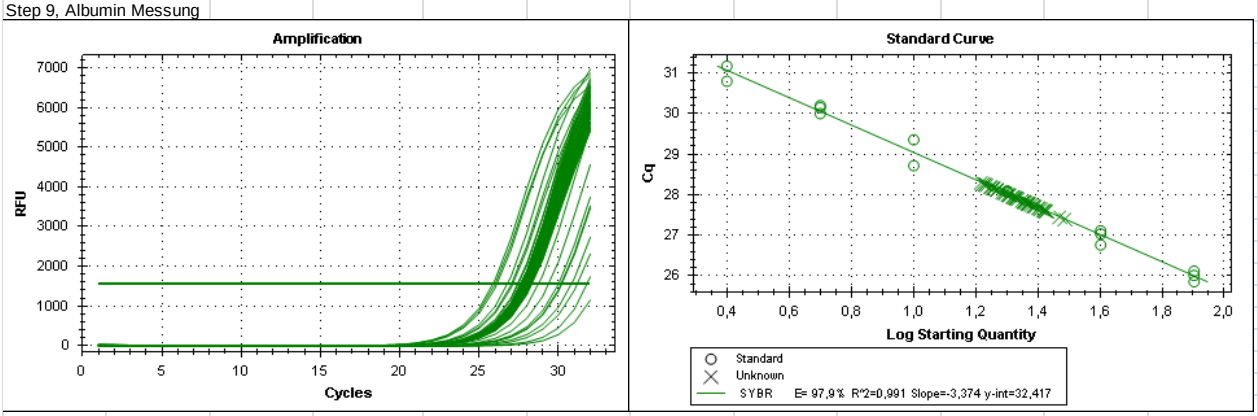


Abb. A7: Platte 5 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie

Cawthon 2009/Tackney 2014
Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (no ROX)
23.09.2014 COSYCONET Proben Platte 6
Step 7, Telo Messung



Step 9, Albumin Messung



Schmelzanalyse

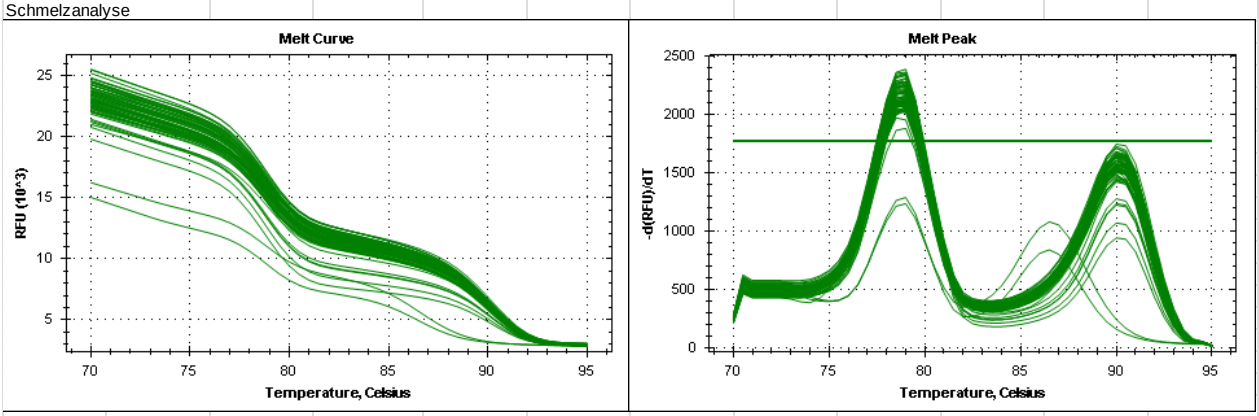


Abb. A8: Platte 6 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Rangliste der häufigsten Todesursachen weltweit, WHO [4] 8

Abb. 1.2: Risikoeinschätzung der COPD gemäß den aktualisierten GOLD-Kriterien [6] 10

Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade durch Bindung von Advanced Glycation End Products (AGE) an seinen zellständigen Rezeptor (RAGE) [53]. Diese Abbildung soll primär die Komplexität der Regulation verdeutlichen, die zu analysieren allerdings nicht der Gegenstand dieser Arbeit war, die sich mit den Beziehungen verschiedener Marker zueinander beschäftigte. Zu den verwendeten Abkürzungen siehe die angegebene Literaturstelle. 15

Abb. 3.1: Beispielfotografie für die Analysen der Hautbeschaffenheit 29

Abb. 3.2: Bindung der Primer an den Telomer-Sequenzen [98] 32

Abb. 3.3: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.1 34

Abb. 3.4: Standardkurven der Telomeramplifikation bei 250 nM (A) und 500 nM (B) sowie der Albuminamplifikation bei 250 nM (C) und 500 nM (D) in Versuchsblock 1.1 35

Abb. 3.5: Schmelzprofile der entstandenen Produkt, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, im Ansatz mit 250 nM (A) und 500 nM (B) in Versuchsblock 1.1 36

Abb. 3.6: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.2 37

Abb. 3.7: Standardkurven der Telomeramplifikation bei 200 nM (A) und 100 nM (B) sowie der Albuminamplifikation bei 200 nM (C) und 100 nM (D) in Versuchsblock 1.2 37

Abb. 3.8: Schmelzprofile der entstanden Produkte, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, im Ansatz mit 200 nM (A) und 100 nM (B) in Versuchsblock 1.2 38

Abb. 3.9: Standardkurve der Telomeramplifikation bei 75 nM (A) und der Albuminamplifikation bei 75 nM (B) in Versuchsblock 1.3 39

Abb. 3.10: Schmelzprofil der entstanden Produkte, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, im Ansatz mit 75 nM in Versuchsblock 1.3 39

Abb. 3.11: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.4 mit Temperaturgradient für den Telomer-Amplifikationsschritt 40

Abb. 3.12: Temperatur Set-up von Versuchsblock 1.4 mit Temperaturgradient für den Albumin-Amplifikationsschritt 41

Abb. 3.13: Standardkurve des Telomeransatztes mit 100 nM bei 72 °C (A) und das dazugehörige Schmelzprofil (B) in Versuchsblock 1.4 41

