

**Aus der Medizinischen Klinik III  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. P. Zabel**

---

**Fraktioniertes endexpiratorisches Stickstoffmonoxid als Marker für  
Entzündung im unteren Respirationstrakt bei ambulant  
erworbener Pneumonie**

**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -**

**vorgelegt von  
Claudia Maria Jungnitz  
aus Herdecke**

**Lübeck 2009**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Dalhoff

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Cordula Stamme

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.09.2010

1	Einleitung.....	3
1.1	Stickstoffmonoxid.....	3
1.1.1	Stickstoffmonoxid.....	3
1.1.2	Stickstoffmonoxidsynthese.....	4
1.2	Pneumonie.....	6
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	6
1.2.2	Pathogenese.....	8
1.2.3	Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr bei Pneumonie.....	9
1.3	Fragestellung und Zielsetzung.....	13
2	Methoden.....	15
2.1	Studiendesign.....	15
2.1.1	Einschlusskriterien.....	15
2.1.2	Ausschlusskriterien.....	16
2.2	Prinzip der Stickstoffmonoxid-Messung.....	16
2.3	Empfehlungen der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) für die standardisierte Messung von exhalierem NO, das aus dem unteren Respirationstrakt stammt	21
2.4	Sputumgewinnung.....	22
2.5	Sputumaufbereitungen.....	22
2.5.1	Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	23
2.5.2	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	24
2.5.3	Durchführung der Messungen.....	26
2.5.4	Expression der Oberflächenmoleküle auf Neutrophilen im Vergleich zur Neutrophilenzahl und -konzentration.....	28
2.5.5	Expression der Oberflächenmoleküle auf Neutrophilen im Vergleich untereinander.....	29
2.6	Enzyme-linked-immuno-sorbant-assay (ELISA).....	30
2.6.1	Prinzip des ELISAs.....	30
2.6.2	Durchführung des ELISAs.....	31
2.7	Statistik.....	31
3	Material.....	32
3.1	Geräte.....	32
3.2	Durchflusszytometrie.....	32
3.3	Sputumaufbereitung.....	33
3.4	ELISA.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Untersuchungskollektiv.....	34
4.2	FENO-Messung bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zu Gesunden.....	35
4.2.1	FENO bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zu systemischen Entzündungsparametern.....	37

4.2.2	FENO bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zu lokalen Entzündungsparametern .....	37
4.3	FENO-Werte im Verlauf .....	39
4.4	Einfluss einer begleitenden Glucocorticoidtherapie auf die FENO-Messung .....	40
4.5	Einfluss der antibiotischen Therapie auf die FENO-Messung .....	41
4.6	Zusammenhang zwischen FENO-Konzentration und Verweildauer.....	42
5	Diskussion.....	44
6	Zusammenfassung .....	50
7	Literatur .....	52
8	Anhang.....	58
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	58
8.2	Tabellenverzeichnis.....	60
8.3	Danksagung .....	61
8.4	Lebenslauf .....	62
8.5	Veröffentlichung .....	63

# **1 Einleitung**

## **1.1 Stickstoffmonoxid**

### **1.1.1 Stickstoffmonoxid**

Seitdem im Jahr 1987 Palmer et al. (Palmer et al., 1987) sowie Ignarro et al. (Ignarro et al., 1987) unabhängig voneinander postulierten, dass der sogenannte Endothelium-Derived Growth Factor (ERDF) Stickstoffmonoxid (NO) ist, wurde diesem eine Schlüsselrolle in verschiedenen Organsystemen zugesprochen. So wirkt NO beispielsweise bei der Relaxation glatter Muskulatur, Neurotransmission, Plättcheninhibition, Tumorzelllyse, Abtöten von Pathogenen und Hormonfreisetzung (Gaston et al., 1994) mit. Darüber hinaus ist NO ein proinflammatorischer und immunmodulatorischer Mediator, der im Respirationstrakt zusätzlich über bronchoprotektive Effekte, wie die Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur und Inhibition ihrer Proliferation verfügt (Ricciardolo, 2003). Da NO nicht oder in nur sehr geringem Maße aus den pulmonalen Kapillaren in den Alveolarraum diffundiert, spiegelt das exhalierete NO die NO-Produktion im Gewebe selbst wieder (Adrie et al., 2001).

Mit Hilfe des Prinzips der Chemilumineszenz, das im Methodenteil näher erläutert wird, kann die Konzentration des NO in der Ausatemluft bestimmt werden. Diese kann entweder in der sogenannten Echtzeitmessung (Online-Messung) direkt während der Exhalation gemessen werden, oder als Offline-Messung, bei der das Exhalat in einem Ballon gesammelt wird, bis zu 48 Stunden nach Entnahme der Probe bestimmt werden. Bei der Online-Messung kann durch das gleichzeitige Bestimmen der molaren Masse, die sich proportional zur Kohlenstoffdioxidkonzentration verhält, zugeordnet werden, welchem Abschnitt des Respirationstraktes die ausgeatmete Luft entstammt.

Den diagnostischen Wert dieser nicht-invasiven Methode, Inflammation der Atemwege zu bewerten, hat man sich bei Atemwegserkrankungen zunutze gemacht. Bei Asthmapatienten zeigen verschiedene Studien, dass durch die Bestimmung der NO-Konzentration im Exhalat nicht nur der Schweregrad der Erkrankung bewertet, sondern auch Aussagen im Hinblick auf die Prognose und das Ansprechen auf Glucocorticoide getroffen werden können (Ricciardolo, 2003; Kharitonov und Barnes, 2006; Schafroth et al., 2007). Weitere Atemwegserkrankungen, die mit veränderter NO-Konzentration im Exhalat einhergehen, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bei Patienten mit chronisch obstruktiver

Lungenerkrankung (COPD) haben Messungen des fraktionierten exhalieren Stickstoffmonoxids bisher widersprüchliche Ergebnisse gezeigt (Schafroth et al., 2007).

**Tabelle 1:** Erkrankungen, die mit veränderten NO-Konzentrationen einhergehen.  
Adaptiert nach Kharitonov, Barnes und Ortega (Kharitonov und Barnes, 2000; Ortega, 2000)

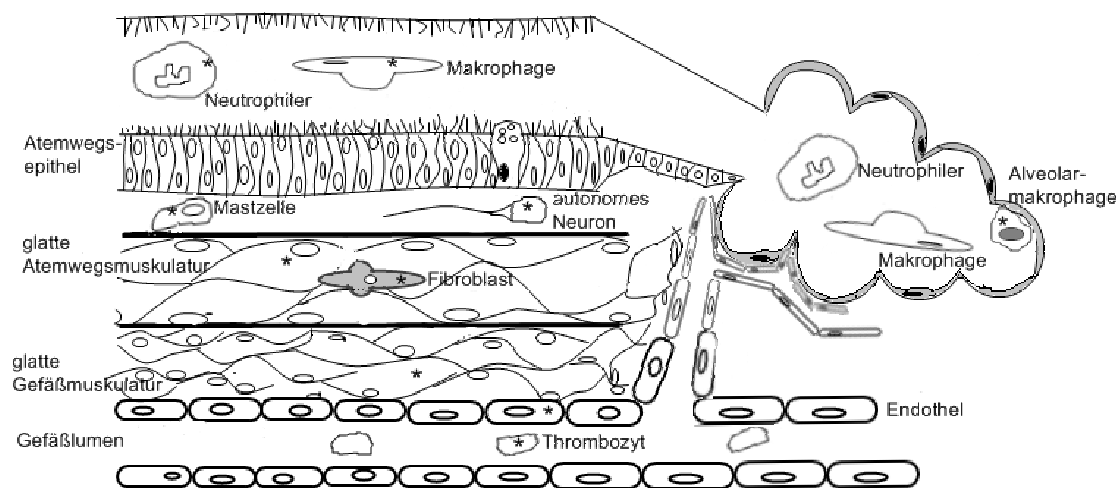
Erkrankungen mit erhöhten FENO-Werten	Erkrankungen mit erniedrigten FENO-Werten
Asthma	cystische Fibrose
Allergische Rhinitis	primäre ziliäre Dyskinesie
Virale respiratorische Infekte	pulmonaler Hochdruck
Bronchiektasien	HIV-Infektion
Beatmungsassoziierte Pneumonie	
Infektion der oberen Atemwege	
Lungenkrebs	
Tuberkulose	
Aktive Sarkoidose	
Interstitielle pulmonale Fibrose (IPF)	
Instabile Lungenfunktion bei Transplantierten	
Lupus erythematodes	
Leberzirrhose	
Colitis ulcerosa	

### 1.1.2 Stickstoffmonoxidsynthese

NO wird in unterschiedlichen Zellen des Respirationstraktes produziert, dazu zählen Epithelzellen, Leukozyten (Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen und Mastzellen), autonome Nervenzellen und vaskuläres Endothel (Ricciardolo, 2003). Es wird durch die NO-Synthase (NOS) gebildet, ein Enzym, das die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin katalysiert und so NO freisetzt (Brindicci et al., 2007). Es werden drei Arten der NOS unterschieden.