Abb. 3.14: Standardkurve des Albuminansatzes mit 100 nM bei 85 °C (A) und dem dazugehörigen Schmelzprofil (B) in Versuchsblock 1.4 42

Abb. 3.15: Temperatur Set-up von Versuchsblock 2.1 44

Abb. 3.16: Amplifikationsprofile des Telomer-Produktes bei 72°C (A) und 59°C (C) und die entsprechenden Amplifikationkurven des Albumin-Produktes bei 89°C (B und D) in Versuchsblock 2.1 44

Abb. 3.17: Standardkurve des Telomer-Produktes bei 72°C (A) und 59°C (C) und die entsprechenden Standardkurven des Albumin-Produktes bei 89°C (B und D) in Versuchsblock 2.1 45

Abb. 3.18: Darstellung der Standardkurven des Telomer-Produktes (A) bei 72°C (oben) und 59°C (unten) mit den entsprechenden Standardkurven des Albumins (B) bei 85°C mit vorherigem Telomer-Schritt bei 72°C (oben) und 59°C (unten) von Versuchsblock 2.1 46

Abb. 3.19: Schmelzprofile der entstandenen Produkte, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, mit 72°C-Annealing/Extension für das Telomer-Produkt (A) und 59°C (B) in Versuchsblock 2.1 46

Abb. 3.20: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.1 47

Abb. 3.21: Standardkurve des Telomer-Produktes bei 59,4°C (A) und die entsprechende Standardkurve des Albumin-Produktes bei 85°C (B) in Versuchsblock 2.2 48

Abb. 3.22: Schmelzprofil von Versuchsblock 2.2 48

Abb. 3.23: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.2 49

Abb. 3.24: Standardkurve des Telomer-Produktes bei 59°C (A) und die entsprechende Standardkurve des Albumin-Produktes bei 85°C (B) in Versuchsblock 2.3 50

Abb. 3.25: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 2.3 50

Abb. 3.26: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.3 51

Abb. 3.27: Zusammenfassenden Darstellung der Standardkurven des entstandenen Telomer-Produktes (A) im Einzelansatz (oben) und im gemeinsamen Ansatz (unten) und des entsprechend entstandenen Albumin-Produktes (B) im Einzelansatz (oben) und im gemeinsamen Ansatz (unten) von Versuchsblock 2.4 52

Abb. 3.28: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 2.4 52

Abb. 3.29: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 2.4 52

Abb. 3.30: Temperatur Set-up von Versuchsblock 3.1 54

Abb. 3.31: Standardkurve des entstandenen Telomer-Produktes (A) und des entsprechend entstandenen Albumin-Produktes (B) in Versuchsblock 3.1 54

Abb. 3.32: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 3.1 55

Abb. 3.33: Darstellung der Standardkurven des entstandenen Telomer-Produktes (A) im Einzelansatz und im gemeinsamen Ansatz (fallen zusammen) und des entsprechend entstandenen Albumin-Produktes (B) im Einzelansatz (unten) und im gemeinsamen Ansatz (oben) in Versuchsblock 3.2 56

Abb. 3.34: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 3.2 56

Abb. 3.35: Standardkurve des Telomer-Produktes (A) und die entsprechenden Standardkurven des Albumin-Produktes (B) von Versuchsblock 3.3 57

Abb. 3.36: Schmelzprofil, aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU=Signalstärke) gegen die Temperatur, in Versuchsblock 3.3 57

Abb. 3.37: Gelelektrophorese zu Versuchsblock 3.3 58

Abb. 3.38: Anlegen des Gerät NC-stat® DPNCheck zum Erfassen von Nervenleitgeschwindigkeit und Amplitude (nach Herstelleranleitung) 64

Abb. 3.39: Ableseschema der Rydel-Seiffer-Stimmgabel 64

Abb. 3.40: Messpunkte am Fuß für das Monofilament 65

Abb. 3.41: Schematische Darstellung einer Sensorantwort bei Analytenexposition [101] 67

Abb. 3.42: Verarbeitung der Sensorreaktionen zu charakteristischen Profilen [102] 68

Abb. 3.43: Messaufbau für die Cyranose® 320 69

Abb. 3.44: Set-up Panel der Cyranose® 320 zur Verdeutlichung der Einstellungen 70

Abb. 4.1: Beziehung der Messungen der Polyneuropathie mit und ohne Diabetiker untereinander; Monofilament-Stimmgabel (A) und (D), Nervenleitgeschwindigkeit-Stimmgabel (B) und (E), Nervenleitgeschwindigkeit –Monofilament (C) und (F) 83

Abb. 4.2: Beziehung der Messparameter der Polyneuropathie zu Diabetes und der anamnestischen Angabe einer Polyneuropathie; Nervenleitgeschwindigkeit-Diabetes (A), Stimmgabel-Diabetes (B), Monofilament-Diabetes (C), Nervenleitgeschwindigkeit-Polyneuropathie (D), Stimmgabel-Polyneuropathie (E) und Monofilament-Polyneuropathie (F)..... 85

Abb. 4.3: Beziehung der Parameter der Hautalterung zueinander; NL-Falten-PO-Falten (A), NL-Falten-geschätztes Alter (B), PO-Falten-geschätztes Alter (C), Faltensumme-geschätztes Alter (D), chronologisches Alter- geschätztes Alter (E), Altersdifferenz vs. Faltensumme (F) 89

Abb. 4.4: Beziehung einiger Laborparameter zu anamnestischen Komorbiditäten bzw. anthropometrischen Daten; HbA1c-Diabetes (A), Triglyzeride-BMI (B), HDL-Bauchumfang (C), Triglyzeride vs. Waist-to-Hip-Ratio (D), Hämoglobin-Anämie (E) und Eosinophile Granulozyten-Asthma (F)..... 96

Abb. 4.5: Darstellung der Sensitivität und Spezifität der Vorhersagefunktion in der Münchner Kohorte 97

Abb. 4.6: Beziehung der Telomerenlänge zu Alter (A), geschätztem Alter (B), AGE (C), LL-37 (D), PO-Faltenscore (E) und NL-Faltenscore (F)..... 99

Abb. 4.7: Beziehung der Telomerenlänge zu Krampfadern (A), Gicht (B), Komplex kardiovaskulärer Erkrankungen (C), Emphysem CT (D), Emphysem Vorhersagefunktion (E) und Alpha-1-Antitrypsinmangel (F) 101

Abb. 4.8: Beziehung der Telomerenlänge zur Messung der Stimmgabel (A), FEV1%Soll (B), TLCO%Soll (C), 6MWD (D), DemTect (E) und ABI (F) 103

Abb. 4.9: Beziehung der AGEs mit Alter (A), geschätztes Alter (B), Faltensumme mit und ohne Diabetiker (C) und (D) und Geschlecht (F) 105

Abb. 4.10: Beziehung der AGEs zu Krampfadern mit und ohne Diabetiker (A) und (B), FEV1%Soll (C), TLC (D), ABI (E) und CAT (F)..... 108

Abb. 4.11: Beziehung des LL-37 zur Altersdifferenz (A), geschätztes Alter (B), Raucherstatus (C), Emphysem CT (D), T/S Ratio (E) und AGEs (F) 110

Abb. 4.12: Beziehung von Faltensumme zu den Pack-Years (A), NL-Faltenschweregrad zu den Pack-Years (B), PO-Faltenschweregrad zu den Pack-Years (C), Altersdifferenz zu den Pack-Years (D), Altersdifferenz zum 6MWD (E) und NL-Faltenschweregrad zum 6MWD (F) 113

Abb. 4.13: Beziehung der Altersdifferenz zu TLCO %Soll (A), TLC %Soll (B) und Tiffeneau-Index (C), Beziehung der Faltensumme zur TLCO %Soll (D), der Faltenschweregrade NL zu TLCO %Soll (E) und BODE-Score (F) 114

Abb. 4.14: Beziehung des Emphysemscores zu TLCO %Soll (A und B), TLC %Soll (C), zum Tiffeneau-Index (D und E), und BODE-Score (F) 117

Abb. 4.15: Beziehung der Leukozyten zur T/S Ratio (A), des CRP zur T/S Ratio (B), des Hämoglobins zur T/S Ratio (C), des HbA1c zu den AGEs (D), des CRPs zum LL-37 (E) und des Harnstoffs zu den AGEs (F) 119

Abb. 4.16: Beziehung des BMI zu den GOLD-Stadien (A), des BMI zu (vorhergesagtem) Emphysem (B), des Bauchumfangs zur T/S Ratio (C), des BMI zum geschätzten Alter (D), des BMI zur Differenz aus geschätztem Alter minus chronologischem Alter (E) und des BMI zu LL-37 (F) 121

Abb. 4.17: Beziehung der Altersdifferenz zu vorhergesagtem Emphysemscore 122

Abb. 4.18: Beziehung von Bauchumfang zum BMI in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem. Die Linien zeigen die Regressionsgeraden für die beiden Untergruppen mit und ohne vorhergesagtes Emphysem 126

Abb. 4.19: Beziehung von Altersdifferenz zum BMI in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem 126

Abb. 4.20: Beziehung des Raucherstatus zu LL-37 in Patienten mit und ohne CT-morphologisches Emphysem 128

Abb. 4.21: Beziehung der Differenz TLC minus VA zur TLCO %Soll in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem 131

Abb. 4.22: Beziehung der Altersdifferenz zur Differenz TLC minus VA in Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem 131

Abb. 4.23: Beziehung der Altersdifferenz zum BMI bei schwergradigen COPD-Patienten mit und ohne vorhergesagtes Emphysem 132

Abb. 4.24: Beziehung der Nervenleitgeschwindigkeit zu AGEs in Patienten mit und ohne Diabetes 135

Abb. 4.25: Beziehung des Harnsäurespiegels im Blut zu der T/S Ratio in Patienten mit und ohne Gicht 135

Abb. 4.26: Beziehung der TLCO %Soll zum FEV1 %Soll in Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel 139

Abb. 4.27: Beziehung der Altersdifferenz zur T/S Ratio in Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel 139

Abb. 4.28: Beziehung der Altersdifferenz zur TLCO %Soll in Patienten mit und ohne Alpha-1-Antitrypsinmangel 140

Abb. A1: Messpunkte am Fuß zur Ermittlung des Temperaturempfindens mittels Twin-Tip® (Tip-Therm) 183

Abb. A2: Schematischer Aufbau eines IMS [101] 184

Abb. A3: Platte 1 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie 185

Abb. A4: Platte 2 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie 186

Abb. A5: Platte 3 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie 187

Abb. A6: Platte 4 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie 188

Abb. A7: Platte 5 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie 189

Abb. A8: Platte 6 der Messungen der Telomerenlänge im Rahmen der Studie 190

7.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Anthropometrische Charakteristika der Patienten 73

Tab. 4.2: Lungenfunktionswerte der Probanden 75

Tab. 4.3: Zusätzliche funktionelle und Fragebogendaten der Patienten 77

Tab. 4.4: Komorbiditäten der Patienten 79

Tab. 4.5: Eingenommene Medikamentenklassen 81

Tab. 4.6: Daten der Polyneuropathie bei den Patienten 82

Tab. 4.7: Parameter der Hautalterung anhand von Fotos des Gesichts 86

Tab. 4.8: Marker des Alterns im Blut 90

Tab. 4.9: Standardlaborparameter der Patienten 92

Tab. 4.10: Zusammenfassende Darstellung der Korrelationen der verschiedenen Alterungsmarker miteinander 141

Tab. 4.11: Zusammenfassende Darstellung der Korrelationen der Alterungsmarker mit ausgewählten klinischen Charakteristika 141

Tab. 4.12: Zusammenfassende Darstellung der Korrelationen der GOLD-Stadien mit ausgewählten Patientencharakteristika 142

Tab. 4.13: Signifikanzen der Cyranose® 320 mit verschiedenen Alterungsmarkern bzw. klinischen Parametern 144