Die konstitutive NOS (cNOS), die Calcium- und Calmodulin-abhängig ist und nach Rezeptorstimulation durch Acetylcholin, Bradykinin und Histamin innerhalb von Sekunden NO in Konzentrationen von femto- oder picomol freisetzt, wird unterteilt in

neuronale (nNOS/NOS1) und endotheliale (NOS3) NOS. Dieser gegenüber steht die induzierbare, Calcium-unabhängige NOS (iNOS/NOS2). Sie wird auf Ebene der Transkription reguliert, die durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$ , Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$  gesteigert wird. Durch die iNOS werden höhere Konzentrationen an NO (nanomol) produziert. Es existieren somit drei Isoformen der NOS, wobei die cNOS in Thrombozyten, neuronalen, epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert wird. Die Expression der iNOS wurde in Makrophagen, Neutrophilen, Hepatozyten, Mesangium, Endothel, Epithel und Zellen der glatten Gefäßmuskulatur beschrieben ( Nevin und Broadley, 2002; Ricciardolo, 2003; Holz et al., 2007).



**Abbildung 1:** Darstellung von Zellen in der Lunge, die über eine NO-Synthase verfügen. Die mit \* markierten Zellen sind zur NO-Produktion fähig (Gaston et al., 1994). Die in der Skizze verwendeten Größenverhältnisse sind nicht originalgetreu. Modifiziert nach Gaston et al.

Den konstitutiven Isoformen der NOS wird eine Schutzfunktion vor übermäßiger Bronchokonstriktion zugesprochen, während die iNOS, deren Expression durch Glucocorticoide gehemmt werden kann, eine Rolle bei der Modulation von entzündlichen Atemwegserkrankungen spielt (Kitsiopoulou et al., 2007). So bewirken hohe NO-Konzentrationen, die von der iNOS freigesetzt werden, die Abtötung von Tumorzellen und die Verzögerung der Virusreplikation. Weiterhin führt NO zur Abtötung oder Inhibition des Wachstums einer Reihe von Pilzen, Parasiten und Bakterien einschließlich

*Mycobacterium tuberculosis*. Dieser Effekt beruht auf der Hemmung der DNA-Synthese durch Inaktivierung der Ribonukleotidreduktase oder durch direkte Desaminierung der DNA (Ricciardolo, 2003). Außerdem spielt die Reaktion von NO mit anderen Substraten eine bedeutende Rolle für seine inaktivierende und beschädigende Wirkung. Ein wichtiger Reaktionspartner des NO ist Sauerstoffsuperoxid, dessen Bedeutung im Rahmen des respiratory burst näher erläutert wird (siehe 1.2.3 Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr bei Pneumonie). Darüber hinaus konnte bei Asthma bronchiale gezeigt werden, dass das von Makrophagen und Epithelzellen produzierte NO einen inhibitorischen Effekt auf Th1-Helferzellen ausübt, wodurch diese weniger Th2-supprimierendes IFN- $\gamma$  produzieren. Die daraus resultierende Th2-Zellaktivität führt zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-4 und -5, was zu einer gesteigerten IgE-Bildung und Eosinophilenrekrutierung in den Atemwegen führt (Barnes und Liew, 1995). Stickstoffmonoxid (NO) wird im gesamten Respirationstrakt produziert, wobei die Werte im nasalen Kompartiment mit 1000-10000 ppb (ppb = pars per billion) deutlich höher liegen als im unteren Respirationstrakt (5-200 ppb) (Holz et al., 2007).

## **1.2 Pneumonie**

### **1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Pneumonien sind entzündliche Erkrankungen der Lunge, die den Alveolarraum oder das Interstitium betreffen. Durch Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) ausgelöst, stellen sie weltweit die dritthäufigste Todesursache dar. In Deutschland wird die Zahl der ambulant erworbenen Pneumonien auf etwa 1-11/1000 Einwohner pro Jahr geschätzt, wobei die Dunkelziffer aufgrund von fehlender Meldepflicht hoch ist. Die Inzidenz bei Patienten über 60 Jahren liegt deutlich höher als bei Patienten in jüngeren Altersgruppen, bei Altenheimbewohnern wird die Inzidenz auf 68-114/1000 geschätzt (Huntemann und Lorenz, 2008).

Pneumonien können nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden:

1. Klinisch erfolgt die Unterscheidung von primärer und sekundärer Pneumonie, wobei bei der Letzteren eine prädisponierende Erkrankung zugrunde liegt, die das Entstehen der Pneumonie begünstigt (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Pulmonale und extrapulmonale Erkrankungen sowie Immundefizienz als Risikofaktoren für Pneumonien.

<b>Pulmonale Risikofaktoren</b>	<b>Extrapulmonale Risikofaktoren</b>
Bronchialkarzinom	Alkoholismus
Bronchiektasen	hohes Alter
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	Leberzirrhose
Mukoviszidose	Diabetes mellitus
Lungenfibrose	Niereninsuffizienz
Pneumokoniose	Herzinsuffizienz
<b>Immundefizienz</b>	
HIV-Infektion	
Therapie mit Immunsuppressiva oder Glucocorticoiden	
Lymphome, Leukämie, Tumorleiden	
Chemotherapie	
Antikörpermangel-Syndrom	

2. Eine weitere klinische Einteilung kann anhand der Symptome in typische und atypische Pneumonie erfolgen. Der klassische Erreger der typischen Pneumonie, die sich mit plötzlich beginnendem Fieber, Schüttelfrost, produktivem Husten mit eitrigem Auswurf, Dyspnoe und Thoraxschmerzen manifestiert, ist *Streptococcus pneumoniae*, während atypische Pneumonien vorwiegend durch *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Legionella pneumophila* verursacht werden. Die ätiologische Einteilung nach dem verursachenden Erreger spielt im klinischen Alltag nur eine untergeordnete Rolle, da der Erregernachweis in 40-60% der Fälle nicht gelingt (Huntemann und Lorenz, 2008).

3. Nach dem Entstehungsort können Pneumonien in ambulant erworbene und nosokomial unterteilt werden. Diese Einteilung spielt insbesondere in Hinblick auf das Erregerspektrum und Antibiotikaresistenzen eine wichtige Rolle.

Ambulant erworbene Pneumonien (community acquired pneumonia, CAP) sind Pneumonien, die sich außerhalb eines Krankenhauses oder innerhalb der ersten 48 Stunden nach Aufnahme manifestieren. Bei jungen Patienten sind *Streptococcus pneumoniae* (30-

60%), *Haemophilus influenzae* (5-10%), *Chlamydia pneumoniae* (5-10%), *Legionella pneumophila* und *Mycoplasma pneumoniae* typische Erreger der CAP. Bei Patienten über 65 Jahren kommen zusätzlich noch Enterobakterien, wie *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* und *E. coli* und selten *Pseudomonas aeruginosa* und andere Nonfermenter hinzu.

Pneumonien, die sich nach mehr als 48 Stunden nach Aufnahme manifestieren, werden als nosokomial erworbenen Pneumonien (hospital acquired pneumonia, HAP) bezeichnet. Die häufigsten Erreger der HAP sind *gramnegative Enterobacteriaceae* und *Staphylococcus aureus*. Weitere Erreger sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, und *Bacteroides*. Die als „health care-associated pneumonia“ (HCAP) oder „nursing home-associated pneumonia“ (NHAP) bezeichnete Pneumonie stellt eine Sonderform der nosokomialen erworbenen Pneumonien dar. Dabei handelt es sich um Pneumonien bei Heimbewohnern oder chronisch Kranken, die häufig durch *Staphylococcus aureus* und gramnegative Stäbchen wie *E.coli* verursacht werden. (Raghavendran, 2000).

Etwa zehn Prozent der hospitalisierten Patienten mit CAP müssen auf die Intensivstation aufgenommen werden, wo trotz potenter Antibiotikatherapie 20-50 % von ihnen sterben (Paganin et al., 2004). In den Industrieländern sind Pneumonien somit die häufigste zum Tode führende Infektionskrankheit.

### **1.2.2 Pathogenese**

Während die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes mit verschiedenen Bakterien, zum Teil auch mit Pilzen und Protozoen, besiedelt sind, sind die unteren Abschnitte des Respirationstraktes normalerweise steril. Gelangt ein Erreger trotz mechanischer und mukoziliärer Abwehrmechanismen der oberen Luftwege in die unteren Abschnitte des Respirationstraktes, so führen die dort verfügbaren angeborenen und erworbenen Abwehrmechanismen zu seiner Elimination. Pneumonien entstehen durch die Exposition gegenüber virulenten Erregern, einem reduzierten systemischen Immunstatus oder die Beeinträchtigung des lokalen Abwehrsystems (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Mögliche Infektionswege einer Pneumonie

Inhalation von Erregern
Aspiration von Mageninhalt, Speisen, Süß- oder Salzwasser
Mikroaspiration bei Intubierten
Hämatogen als septische Embolie, z.B. bei Endokarditis des rechten Herzens

### 1.2.3 Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr bei Pneumonie

Die Pneumonie ist als akute Entzündung durch das schnelle Auftreten der entzündlichen Reaktion auf die durch die invasiven, pathogenen Erreger und der von diesen ausgelöste Gewebeschädigung charakterisiert. Diese Immunantwort setzt sich aus einem angeborenen, unspezifischen und einem adaptiven, spezifischen Anteil zusammen (Aderem, 2001). Die unspezifische Immunabwehr verläuft dabei durch chemische Faktoren reguliert in Form von vaskulären und zellulären Reaktionen ab.