7.6 Literaturverzeichnis

1. Rabe, K.F., et al., *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007. **176**(6): p. 532-555.
2. Lopez, A.D., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections.* European Respiratory Journal, 2006. **27**(2): p. 397-412.
3. Murray, C.J.L. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study.* The Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-1504.
4. WHO. *The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012*. Fact sheet N°310 2014 Updated May 2014; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/.
5. GOLD. *Global Initiative for Chronic Obsrtuctive Lung Disease*. [cited 2015 20.02.2015]; Available from: http://www.goldcopd.com/.
6. Vestbo, J., et al., *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013. **187**(4): p. 347-365.
7. Agusti, A., et al., *Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort.* Respir Res, 2010. **11**: p. 122.
8. Burgel, P.R., J.L. Paillasseur, and N. Roche, *Identification of clinical phenotypes using cluster analyses in COPD patients with multiple comorbidities.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 420134.
9. Barnes, P.J. and B.R. Celli, *Systemic manifestations and comorbidities of COPD.* European Respiratory Journal, 2009. **33**(5): p. 1165-1185.
10. Divo, M., et al., *Comorbidities and Risk of Mortality in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2012. **186**(2): p. 155-161.
11. Franssen, F.M.E. and C.L. Rochester, *Comorbidities in patients with COPD and pulmonary rehabilitation: do they matter?* European Respiratory Review, 2014. **23**(131): p. 131-141.
12. Miller, J., et al., *Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort.* Respiratory Medicine, 2013. **107**(9): p. 1376-1384.
13. Schneider, K.M., B.E. O'Donnell, and D. Dean, *Prevalence of multiple chronic conditions in the United States' Medicare population.* Health Qual Life Outcomes, 2009. **7**: p. 82.
14. Stavem, K., et al., *Lung function, smoking and mortality in a 26-year follow-up of healthy middle-aged males.* European Respiratory Journal, 2005. **25**(4): p. 618-625.
15. Watz, H., et al., *The metabolic syndrome in patients with chronic bronchitis and COPD: frequency and associated consequences for systemic inflammation and physical inactivity.* Chest, 2009. **136**(4): p. 1039-46.
16. Bolton, C.E., et al., *Insulin Resistance and inflammation—A Further Systemic Complication of COPD.* COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2007. **4**(2): p. 121-126.
17. Vermeeren, M.A.P., et al., *Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD.* Respiratory Medicine, 2006. **100**(8): p. 1349-1355.
18. Gupta, R.K., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease and low bone mass: A case-control study.* Lung India, 2014. **31**(3): p. 217-20.
19. Jorgensen, N.R., et al., *The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease - A cross sectional study.* Respiratory Medicine, 2007. **101**(1): p. 177-185.
20. Butcher, S.J., J.M. Meshke, and M.S. Sheppard, *Reductions in functional balance, coordination, and mobility measures among patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.* J Cardiopulm Rehabil, 2004. **24**(4): p. 274-80.
21. Verdú, E., et al., *Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration.* Journal of the Peripheral Nervous System, 2000. **5**(4): p. 191-208.
22. Vrancken, A.F., et al., *The meaning of distal sensory loss and absent ankle reflexes in relation to age: a meta-analysis.* Journal of Neurology, 2006. **253**(5): p. 578-89.

23. Oncel, C., et al., *Peripheral neuropathy in chronic obstructive pulmonary disease.* COPD, 2010. **7**(1): p. 11-6.
24. Ulubay, G., et al., *Effects of peripheral neuropathy on exercise capacity and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary diseases.* Arch Med Sci, 2012. **8**(2): p. 296-302.
25. Gudmundsson, G., et al., *Risk factors for rehospitalisation in COPD: role of health status, anxiety and depression.* European Respiratory Journal, 2005. **26**(3): p. 414-419.
26. Miravitlles, M., et al., *Effect of exacerbations on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a 2 year follow up study.* Thorax, 2004. **59**(5): p. 387-395.
27. Charlson, M., et al., *Can Disease Management Target Patients Most Likely to Generate High Costs? The Impact of Comorbidity.* Journal of General Internal Medicine, 2007. **22**(4): p. 464-469.
28. Jorres, R.A., et al., *[Systemic manifestations and comorbidities in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and their effect on clinical state and course of the disease--an overview of the cohort study COSYCONET].* Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(10): p. 446-9.
29. Vanfleteren, L.E.G.W., et al., *Clusters of Comorbidities Based on Validated Objective Measurements and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013. **187**(7): p. 728-735.
30. Burgel, P.R., et al., *Two distinct chronic obstructive pulmonary disease (COPD) phenotypes are associated with high risk of mortality.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51048.
31. Gan, W.Q., et al., *Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis.* Thorax, 2004. **59**(7): p. 574-80.
32. Walter, R.E., et al., *Systemic inflammation and COPD: the Framingham Heart Study.* Chest, 2008. **133**(1): p. 19-25.
33. Provinciali, M., M. Cardelli, and F. Marchegiani, *Inflammation, chronic obstructive pulmonary disease and aging.* Curr Opin Pulm Med, 2011. **17 Suppl 1**: p. S3-10.
34. Lee, J., et al., *Is the aging process accelerated in chronic obstructive pulmonary disease?* Curr Opin Pulm Med, 2011. **17**(2): p. 90-7.
35. Karrasch, S., O. Holz, and R.A. Jorres, *Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema.* Respir Med, 2008. **102**(9): p. 1215-30.
36. Houben, J.M., et al., *Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease.* Respir Med, 2009. **103**(2): p. 230-6.
37. Amsellem, V., et al., *Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(12): p. 1358-66.
38. Panossian, L.A., et al., *Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status.* Neurobiol Aging, 2003. **24**(1): p. 77-84.
39. Bekaert, S., et al., *Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease.* Aging Cell, 2007. **6**(5): p. 639-47.
40. Sin, D.D. and S.F. Man, *Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality.* Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(1): p. 8-11.
41. von Zglinicki, T. and C.M. Martin-Ruiz, *Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases.* Curr Mol Med, 2005. **5**(2): p. 197-203.
42. von Figura, G., et al., *Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers.* J Mol Med, 2009. **87**(12): p. 1165-71.
43. Jiang, H., Z. Ju, and K.L. Rudolph, *Telomere shortening and ageing.* Z Gerontol Geriatr, 2007. **40**(5): p. 314-24.
44. Meguro, S., et al., *Plasma Antimicrobial Peptide LL-37 Level Is Inversely Associated with HDL Cholesterol Level in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus.* International Journal of Endocrinology, 2014.
45. Nakamichi, Y., et al., *Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss.* Odontology, 2014. **102**(2): p. 137-146.

46. Li, Y.F., *The role of antimicrobial peptides in cardiovascular physiology and disease.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **390**(3): p. 363-367.
47. Jiang, Y., et al., *Urokinase-type plasminogen activator system and human cationic antimicrobial protein 18 in serum and induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Respirology, 2010. **15**(6): p. 939-46.
48. Zhang, Y., et al., *The human cathelicidin LL-37 enhances airway mucus production in chronic obstructive pulmonary disease.* Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(1): p. 103-9.
49. Jiang, H., et al., *Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11299-304.
50. Makita, Z., et al., *Advanced Glycosylation End Products in Patients with Diabetic Nephropathy.* New England Journal of Medicine, 1991. **325**(12): p. 836-842.
51. Nowotny, K., et al., *Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging.* Experimental Gerontology, 2014. **57**(0): p. 122-131.
52. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.
53. Hegab, Z., et al., *Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease.* World Journal of Cardiology, 2012. **4**(4): p. 90-102.
54. Jacobson, J., et al., *Biomarkers of aging in Drosophila.* Aging Cell, 2010. **9**(4): p. 466-77.
55. Stogsdill, M.P., et al., *Conditional Overexpression of Receptors for Advanced Glycation End-Products in the Adult Murine Lung Causes Airspace Enlargement and Induces Inflammation.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2013. **49**(1): p. 128-134.
56. Cardoso, W.V., et al., *Collagen and elastin in human pulmonary emphysema.* Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(4): p. 975-81.
57. Zhang, F., et al., *The Novel Function of Advanced Glycation End Products in Regulation of MMP-9 Production.* Journal of Surgical Research, 2011. **171**(2): p. 871-876.
58. Wu, L., et al., *Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD.* Respiratory Medicine, 2011. **105**(3): p. 329-336.
59. Tahara, N., et al., *Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects.* Cardiovasc Ther, 2012. **30**(1): p. 42-8.
60. Zhou, H., et al., *Increased serum advanced glycation end products are associated with impairment in HDL antioxidative capacity in diabetic nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(3): p. 927-33.
61. Masaki, H., Y. Okano, and H. Sakurai, *Generation of Active Oxygen Species from Advanced Glycation End-Products (AGE) under Ultraviolet Light A (UVA) Irradiation.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **235**(2): p. 306-310.
62. Okano, Y., H. Masaki, and H. Sakurai, *Dysfunction of dermal fibroblasts induced by advanced glycation end-products (AGES) and the contribution of a nonspecific interaction with cell membrane and AGES.* Journal of Dermatological Science, 2002. **29**(3): p. 171-180.
63. Lohwasser, C., et al., *The receptor for advanced glycation end products is highly expressed in the skin and upregulated by advanced glycation end products and tumor necrosis factor-alpha.* Journal of Investigative Dermatology, 2006. **126**(2): p. 291-299.
64. Avery, N.C. and A.J. Bailey, *The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen.* Pathol Biol (Paris), 2006. **54**(7): p. 387-95.
65. Jeanmaire, C., L. Danoux, and G. Pauly, *Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitro model study.* British Journal of Dermatology, 2001. **145**(1): p. 10-18.
66. DeGroot, J., et al., *Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: the role of advanced glycation end products.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(11): p. 2562-71.
67. Sandberg, L.B., N.T. Soskel, and J.G. Leslie, *Elastin Structure, Biosynthesis, and Relation to Disease States.* New England Journal of Medicine, 1981. **304**(10): p. 566-579.

68. Gkogkolou, P. and M. Bohm, *Advanced glycation end products: Key players in skin aging?* Dermatoendocrinol, 2012. **4**(3): p. 259-70.
69. Cerami, C., et al., *Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(25): p. 13915-13920.
70. Nicholl, I.D., et al., *Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers.* Mol Med, 1998. **4**(9): p. 594-601.
71. Lange, P. and P. Schnohr, *The relationship between facial wrinkling and airflow obstruction.* Int J Dermatol, 1994. **33**(2): p. 123-6.
72. McAllister, D.A., et al., *Arterial Stiffness Is Independently Associated with Emphysema Severity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007. **176**(12): p. 1208-1214.
73. Maclay, J.D., et al., *Systemic elastin degradation in chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax, 2012. **67**(7): p. 606-612.
74. Patel, B.D., et al., *Smoking related COPD and facial wrinkling: is there a common susceptibility?* Thorax, 2006. **61**(7): p. 568-571.
75. Daniell, H.W., *Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet".* Ann Intern Med, 1971. **75**(6): p. 873-80.
76. Carruthers, A., et al., *A validated grading scale for crow's feet.* Dermatol Surg, 2008. **34 Suppl 2**: p. S173-8.
77. Carruthers, A., et al., *A validated grading scale for forehead lines.* Dermatol Surg, 2008. **34 Suppl 2**: p. S155-60.
78. Carruthers, A. and J. Carruthers, *A validated facial grading scale: The future of facial ageing measurement tools?* Journal of Cosmetic and Laser Therapy, 2010. **12**(5): p. 235-241.
79. Rzany, B., et al., *Validated composite assessment scales for the global face.* Dermatol Surg, 2012. **38**(2 Spec No.): p. 294-308.
80. Carruthers, J., et al., *Validated assessment scales for the mid face.* Dermatol Surg, 2012. **38**(2 Spec No.): p. 320-32.
81. Flynn, T.C., et al., *Validated assessment scales for the upper face.* Dermatol Surg, 2012. **38**(2 Spec No.): p. 309-19.
82. Narins, R.S., et al., *Validated assessment scales for the lower face.* Dermatol Surg, 2012. **38**(2 Spec No.): p. 333-42.
83. Buszewski, B., et al., *Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases.* Biomed Chromatogr, 2007. **21**(6): p. 553-66.
84. Dragonieri, S., et al., *An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(4): p. 856-62.
85. Dragonieri, S., et al., *An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD.* Lung Cancer, 2009. **64**(2): p. 166-70.
86. Fens, N., et al., *Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(11): p. 1076-82.
87. Greiter, M.B., et al., *Differences in exhaled gas profiles between patients with type 2 diabetes and healthy controls.* Diabetes Technol Ther, 2010. **12**(6): p. 455-63.
88. McGrath, L.T., R. Patrick, and B. Silke, *Breath isoprene in patients with heart failure.* European Journal of Heart Failure, 2001. **3**(4): p. 423-427.
89. Van Berkel, J.J.B.N., et al., *A profile of volatile organic compounds in breath discriminates COPD patients from controls.* Respiratory Medicine, 2010. **104**(4): p. 557-563.
90. Fens, N., et al., *Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD.* European Respiratory Journal, 2011. **38**(6): p. 1301-1309.
91. Basanta, M., et al., *Exhaled volatile organic compounds for phenotyping chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study.* Respiratory Research, 2012. **13**(1): p. 72.
92. Garcia-Aymerich, J., et al., *Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subtypes.* Thorax, 2011. **66**(5): p. 430-437.