#### Vaskuläre Reaktionen

Durch vasoaktive Entzündungsmediatoren vermittelt kommt es frühzeitig zu einer Vasodilatation der kapillären Endstrombahn, woraus eine gesteigerte Durchblutung (aktive Hyperämie) mit Bildung eines Ödems (Transsudat) resultiert. Ebenfalls durch Mediatoren vermittelt kommt es zu strukturellen und/oder funktionellen Veränderungen der alveolokapillären Membran, wodurch deren Permeabilität steigt. Das Ödem wird so zu einem proteinreichen Exsudat (Böcker et al., 2001).

**Tabelle 4:** Mediatoren der vaskulären Entzündungsreaktion (Böcker et al., 2001)

Wirkung	Mediator
Vasodilatation	Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Kinine, PAF
Steigerung der Permeabilität	Histamin, PAF, Leukotriene, Kinine, C3a, C5a

#### Zelluläre Reaktionen

Im Zentrum der akuten Entzündungsreaktion steht die Migration von Leukozyten in das geschädigte Gewebe. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in das geschädigte Gewebe wird über Adhäsionsmoleküle ermöglicht, die sowohl vom Endothel als auch von Leukozyten nach TREM-1-vermittelter Stimulation vermehrt exprimiert

werden (Bouchon et al., 2000; Colonna und Facchetti, 2003). Zu diesen Adhäsionsmolekülen zählen einerseits E-, P- und L-Selektine, die nach Interaktion mit Liganden die Rollen der Neutrophilen entlang der Endotheloberfläche induzieren und andererseits Integrine. Diese entstehen durch unterschiedliche Zusammensetzung der transmembranären  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten. Die  $\beta$ -Kette (CD18), die lediglich auf Leukozyten exprimiert wird, bildet mit einer der vier  $\alpha$ -Ketten der CD11-Familie das CD11/CD18-Adhäsionsmolekül ( $\beta_2$ -Integrine). Eine weitere Gruppe bilden die  $\alpha_4$ -Integrine ( $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$ ) (Guo und Ward, 2002). Die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wird mittels Bindung der Adhäsionsmoleküle durch einen korrespondierenden Liganden erreicht. Zu diesen zählen unter anderem die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular adhesion molecule) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule). Letzteres ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird permanent in geringen Mengen in der Lunge gebildet. Als Reaktion auf die Anwesenheit von mikrobiellen Molekülen wie Lipopolysaccharid (LPS) in der Lunge wird seine Expression gesteigert (Mizgerd, 2002). Nach Emigration durch interendotheliale Spalten wandern die Leukozyten entsprechend dem chemotaktischen Gradienten zum Ort der Gewebeschädigung in Lungeninterstitium und alveoläres Kompartiment (Guo und Ward, 2002). Der bedeutendste und am besten beschriebene chemotaktische und neutrophilen-aktivierende Faktor unter diesen ist das CXC Chemokin 8 (CXCL8/Interleukin-8/IL-8). Die biologische Wirkung von CXCL8 wird über die Membranrezeptoren CXCR-1 und -2 (CXC chemokine receptor) auf die Zielzelle vermittelt (Pignatti et al., 2005). Weitere Chemokine sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** CXCL-Chemokine, die chemotaktisch auf Neutrophile wirken

CXCL-Chemokine	Rezeptor
CXCL1 (GRO- $\alpha$ /CINC-1/KC)	CXCR-1 und -2
CXCL2 (GRO- $\beta$ /CINC-3/MIP-2)	
CXCL3 (GRO- $\gamma$ /CINC-2)	
CXCL5 (ENAP-78 )	CXCR-1 und -2
CXCL6 (GCP-2)	CXCR-1 und -2
CXCL7 (NAP-2)	CXCR-1 und -2
CXCL14 (BRAK/bolekine)	Unbekannt
CXCL15 (Weche/lungkine)	Unbekannt

Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, die den Beginn der unspezifischen Immunantwort anzeigen, wird durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR)

eingeleitet (Bleharski et al., 2003). TLRs werden nicht nur von Makrophagen und Neutrophilen, sondern auch von dendritischen Zellen sowie epi- und endothelialen Zellen exprimiert. Sie erkennen eine Auswahl an pathogen-assoziierten Mustern, die höhere Eukaryonten nicht exprimieren, einschließlich bakterielle LPS (Aderem, 2001; Malik et al., 2006). Die durch TLR-Stimulation ausgelöste Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen wird durch Aktivierung des Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM)-1 verstärkt (Colonna und Facchetti, 2003). TREM-1 ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie, das auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird und diese über das Transmembranadapterprotein DAP 12 aktiviert (Bouchon et al., 2000; Colonna und Facchetti, 2003).

Aufgrund ihrer schnellen Verfügbarkeit bilden neutrophile Granulozyten die erste Abwehrfront während der Entzündungsreaktion (Ronnefarth et al., 2006). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Abwehr der Infektion durch Elimination der Erreger mittels Phagozytose. Durch die Fusion des Phagosom mit den primären (azurophilen) und sekundären (spezifischen) Granula entsteht das Phagolysosom. Insgesamt werden die Neutrophilengranula vier verschiedene Klassen geteilt (siehe Tabelle 6), die sich in ihrem Proteingehalt, dem Zeitpunkt ihrer Ausbildung während der Neutrophilenentwicklung und dem Zeitpunkt der Degranulation bei Neutrophilenstimulation unterscheiden (Chakrabarti et al., 2006). Die in den Granula gespeicherten Enzyme wirken durch Mitwirken bei der Bildung von Sauerstoffradikalen und lytische Aktivität bei der Abtötung und Degradation von Bakterien mit.

**Tabelle 6:** Auswahl von Neutrophilengranula und ihrer Inhaltsstoffe (Borregaard und Cowland, 1997)

Granula	Inhalt
primär/azurophil	Myeloperoxidase (MPO), Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3
Sekundär/spezifisch	Laktoferrin
Tertiär	Gelatinase B/ Matrixmetalloproteinasen
Sekretorische Vesikel	Plasma (Albumin)

Ein Aktivierungsmarker für Granulozyten stellt CD66b, das Mitglied der Ig-Superfamilie ist, dar. Er wird selektiv von Granulozyten exprimiert. Während Neutrophile unter basalen Bedingungen lediglich minimale Mengen von CD66b bilden, steigt ihre Expression durch

Kontakt mit proinflammatorische Agonisten rapide an (Yoon et al., 2007). Als weiterer Aktivierungsmarker gilt das  $\beta$ 2-Integrin CD11b, das jedoch nicht nur von Leukozyten sondern von allen phagozytierenden Zellen gebildet wird (Pilione et al., 2006).

Eine zweite Verteidigungslinie wird durch die Monozyten/Makrophagen gebildet. Diese stellen eine heterogene Gruppe von Zellen des mononuklearen Phagozytensystems (MPS) dar. Dabei ist in der Lunge zwischen Makrophagen des Interstitiums und Alveolarmakrophagen zu unterscheiden. Die Alveolarmakrophagen wehren zwar sehr effektiv mikrobielle Erreger ab, induzieren aber nicht unbedingt Entzündungsreaktionen (Garn et al., 2006). Im Vergleich zu peripheren Makrophagen besitzen Alveolarmakrophagen eine höhere Phagozytosekapazität und können größere Mengen an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmonoxidverbindungen sowie des Zytokins TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor-  $\alpha$ ) bilden. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und -6, werden von ihnen jedoch vermindert gebildet (Garn et al., 2006). Allerdings verstärken Alveolarmakrophagen die Produktion proinflammatorischer Zytokine von Endothelzellen und wirken so bei der Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten (Polymorphonuclear leukocyte, PMN) mit. In Abhängigkeit von externen Stimuli können Alveolarmakrophagen ihre funktionellen Eigenschaften und phänotypisches Muster ändern (Buhling et al., 2000). Potentielle Pathogene werden anhand von bestimmten Motiven erkannt, die höhere Eukaryonten nicht exprimieren. Zu diesen sogenannten PAMPs (pathogene associated moleculare patterns) zählen LPS, Lipopeptide, Peptidoglykane und Teichonsäure (Aderem, 2001). Sie bewirken neben der Phagozytose von Bakterien die Stimulation endothelialer Adhäsionsmoleküle, die Induktion von Fibroblasten sowie die Induktion der Angiogenese. Außerdem führt ihre Sekretion von Zytokinen und Mediatoren zu systemischen Reaktionen (Kasper et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus der Phagozyten, Mikroorganismen abzuwehren, ist der respiratory burst. Durch immunologische Aktivierung sind Phagozyten in der Lage, reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Moleküle zu produzieren (reactive oxygen and nitrogen species; RNS und ROS) (Verchier et al., 2007). Dazu stehen zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Der sogenannte iNOS-Weg (siehe oben) führt zur Bildung von  $\cdot\text{NO}$ , das teilweise mit Sauerstoffsuperoxid ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) reagiert, wodurch das hochreaktive Anion Peroxynitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ) entsteht. Dieses wird zum instabilen HONOO protoniert, was in der Produktion von  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  resultiert. Darüber hinaus wirkt NO durch seine Reaktion mit Eisenresten von Schlüsselenzymen des Zitratzyklus und der DNA-Synthese

direkt zytotoxisch auf Tumorzellen sowie intra- und extrazelluläre Mikroorganismen (Moncada, 1993). Der iNOS-Weg wird durch den NADPH-Oxidase-Weg ergänzt, über den Superoxidanionen generiert werden, aus denen unter anderem Wasserstoffsuperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hypochlorsäure gebildet werden (Gaston et al., 1994; Guo und Ward, 2002; Ricciardolo, 2003; O'Neill et al., 2008).