93. Anderson, D. and W. Macnee, *Targeted treatment in COPD: a multi-system approach for a multi-system disease.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2009. **4**: p. 321-35.
94. Wanger, J., et al., *Standardisation of the measurement of lung volumes.* Eur Respir J, 2005. **26**(3): p. 511-22.
95. Miller, M.R., et al., *Standardisation of spirometry.* Eur Respir J, 2005. **26**(2): p. 319-38.
96. Macintyre, N., et al., *Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung.* Eur Respir J, 2005. **26**(4): p. 720-35.
97. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): p. e47.
98. Cawthon, R.M., *Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method.* Nucleic Acids Research, 2009. **37**(3): p. e21.
99. Tackney, J., et al., *Blood cell telomere lengths and shortening rates of chimpanzee and human females.* American Journal of Human Biology, 2014. **26**(4): p. 452-460.
100. Jodczyk, S., *Establishment and validation of a telomere length assay*, 2011, University of Otago: Christchurch, New Zealand.
101. Nguyen-Huu, K.-D., *Technischer Vergleich dreier elektronischer Nasen und ihre Anwendung in Diagnostik und Monitoring*, in *Medizinische Fakultät* 2014, LMU München.
102. *Cyrano Sciences, I., ed. The Cyranose 320 Electronic Nose User's Manual. 2001.*
103. Thome, J., *Messung der Ausatemluft mittels Elektronischer Nase: Etablierung der Methode und Anwendung bei Patienten mit Diabetes mellitus*, in *Medizinischen Fakultät*2014, Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
104. Quanjer, P.H., et al., *Lung volumes and forced ventilatory flows.* European Respiratory Journal, 1993. **6**(Suppl 16): p. 5-40.
105. Quanjer, P.H., et al., *Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3–95-yr age range: the global lung function 2012 equations.* European Respiratory Journal, 2012. **40**(6): p. 1324-1343.
106. © ÄZQ, B., KBV und AWMF 2013 (Quelle: Bundeärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Vereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachangestellten (AWMF). *Nationale VersorgungsLeitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter – Kurzfassung. Version 1.0. 2012*. 2013 01.09.2013; Available from: http://www.versorgunsleitline.de, http://www.awmf-leitlinien.de.
107. R.A. Jörres, F.B., C. Vogel, H.-U. Kauczor, J. Biederer, B. Jobst, J. Heinrich, A. Koch, H. Watz, T. Welte, C. Vogelmeier, *Prediction of Emphysema from Lung Function Parameters and Chest CT Scans Obtained in Clinical Routine: Results of the German COSYCONET Study*, in *Abstract 67251 (ATS Meeting 2015)* 2014.
108. Ortiz, A. and S.A. Grando, *Smoking and the skin.* Int J Dermatol, 2012. **51**(3): p. 250-62.
109. Muller, K.-C., et al., *Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro.* Respiratory Research, 2006. **7**(1): p. 32.
110. Holz, O., et al., *Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture.* European Respiratory Journal, 2004. **24**(4): p. 575-579.
111. Müller, K.-C., et al., *In contrast to lung fibroblasts – no signs of senescence in skin fibroblasts of patients with emphysema.* Experimental Gerontology, 2008. **43**(7): p. 623-628.
112. Tsuji, T., K. Aoshiba, and A. Nagai, *Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(8): p. 886-93.
113. Zhou, S., et al., *Aging does not Enhance Experimental Cigarette Smoke-Induced COPD in the Mouse.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71410.
114. Nilsson, P.M., *Early vascular aging (EVA): consequences and prevention.* Vasc Health Risk Manag, 2008. **4**(3): p. 547-52.
115. Klinkhammer, B.M., et al., *Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential.* PLoS One, 2014. **9**(3).
116. Ksiazek, K., et al., *Accelerated senescence of human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose: the role of TGF-[beta]1.* Lab Invest, 2007. **87**(4): p. 345-356.

117. Liu, J., et al., *Receptor for advanced glycation end-products promotes premature senescence of proximal tubular epithelial cells via activation of endoplasmic reticulum stress-dependent p21 signaling.* Cellular Signalling, 2014. **26**(1): p. 110-121.
118. Barnes, P.J., *Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease.* Clin Chest Med, 2014. **35**(1): p. 71-86.
119. Pawelec, G., D. Goldeck, and E. Derhovanessian, *Inflammation, ageing and chronic disease.* Curr Opin Immunol, 2014. **29**: p. 23-8.
120. Chandra, D., et al., *THe relationship between pulmonary emphysema and kidney function in smokers.* Chest, 2012. **142**(3): p. 655-662.
121. Funakoshi, Y., et al., *C-reactive protein levels, airflow obstruction, and chronic kidney disease.* Environmental Health and Preventive Medicine, 2012. **17**(1): p. 18-26.
122. van Gestel, Y.R., et al., *Association between chronic obstructive pulmonary disease and chronic kidney disease in vascular surgery patients.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(9): p. 2763-7.
123. Singh, V.P., et al., *Advanced glycation end products and diabetic complications.* Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(1): p. 1-14.
124. Gopal, P., et al., *Plasma advanced glycation end-products and skin autofluorescence are increased in COPD.* European Respiratory Journal, 2014. **43**(2): p. 430-438.
125. Sukkar, M.B. and D.S. Postma, *Receptor for Advanced Glycation End Products and Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products: A Balancing Act in Chronic Obstructive Pulmonary Disease?* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013. **188**(8): p. 893-894.
126. Cheng, D.T., et al., *Systemic Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts Is a Biomarker of Emphysema and Associated with AGER Genetic Variants in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013. **188**(8): p. 948-957.
127. Urban, M.H., et al., *Soluble receptor of advanced glycation end-products and endothelial dysfunction in COPD.* Respiratory Medicine, 2014. **108**(6): p. 891-897.
128. Hoonhorst, S.J.M., et al., *Advanced glycation end products in the skin are enhanced in COPD.* Metabolism, 2014. **63**(9): p. 1149-1156.
129. Stanley, A.C., et al., *Pressure-induced cellular senescence: A mechanism linking venous hypertension to venous ulcers1.* Journal of Surgical Research, 2005. **124**(1): p. 112-117.
130. Pfisterer, L., et al., *Pathogenesis of varicose veins - lessons from biomechanics.* Vasa, 2014. **43**(2): p. 88-99.
131. Roca, F., et al., *Glycation: the angiogenic paradox in aging and age-related disorders and diseases.* Ageing Res Rev, 2014. **15**: p. 146-60.
132. Jandeleit-Dahm, K. and M.E. Cooper, *The role of AGEs in cardiovascular disease.* Curr Pharm Des, 2008. **14**(10): p. 979-86.
133. Thomas, M.C., et al., *The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease.* Curr Drug Targets, 2005. **6**(4): p. 453-74.
134. MacNee, W., *Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).* Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 4): p. 819-23.
135. Clynes, R., et al., *Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response.* Curr Mol Med, 2007. **7**(8): p. 743-51.
136. Ramasamy, R., S.F. Yan, and A.M. Schmidt, *Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications.* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1243**: p. 88-102.
137. Yan, S.F., et al., *Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging.* Curr Mol Med, 2007. **7**(8): p. 699-710.
138. Pertynska-Marczewska, M. and Z. Merhi, *Relationship of Advanced Glycation End Products With Cardiovascular Disease in Menopausal Women.* Reproductive Sciences, 2014.

139. Piperi, C., et al., *AGE/RAGE signalling regulation by miRNAs: Associations with diabetic complications and therapeutic potential.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015. **60**(0): p. 197-201.
140. Golec, M., *Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide.* Ann Agric Environ Med, 2007. **14**(1): p. 1-4.
141. Dombrowski, Y. and J. Schauber, *Cathelicidin LL-37: a defense molecule with a potential role in psoriasis pathogenesis.* Exp Dermatol, 2012. **21**: p. 327 - 330.
142. Chiang, Y.Y. and H.W. Lin, *Association between psoriasis and chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study in Taiwan.* Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2012. **26**(1): p. 59-65.
143. Jiang, Y.-Y., et al., *The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.* Respiratory Medicine, 2012. **106**(12): p. 1680-1689.
144. Bozinovski, S., D. Anthony, and R. Vlahos, *Targeting pro-resolution pathways to combat chronic inflammation in COPD.* J Thorac Dis, 2014. **6**(11): p. 1548-56.
145. Castañeda-Delgado, J.E., et al., *Production of antimicrobial peptides is preserved in aging.* Clinical Immunology, 2013. **148**(2): p. 198-205.
146. Kilsgård, O., et al., *Peptidylarginine Deiminases Present in the Airways during Tobacco Smoking and Inflammation Can Citrullinate the Host Defense Peptide LL-37, Resulting in Altered Activities.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2012. **46**(2): p. 240-248.
147. Benachour, H., et al., *Association of human cathelicidin (hCAP-18/LL-37) gene expression with cardiovascular disease risk factors.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(10): p. 720-8.
148. Babizhayev, M.A., et al., *Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior.* Am J Ther, 2011. **18**(6).
149. Shaw, J.G., et al., *Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).* Journal of Thoracic Disease, 2014. **6**(11): p. 1532-1547.
150. Kong, C.M., X.W. Lee, and X. Wang, *Telomere shortening in human diseases.* Febs J, 2013. **280**(14): p. 3180-93.
151. Savage, S.A. and A.A. Bertuch, *The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders.* Genet Med, 2010. **12**(12): p. 753-64.
152. Calado, R.T. and B. Dumitriu, *Telomere dynamics in mice and humans.* Semin Hematol, 2013. **50**(2): p. 165-74.
153. O'Callaghan, N.J. and M. Fenech, *A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length.* Biol Proced Online, 2011. **13**: p. 3.
154. Bojesen, S.E., *Telomeres and human health.* J Intern Med, 2013. **274**(5): p. 399-413.
155. Albrecht, E., et al., *Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease.* European Respiratory Journal, 2014. **43**(4): p. 983-992.
156. Dlouha, D., et al., *Comparison of the relative telomere length measured in leukocytes and eleven different human tissues.* Physiol Res, 2014. **63**(3): p. S343-50.
157. Spyridopoulos, I., et al., *Telomere gap between granulocytes and lymphocytes is a determinant for hematopoetic progenitor cell impairment in patients with previous myocardial infarction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 968-74.
158. Cawthon, R.M., et al., *Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older.* Lancet, 2003. **361**(9355): p. 393-5.
159. Farzaneh-Far, R., et al., *Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1379-84.
160. Brouilette, S.W., et al., *Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study.* Lancet, 2007. **369**(9556): p. 107-14.
161. Cassidy, A., et al., *Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women.* The American Journal of Clinical Nutrition, 2010. **91**(5): p. 1273-1280.