Bei der Immunabwehr in der Lunge stellen Neutrophile und Makrophagen eine primäre Schutzbarriere dar, die der bakteriellen Invasion entgegenwirkt, bis die spezifischen Mechanismen der adaptiven Immunantwort greifen (Pilione et al., 2006). Auch wenn die unspezifischen Mechanismen der Immunantwort das Gewebe vor invasiven Mikroorganismen schützt, können diese Fähigkeiten das Gewebe schädigen (Condliffe et al., 1996; Verchier et al., 2007).

### **1.3 Fragestellung und Zielsetzung**

Die NO-Produktion ist bei entzündlichen Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale erhöht. Daher wird die Messung der NO-Konzentration im Exhalat bei Asthmapatienten erfolgreich eingesetzt, um die Entzündungsintensität im Bronchialsystem zu messen und ihren Verlauf zu überwachen. Durch dieses Verfahren ist bei jedem Patienten eine individuelle Anpassung der Medikation möglich.

Bei Pneumonien, die die häufigste zum Tode führende Infektionskrankheit in den Industrieländern darstellen, wurde der Zusammenhang zwischen NO-Konzentration im Exhalat und Entzündung bisher unzureichend untersucht. Dies ist jedoch durchaus erstrebenswert, da die NO-Messung auch bei Pneumoniepatienten eine Methode darstellen kann, Entzündungsintensität und das Ansprechen auf die medikamentöse Therapie zu beurteilen. Dazu ist es erforderlich, selektiv das fraktionierte exhalierte NO aus dem alveolären Kompartiment (FENO) zu bestimmen.

Bei etwa 15 % der hospitalisierten Patienten mit CAP besteht ein Therapieversagen (Menendez et al.). Daher ist es wünschenswert, das Ansprechen der antibiotischen Therapie innerhalb von 48 – 72 Stunden mit einer objektiven Methode zu überprüfen. Das kompartimentspezifische Entzündungsmonitoring wird bisher mittels Untersuchungen von induziertem Sputum und bronchoalveolärer Lavage (BAL) ermöglicht. Während die Sputumuntersuchung ein sehr aufwendiges Verfahren ist, das nur bei einem Teil der Patienten durchgeführt werden kann, da viele Patienten keinen Auswurf produzieren, stellt die BAL als invasives Verfahren eine hohe Belastung für den Patienten dar und ist insofern

zum Monitoring nicht geeignet. Dessen gegenüber bietet die FENO-Messung als eine einfach durchzuführende, nicht-invasive und quantitative Methode einen klaren Vorteil.

Um zu beurteilen, ob die FENO-Messung bei Pneumoniepatienten eine geeignete Methode darstellt, Entzündungsintensität und Ansprechen auf die Therapie zu messen, bestimmten wir bei hospitalisierten Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie die fraktionierte NO-Konzentration im Exhalat.

Unsere Hypothese war, dass die Konzentration des fraktionierten exhalierten NO (FENO) im alveolären Kompartiment bei Patienten mit Pneumonie erhöht ist.

Wir stellten folgende Fragen:

- Ist die FENO-Konzentration bei Patienten mit Pneumonie erhöht im Vergleich zu einem Kollektiv von gesunden Probanden?
- Ist ein Messverfahren in der Einfachatemzugmethode oder in der Mehrfachatemzugmethode besser durchführbar und reproduzierbar?
- Gibt es eine Assoziation zwischen FENO und etablierten lokalen oder systemischen Parametern, die eine Entzündung anzeigen?
- Welchen Einfluss hat die antibiotische Therapie auf die FENO-Werte?
- Hat eine begleitende Glucocorticoidtherapie einen Einfluss auf die FENO-Werte?
- Ist anhand des FENO eine Aussage im Hinblick auf Schweregrad oder Verlauf der Erkrankung möglich?

## **2 Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die FENO-Messung wurde zunächst bei einem Kollektiv von sieben gesunden Probanden im Alter von  $25 \pm 3,3$  Jahren durchgeführt, von denen fünf weiblichen und zwei männlichen Geschlechts waren. Bei den Probanden lag kein Anhalt für einen aktuellen oder gerade stattgefundenen Atemwegsinfekt vor und ihre Lungenfunktionsuntersuchung wies keinen pathologischen Befund auf.

Andererseits wurde bei Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme ( $t_0$ ) eine NO-Messung sowohl im Single- als auch im Multibreath-Modus durchgeführt. In Abhängigkeit von Verweildauer und Allgemeinzustand der Patienten wurden diese bei fünfzehn der Patienten an einem zweiten Zeitpunkt (dritter bis vierter Tag nach Aufnahme,  $t_1$ ) und bei elf der Patienten an einem dritten Zeitpunkt (fünfter bis achter Tag nach Aufnahme,  $t_2$ ) erneut bestimmt. Zu allen drei Zeitpunkten erfolgte, sofern dies den Patienten möglich war, zusätzlich die Asservation von Sputum. In diesem wurden einerseits die Neutrophilenkonzentration sowie die absolute Neutrophilenzahl bestimmt und durchflusszytometrisch die Expression der Oberflächenmoleküle CD66b, CXCR2 und TLR2 auf den Neutrophilen gemessen. Bei ausreichender Neutrophilenzahl wurde zusätzlich die CD11b-, CXCR1- und TREM-1-Expression ermittelt. Im Sputumüberstand wurde die CXCL-8-Konzentration gemessen.

#### **2.1.1 Einschlusskriterien**

Bei allen Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden lag eine klinisch und radiologisch gesicherte, ambulant erworbene Pneumonie vor.

Die Diagnose Pneumonie wurde gestellt, wenn mehrere der folgenden Befunde vorlagen:

- Neues Infiltrat im Röntgenthorax (obligat)
- Pulmonale Symptome (Husten, Dyspnoe, klingende Rasselgeräusche, verminderte Sauerstoffsättigung)
- Fieber  $> 38^\circ\text{C}$  oder Hypothermie  $< 36,5^\circ\text{C}$
- Erhöhtes C-reaktives Protein (CRP), Leukozytose, Linksverschiebung oder Leukopenie
- Nachweis von pathogenen Erregern im Sputum

### 2.1.2 Ausschlusskriterien

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen es nicht möglich war, innerhalb von 24 Stunden eine auswertbare FENO-Messung durchzuführen. Weitere Ausschlusskriterien waren:

- Nosokomiale Pneumonie
- Schwere und beatmungspflichtige CAP
- Schwangerschaft
- Immunsuppressive Therapie mit Ausnahme von Glucocorticoiden
- Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises mit Lungenbeteiligung
- Lungentransplantation

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Schleswig-Holstein Campus zu Lübeck gebilligt. Alle in die Studie einbezogenen Patienten unterschrieben nach ausführlicher Aufklärung über die Studie eine Einverständniserklärung.

## 2.2 Prinzip der Stickstoffmonoxid-Messung

Die Messung der NO-Konzentration beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz, das 1966 von Clough beschrieben wurde:



Mit Hilfe der Reaktionen (1a) und (2) kann die Stickstoffmonooxidkonzentration bestimmt werden. Reagiert NO mit Ozon ( $\text{O}_3$ ), so entsteht energetisch angeregtes Stickstoffdioxid ( $\text{NO}^*2$ ), dieses angeregte  $\text{NO}_2$  fällt unter Abgabe von Photonenenergie auf sein elektrisches Ausgangsniveau zurück. Wird diese Emissionsstrahlung detektiert, erhält man eine empfindliche Aussage über die NO-Konzentration (Clough und Trush, 1967).

Die NO-Messung wurde mit dem Analysator CLD88sp der Firma ECO MEDICS (ECO MEDICS, Dürnten, Schweiz) durchgeführt. Die Einstellungen des Gerätes entsprechen den Vorgaben der American Thorax Society (ATS) und European Respiratory Society (ERS).