162. Cherkas, L.F., et al., *The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length.* Arch Intern Med, 2008. **168**(2): p. 154-8.
163. Epel, E.S., et al., *Accelerated telomere shortening in response to life stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17312-5.
164. Weischer, M., S.E. Bojesen, and B.G. Nordestgaard, *Telomere Shortening Unrelated to Smoking, Body Weight, Physical Activity, and Alcohol Intake: 4,576 General Population Individuals with Repeat Measurements 10 Years Apart.* PLoS Genet, 2014. **10**(3): p. e1004191.
165. Brouilette, S.W., et al., *Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis.* Heart, 2008. **94**(4): p. 422-5.
166. Morlá, M., et al., *Telomere shortening in smokers with and without COPD.* European Respiratory Journal, 2006. **27**(3): p. 525-528.
167. O'Donnell, C.J., et al., *Leukocyte telomere length and carotid artery intimal medial thickness: the Framingham Heart Study.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(6): p. 1165-71.
168. Savale, L., et al., *Shortened Telomeres in Circulating Leukocytes of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2009. **179**(7): p. 566-571.
169. Ishii, T., A. Gemma, and K. Kida, *Senescence is involved in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease through effects on telomeres and the anti-aging molecule fibroblast growth factor 23.* Geriatr Gerontol Int, 2014. **26**(10): p. 12354.
170. Lee, J., et al., *The Relationship between Telomere Length and Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35567.
171. Den Elzen, W.P., et al., *Telomere length and anaemia in old age: results from the Newcastle 85-plus Study and the Leiden 85-plus Study.* Age Ageing, 2011. **40**(4): p. 494-500.
172. Yin, L., A. Morita, and T. Tsuji, *Skin premature aging induced by tobacco smoking: the objective evidence of skin replica analysis.* Journal of Dermatological Science, 2001. **27**(1): p. S26-31.
173. Just, M., et al., *Relationships between lung function, smoking and morphology of dermal elastic fibres.* Exp Dermatol, 2005. **14**(10): p. 744-51.
174. Park, B.H., et al., *Facial wrinkles as a predictor of decreased renal function.* Nephrology, 2008. **13**(6): p. 522-7.
175. Agrawal, D., et al., *Subclinical peripheral neuropathy in stable middle-aged patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Singapore Med J, 2007. **48**(10): p. 887-94.
176. Goss, J.R., et al., *Premature aging-related peripheral neuropathy in a mouse model of progeria.* Mech Ageing Dev, 2011. **132**(8-9): p. 437-42.
177. Saferali, A., et al., *Longer Telomere Length in COPD Patients with α₁-Antitrypsin Deficiency Independent of Lung Function.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95600.

8 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Rudolf A. Jörres, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für seine Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Für die wissenschaftliche Unterstützung bedanke ich mich bei den Mitarbeitern bzw. ehemaligen Mitarbeitern des Instituts und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der LMU München, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak, sowie bei Herrn Dr. S. Karrasch und Frau Dipl.-Biol. Marietta Truger für die Implementierung der Studie COSYCONET in der LMU/Innenstadt und die Überlassung der bis zum 15.03.2012 gesammelten Daten.

Frau CTA A. Kronseder möchte ich besonders für die gründliche Einarbeitung in die molekularbiologischen und biochemischen Verfahrenstechniken danken und auch dafür, dass sie mit produktiven Ideen und Vorschlägen die Etablierung der Telomeren-Messmethode wesentlich unterstützt hat. Frau MTA D. de la Motte danke ich für die Einarbeitung in die Methoden der Lungenfunktionsmessungen.

Mein Dank gilt außerdem Frau M. Drost, Frau S. Jerkic und Herrn F. Gerhardinger sowie den Ärzten der Ambulanz des Instituts und der Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin des Klinikums der LMU München. Insbesondere möchte ich Frau Oberärztin Dr. U. Ochmann, Herrn Dr. M. Demmeler, Frau Dr. R. Petru, Herrn Dr. T. Benthaus und Frau Dr. S. Pöschinger dafür danken, dass sie mich jederzeit unterstützt haben.

Für die organisatorische Zuarbeit danke ich der Studienzentrale in Marburg, insbesondere Frau Dr. S. Söhler und Frau I. Kokot sowie den COSYCONET-Mitarbeitern an der MHH Hannover, vor allem Frau N. Adaskina und Herrn F. Biertz.

Für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Probanden danke ich ebenfalls der Studienzentrale in Marburg und den in der Region München niedergelassenen Pneumologen, insbesondere der Praxis Dr. med. Christoph Köhl sowie der internistischen Praxisgemeinschaft Dr. Dichtl, Dr. Marschall, Dr. Centner.

Weiterhin danke ich Frau K. Ernst und Frau U. Schürmann sowie allen weiteren Mitarbeitern der Lungenfunktion/Ambulanz der Sektion Pneumologie Innenstadt u. Thorakale Onkologie für die Hilfe bei der Rekrutierung. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Rudolf Maria Huber für die Unterstützung der Implementierung der COSYCONET-Kohorte an der LMU München.

Des Weiteren danke ich dem Team der Diabetischen Fußambulanz der LMU München dafür, dass sie mich in die Durchführung der Messungen mittels Stimmgabel und Monofilament eingeführt haben. Der Kardiologischen Ambulanz am Campus Innenstadt danke ich für die echokardiographischen Messungen und den geduldigen Umgang mit den Patienten.

Frau Prof. Dr. med. Martina Kerscher möchte ich für die Bewertung der Hautalterung anhand der fotografischen Aufnahmen ganz herzlich danken, da dies die Arbeit wesentlich gefördert hat.

Für die finanzielle Unterstützung gilt mein Dank dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), das die COSYCONET-Studie finanziert, sowie der Friedrich-Baur-Stiftung der LMU München, die die Analyse der Biomarker und die Messung der Polyneuropathie unterstützt hat.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Probanden, die bereitwillig an der Studie teilnahmen, das aufwendige Untersuchungsprogramm mehrfach mitmachten und somit diese Arbeit erst ermöglichten.