Der Patient atmet bei der Messung durch einen Flusskopf, der die Flussrate und das Atemzugvolumen misst. Während der Inspiration atmet der Patient stickoxidfreie Luft ein, die von dem DENOX88-Modul erzeugt wird. Bei der Expiration atmet der Patient gegen einen vom DENOX88-Modul erzeugten Widerstand. Damit dieser überwunden werden kann, muss der Patient einen Überdruck in seiner Mundhöhle erzeugen, was zu einem Verschluss des Velum palatinum führt. So wird der Übertritt von nasalem NO in die Mundhöhle und damit die Kontamination des Exhalats aus dem unteren Respirationstrakt mit nasalem NO verhindert (Kharitonov und Barnes, 1997). Ein zweiter Effekt, den der Widerstand hervorruft, ist, dass der Patient bei der Expiration eine bestimmte Flussgeschwindigkeit erzeugen muss, um den Widerstand überwinden zu können.

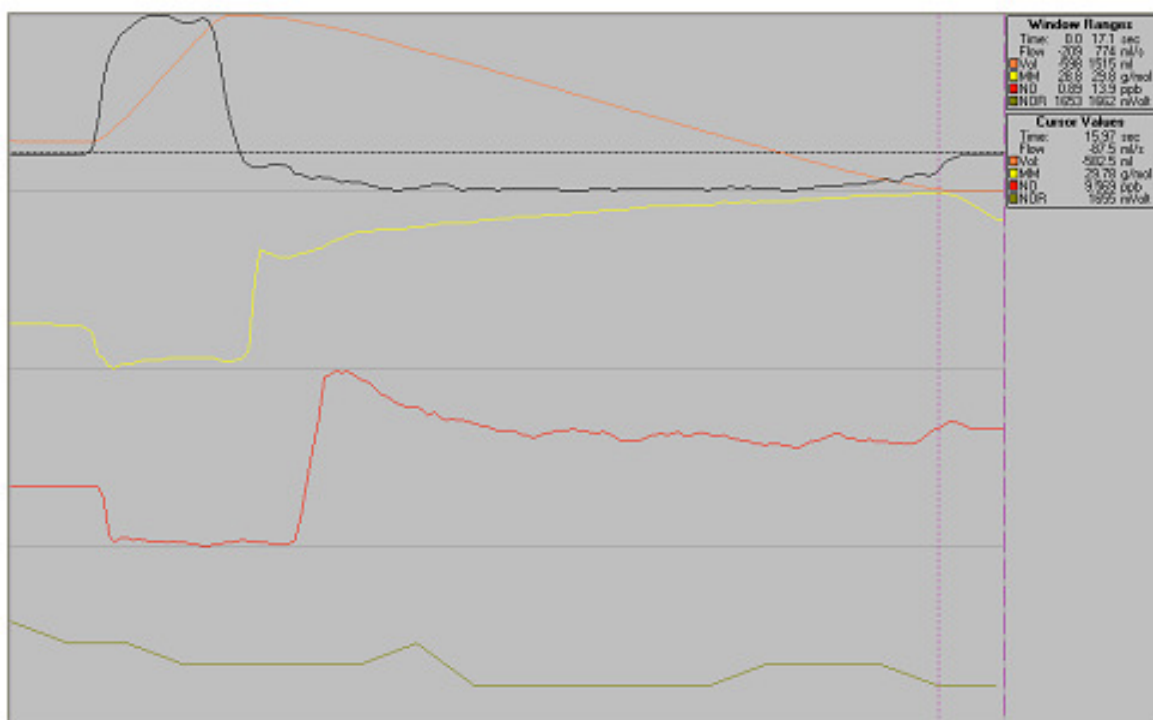
Ein Teil des Luftstroms wird zur Bestimmung der NO-Konzentration zum Reaktor geleitet. Am Eingang in die Reaktionskammer wird die Probe mit der O<sub>3</sub>-haltigen Luft, die der Ozon-Generator erzeugt, gemischt. Die bei der Reaktion entstehende Emissionsstrahlung fällt auf einen Photodetektor, der sie Signale an einen Mikroprozessor weiterleitet. Dieser errechnet dann die NO-Konzentration. Die Probe wird, bevor sie in die Umgebung entlassen wird, von Ozon gereinigt.

Der Analysator ist außerdem mit einem „Flow-Sensor“ verbunden. Dieser ist mit zwei Ultraschalltransduktoren ausgestattet, die auf den gegenüberliegenden Seiten des Flusskanals befestigt sind. Um den Fluss und die molare Masse der Atemluft zu bestimmen, werden Ultraschallimpulse in und gegen die Flussrichtung gesendet. Die gemessene Sendezeit stellt die Basis zur Bestimmung von Fluss und molarer Masse dar.

Da die molare Masse proportional mit der CO<sub>2</sub>-Konzentration steigt, kann mit Hilfe der Transduktoren das alveolare Kompartiment ermittelt werden. Wird die molare Masse gegen die Zeit aufgetragen, stellt sich endexpiratorisch ein Plateau mit einer erhöhten molaren Masse dar. Dieses Plateau entspricht dem alveolären Kompartiment. Dadurch ist es mit Hilfe des in dieser Studie verwendeten Analysators im Gegensatz zu den meisten anderen Analysatoren möglich, selektiv das fraktionierte endexpiratorische Stickstoffmonoxid (FENO) zu bestimmen.

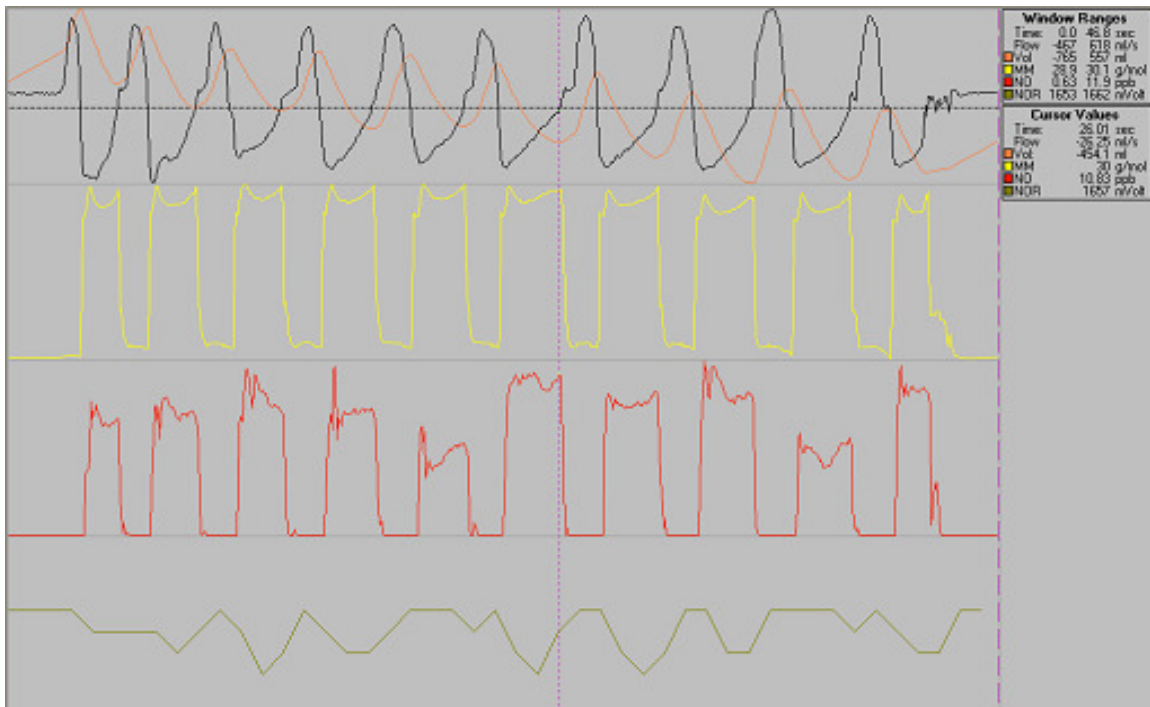
Mit dem Analysator können zwei unterschiedliche Messverfahren angewendet werden. Einerseits eine Einfachatemzugmethode, die Singlebreath (SA 200) genannt wird, andererseits eine Mehrfachatemzugmethode, die als Multibreath (MB) bezeichnet wird.

Beim Singlebreath führt der Patient nach Inspiration von NO-freier Luft eine tiefe Expiration gegen einen bestimmten Widerstand, der von dem DENOX88-Modul erzeugt wird, durch. Währenddessen wird die Flussrate auf dem Bildschirm in Form eines Kästchens, das sich je nach Stärke der Flussrate auf- oder abwärts bewegt, dargestellt. Im Bereich der erwünschten Flussrate (200 ml/s) wird das sonst rote Kästchen grün. Dadurch ist es kooperativen Patienten möglich, ihre Flussrate zu kontrollieren. Dies ist, da FENO aufgrund der erhöhten Diffusionskapazität bei längerer Transitzeit der Luft in den Atemwegen abhängig von der Flussrate ist, sehr wichtig. Ist die Expiration lang genug mit der geforderten Flussrate durchgeführt worden, wertet das Analyse-Programm die Messung als geeignet. Neben der NO-Konzentration werden auch die molare Masse und Atemvolumina bestimmt (siehe Abbildung 2). Bei diesen Messungen handelt es sich um Online-Messungen (Echtzeit-Messung).



**Abbildung 2:** Vom CLD88sp Analysator ermittelte Werte im Singlebreath vor Auswertung durch die Spiroware-Software. Die gelbe Kurve spiegelt die molare Masse wieder, das endexpiratorische Plateau ist deutlich zu erkennen. NO ist in rot dargestellt. Der Spitzenwert zu Beginn der Expiration ist durch die höhere NO-Konzentration im Nasenrachenraum bedingt. (Time: Zeit, Flow: Flussrate, Vol: Volumen (orange), NOR: NO-Range (grau))

Für die Multibreath-Messung wird der Widerstand des DENOX88-Moduls ausgeschaltet, die erwünschte Flussrate beträgt bei dieser Messung 50ml/s. Das Atemmanöver ist somit weniger tief als im Singlebreath. Der Patient atmet etwa zehn Mal durch das Mundstück ein und aus. Analog zum Singlebreath wird auch hier neben der NO-Konzentration die molare Masse und Atemzugvolumina in Echtzeit gemessen (siehe Abbildung 3).

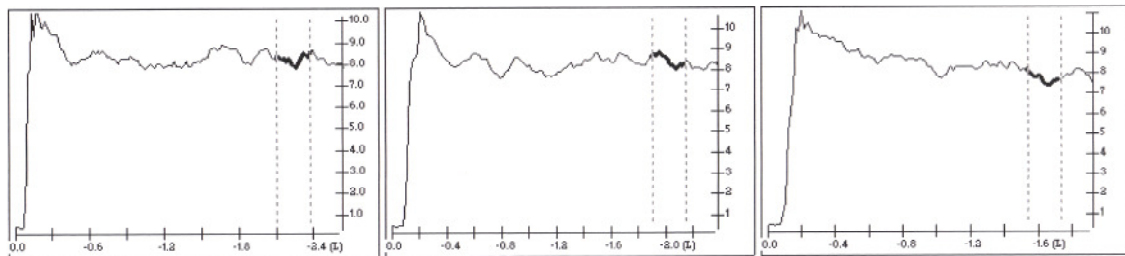


**Abbildung 3:** Vom CLD88sp Analysator ermittelte Werte im Multibreath vor Auswertung durch die Spiroware-Software. (Time: Zeit, Flow: Flussrate, Vol: Volumen, MM: molare Masse, NO: Stickstoffmonoxid, NOR: NO-Range)

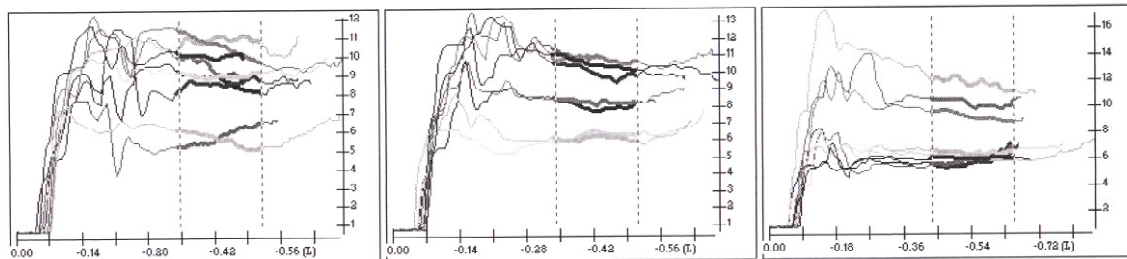
Nach der Messung ermittelt die Analyse-Software den Anteil des Exhalats, das dem alveolaren Kompartiment entstammt und errechnet die NO-Konzentration aus diesem. Im Multibreath wird zusätzlich der Durchschnittswert der NO-Konzentrationen der einzelnen Atemzüge errechnet.

Sowohl bei dem Single- als auch beim Multibreath werden nur geeignete Messungen ausgewertet. Idealerweise sollen bei beiden Verfahren drei geeignete Messungen durchgeführt werden, von denen ein Durchschnittswert errechnet wird. Dieser Wert entspricht der NO-Konzentration im alveolären Kompartiment bzw. in den unteren

Luftwegen. Die von der Analyse-Software errechneten Daten werden, wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, graphisch und tabellarisch dargestellt.



Test No.	Typ	FENO ppb	V'NO nl/min	FINO ppb	exp. Flow ml/sec
1	SA200	8.1	93.1	0.4	190.9
2	SA200	8.3	94.2	0.4	188.6
3	SA200	7.6	95.1	0.5	209.6
<b>Mean values</b>		<b>8.0</b>	<b>94.1</b>		<b>196.4</b>
<b>CV %</b>		<b>4.5</b>	<b>1.1</b>		<b>5.9</b>



Test No.	Typ	FENO ppb	V'NO nl/min	FINO ppb	exp. Flow ml/sec
1	mb	8.7	147.0	0.6	282.0
2	mb	8.9	138.9	0.6	258.3
3	mb	7.3	122.6	0.6	285.7
<b>Mean values</b>		<b>8.3</b>	<b>136.2</b>		<b>275.3</b>
<b>CV %</b>		<b>10.5</b>	<b>9.1</b>		<b>5.4</b>

**Abbildung 4:** Graphische und tabellarische Darstellung der Messergebnisse der FENO-Messung durch die Spiroware-Software (oben im Singlebreath, unten im Multibreath). Die Graphen zeigen die NO-Konzentration im Exhalat (ppb) über dem Ausatemvolumen (L). Der durch die beiden parallel zur Y-Achse verlaufenden Linien markierte Bereich, stellt den Messbereich dar, in dem FENO gemessen wird. Tabellarisch sind die Werte der einzelnen Messungen sowie die Durchschnittswerte aus den drei Messungen

dargestellt. ( $\dot{V}'_{NO}$ : NO Output, F<sub>INO</sub>: fraktioniertes inspiratorisches NO, ppb: pars per billion, SA200: Singlebreath, mb: Multibreath, Mean values: Durchschnittswerte, CV%: Standardabweichung)

Bei der -in dieser Studie durchgeführten- Online-Messung wird das FENO in pars per billion (ppb) angegeben, dies entspricht der Einheit Nanoliter/Liter.

Die pro Zeiteinheit ausgeatmete NO-Menge (NO Output), wird mit  $\dot{V}_{NO}$  bezeichnet, sie errechnet sich nach folgender Formel:

$$\dot{V}_{NO}(\text{nl/Minute}) = \text{NO}(\text{nl/L}) \times \text{Atemflussrate}(\text{L/minute}).$$

### **2.3 Empfehlungen der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) für die standardisierte Messung von exhalierem NO, das aus dem unteren Respirationstrakt stammt**

Die ERS 1997 formulierte erstmals Richtlinien zur standardisierten Messung von exhalierem Stickstoffmonoxid aus dem Nasen-Rachen-Raum und dem unteren Respirationstrakt. Die ATS veröffentlichte 1999 Empfehlungen zur NO-Messung, die 2005 überarbeitet wurden. Diesen zu Folge ist zu beachten (Silkoff et al., 2005):

- NO-Konzentration der Umgebungsluft: Die NO-Konzentration der Umgebungsluft kann relativ hohe Werte erreichen. Die aktuelle Studienlage spricht zwar gegen eine Beeinflussung der Messergebnisse, trotzdem wird empfohlen, den Patienten vor der Messung NO-freie Luft (< 5 ppb) einatmen zu lassen. Mit Hilfe des DENOX88-Moduls atmeten die Patienten in unserer Studie vor der Messung NO-freie Luft ein.
- Die Konzentration des expiratorischen NOs zeigt eine signifikante Abhängigkeit von der Flussrate, wodurch es erforderlich ist, diese konstant zu halten. Für die Messung der NO-Konzentration in den unteren Atemwegen empfiehlt die ATS eine Flussrate von 50 ml/s ( $\pm 10\%$ ).

- Das Anhalten von Luft führt zu einer Akkumulation von NO in den Nasennebenhöhlen, weswegen dies vermieden werden soll. Aus dem gleichen Grund wird auch keine Nasenklemme verwendet.
- Aufgrund von widersprüchlichen Angaben über eine Korrelation zwischen FENO und Geschlecht der Patienten, soll das Geschlecht von jedem Patienten vermerkt werden. Ebenso soll eine Schwangerschaft vermerkt werden.
- Da Exhalationsmanöver die NO-Konzentration im Respirationstrakt vorübergehend senken, soll vor der NO-Messung keine Spirometrie durchgeführt werden. Die NO-Messung selbst beeinflusst die NO-Konzentration im Respirationstrakt nicht.
- Durch Essen und Trinken können die FENO-Werte vorübergehend ansteigen, daher sollen Patienten mindestens eine Stunde vor der Messung nichts essen und trinken. Im Zusammenhang damit sei darauf hingewiesen, dass die Inhalation mit 0,9% NaCl zur Sputuminduktion stets nach der NO-Messung durchgeführt wurde.
- Ob ein Zusammenhang zwischen der NO-Konzentration im Respirationstrakt und dem zirkadianen Rhythmus besteht ist bisher umstritten. Daher sollen Messserien zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt werden.
- Rauchen führt dauerhaft zu einer verminderten NO-Produktion im Respirationstrakt, direkt nach dem Rauchen kommt es jedoch zu einem vorübergehenden Anstieg der FENO-Werte. Daher sollen die Patienten mindestens eine Stunde vor der Messung nicht Rauchen. Das Rauchverhalten der Patienten wird vermerkt.
- Medikamente können die NO-Synthese im Respirationstrakt beeinflussen und sollen insofern vermerkt werden.

In dieser Studie wurde entsprechend dieser Richtlinien gemessen.

## **2.4 Sputumgewinnung**

Das Sputum wurde von den Patienten spontan oder nach Inhalation von 0,9% NaCl abgehustet und in einem Röhrchen gesammelt. Der Zeitpunkt der Sputumgewinnung lag frühestens 3 Stunden vor und spätestens 12 Stunden nach der NO-Messung.

## **2.5 Sputumaufbereitungen**

Das gesammelte Sputum wurde nach maximal zweistündiger Sammelzeit verarbeitet:

- Es wird eine 1:4 –Verdünnung mit farblosem Medium (RPMI) hergestellt, diese nach gründlichem Mischen und 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert.
- Nach Abpipettieren des Überstandes wird dieser erneut für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand wird abermals abpipettiert und bei -70°C eingefroren.
- Zum Pellet wird das gleiche Volumen 0,1% DTT hinzugefügt und nach vorsichtigem Mischen für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert, wobei alle fünf Minuten erneut gemischt wird.
- Das Gemisch wird mit 15-30 ml farblosem RPMI aufgefüllt, bei 1600 U/min zentrifugiert und anschließend dekantiert.
- Das Pellet wird in 2-5 ml RPMI resuspendiert, gevortext und durch Nylonfilternetze der Größe 41µm→20µm→11µm filtriert.
- Mittels Neubauerzählkammer wird die Zellzahl bestimmt.
- Die Zellzahl wird je nach Gesamtzellzahl auf 0,15 - 0,5 x 10<sup>6</sup> pro 100 µl FACS-Puffer eingestellt.
- Mittels Trypanblaufärbung wird die Zellvitalität bestimmt, die zwischen 0% und 60% abgestorbener Zellen schwankte.
- Zur Bestimmung des Granulozytenanteils durch lichtmikroskopische Differenzierung wurden Zytospin-Präparate angefertigt. Der Anteil von Neutrophilen lag durchschnittlich bei 86,96% (Minimum: 22,4%; Maximum: 99,5%), während durchschnittlich 0,43% (Minimum: 0,0%; Maximum: 4,3%) der Zellen Eosinophile waren.

### **2.5.1 Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie**

Zur Messung am Fluorescence Activated Cell Sorter (FACScan) wurden die Zellen wie folgt vorbereitet:

- Entsprechend des Protokolls wird in jedes FACS-Röhrchen 100µl der Zellsuspension und der Antikörper pipettiert, dies wird nach dem Vortexen für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.
- Die Zellen werden mit 2 ml FACS-Puffer pro Röhrchen gewaschen, 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und dekantiert.
- Anschließend werden die Zellen mit 500µl 3% PFA für 10 min bei 4°C inkubiert und erneut mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und dekantiert.

- Nach Hinzufügen von 400 µl FACS-Puffer werden die Zellen innerhalb der nächsten 24 Stunden gemessen.

Die Parameter und ihre Bedeutung, gegen die die in der Studie verwendeten Antikörper gerichtet sind, sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7:** In der Durchflusszytometrie untersuchte Parameter und ihre Bedeutung

<b>Parameter</b>	<b>Bedeutung</b>
CD66b	Aktivierungsmarker neutrophiler Granulozyten
CD11b	Adhäsionsmolekül und Aktivierungsmarker von phagozytierenden Zellen
CXCR1 (1L-8RA/CD128a)	7 Transmembrandomänenrezeptor auf Granulozyten und Monozyten mit hoher Affinität zu Interleukin-8
CXCR2 (IL8RB)	7 Transmembrandomänenrezeptor auf Granulozyten und Monozyten mit hoher Affinität zu Interleukin-8
TREM-1	Aktivierungsmarker Neutrophiler und Monozyten, der durch bakterielle Lipopolysaccharide vermehrt exprimiert wird
TLR-2	1 Transmembranprotein, das durch verschiedene Bestandteile grampos. und gramneg. Bakterien stimuliert wird und so zur Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen führt

### 2.5.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

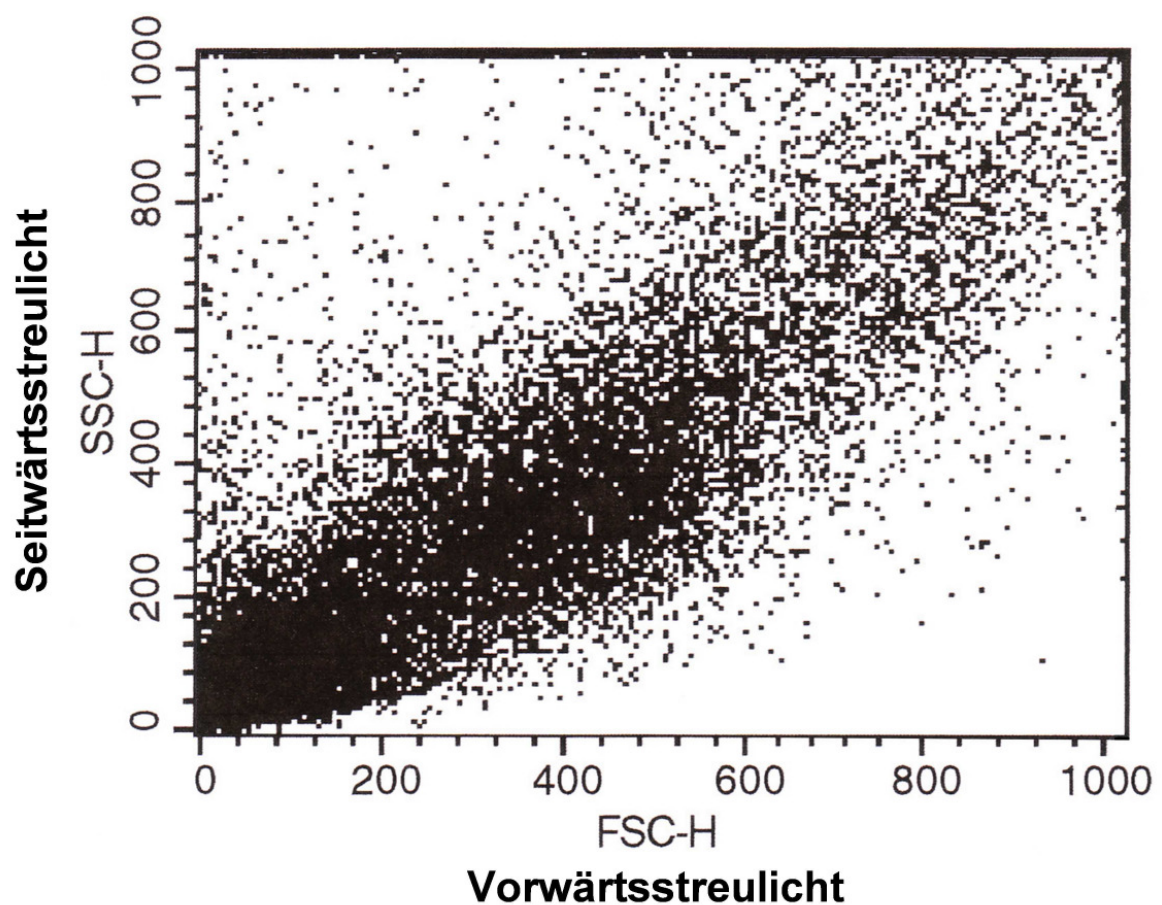
Die Messung wurde mit einem FACScan der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Der FACScan ist ein fünfparametriger „Analyzer“, der verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen oder Partikeln gleichzeitig erfasst anhand derer die Zellen identifiziert und charakterisiert werden können. Voraussetzung dafür ist, dass die zu messenden Partikel einzeln nacheinander durch einen fokussierten Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488nm fließen. Dies wird erreicht, indem die Analyseprobe in ein großes Volumen Mantelflüssigkeit injiziert wird, so dass sie entlang der Flussachse fokussiert wird und die Partikel vereinzelt werden (Hydrodynamische Fokussierung). Mit Hilfe des Laserstrahls können Vorwärtsstreulicht (Forward Light Scatter, FSC), Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) sowie drei verschiedene Fluoreszenzspektralbereiche gemessen

werden. Es finden Lichtstreuungen in alle Richtungen statt, aus deren Intensität und Winkel sich Informationen über Zelleigenschaften wie Zellgröße, Zellmembranstruktur, Zellkern und intrazelluläre granuläre Bestandteile gewinnen lassen. Der größte Anteil wird in Vorwärtsrichtung gestreut und ist proportional zur Größe der Zelle. Das Licht, das von den Zellen in einem Winkel von  $90^\circ$  gestreut wird (Seitwärtsstreulicht), gilt als Maß für die optische Homogenität bzw. Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzen können in drei verschiedenen Fluoreszenzspektralbereichen gemessen werden. Sie entstehen durch Anregung von Fluorchromen beim Auftreffen des Laserstrahls, so dass deren Elektronen auf ein höheres energetisches Niveau angehoben werden und beim Zurückfallen auf das Ausgangsniveau Energie in Form von Wärme freisetzen. Das emittierte Licht liegt als Fluoreszenz in einer anderen Wellenlänge als die absorbierte Lichtenergie vor. Als Fluorochrome dienen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Hauptemission bei 530nm), Phycoerythrin (PE, Hauptemission bei 575 nm) und Phycoerythrin-Cyanat (PE-Cy5, Hauptemission bei 670 nm). Die Fluorochrome können mit monoklonalen Antikörpern oder anderen an zelluläre Strukturen bindende Moleküle konjugiert werden und somit die Zellen anfärben. Da sich die Emissionsspektren der drei Fluorochrome überlappen, werden sie durch Emissionsfilter getrennt und über verschiedene Detektoren gemessen. Ein Detektor misst die FITC-Fluoreszenz als Fluoreszenz 1, ein weiterer die PE-Fluoreszenz als Fluoreszenz 2, ein dritter erfasst die PE/CY5-Fluoreszenz als Fluoreszenz 3. Bei der Datenauswertung können die für jede Zelle erhobenen Parameter FSC, SSC und Fluoreszenz 1-3 mittels Signalverarbeitung unter anderem in Form von Histogrammen und Punktwolken dargestellt werden. In der Regel werden FSC und SSC linear aufgetragen, während die Fluoreszenzen logarithmisch verstärkt werden. Die Histogramme stellen Häufigkeitshistogramme dar, wobei auf der Horizontalen Achse die zunehmende Intensität der jeweiligen Fluoreszenz über vier Dekaden dargestellt wird. Die vertikale Achse bezeichnet die Zellzahl in den jeweiligen Skalenkanälen. Bei der korrelierten Zweiparameterdarstellung (Dot plot) können zwei der fünf gemessenen Parameter gegeneinander aufgetragen werden.

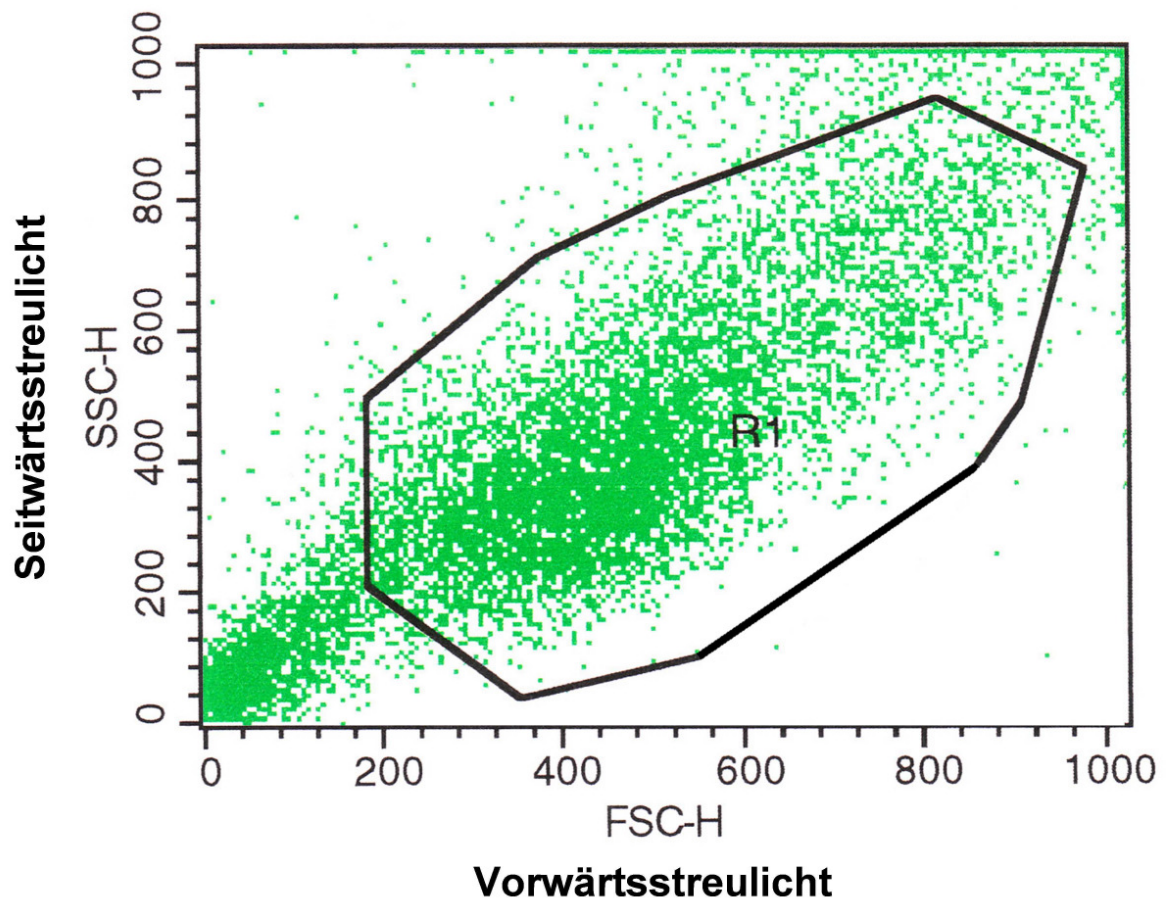
In der gleichen Reihenfolge, in der die Zellen den Analysepunkt passieren, werden die Daten für alle fünf Parameter als Liste gespeichert (List-Mode). So ist es möglich, durch Setzen von Fenstern (Gates) und Kombination dieser Zellsubpopulationen getrennt zu analysieren.

### 2.5.3 Durchführung der Messungen

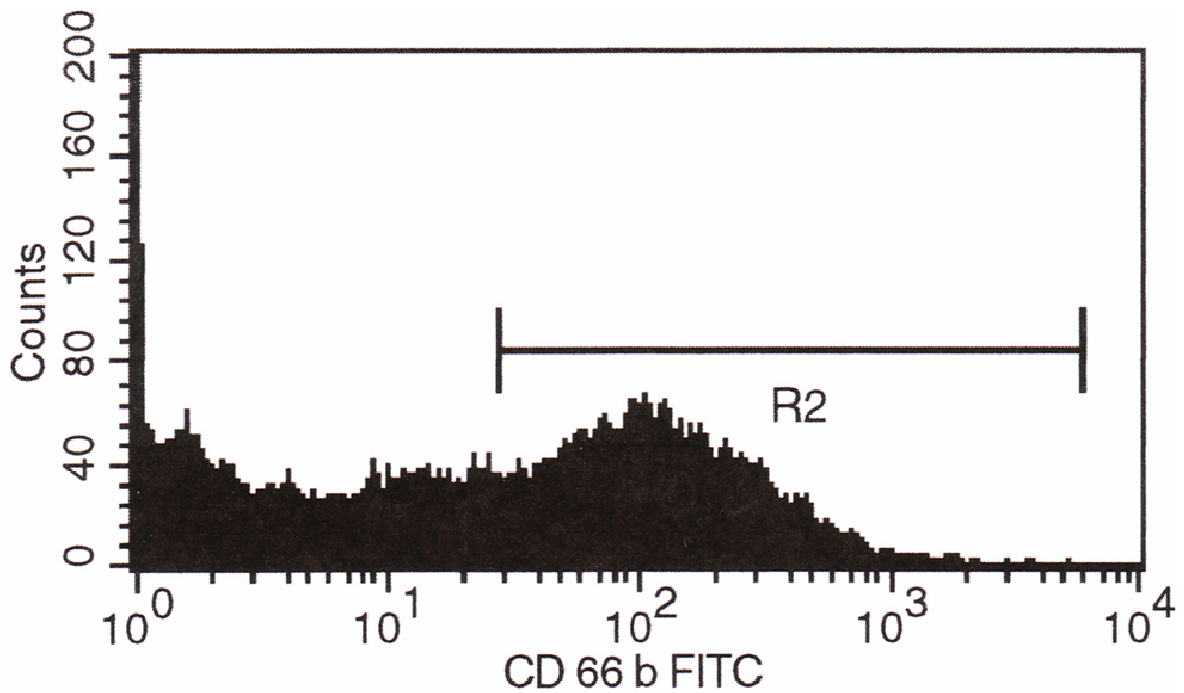
Die Zellmessung und Datenauswertung dieser Studie erfolgten in CellQuest Software. Die Granulozytenpopulation wurde durch Eingrenzung im charakteristischen Bild des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes sowie durch Eingrenzung der CD66 b positiven Population der 1. Fluoreszenz bestimmt. Es wurde die relative Mean-Fluoreszenzintensität berechnet, d.h. die MeanFluoreszenzintensität des monoklonalen Antikörpers im Verhältnis zur korrespondierenden Isotypenkontrolle.



**Abbildung 5:** Durchflusszytometrische Darstellung der Sputumzellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht.



**Abbildung 6:** Durchflusszytometrische Darstellung der Sputumzellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die mit R1 umrahmte Punktwolke markiert die Granulozytenwolke.



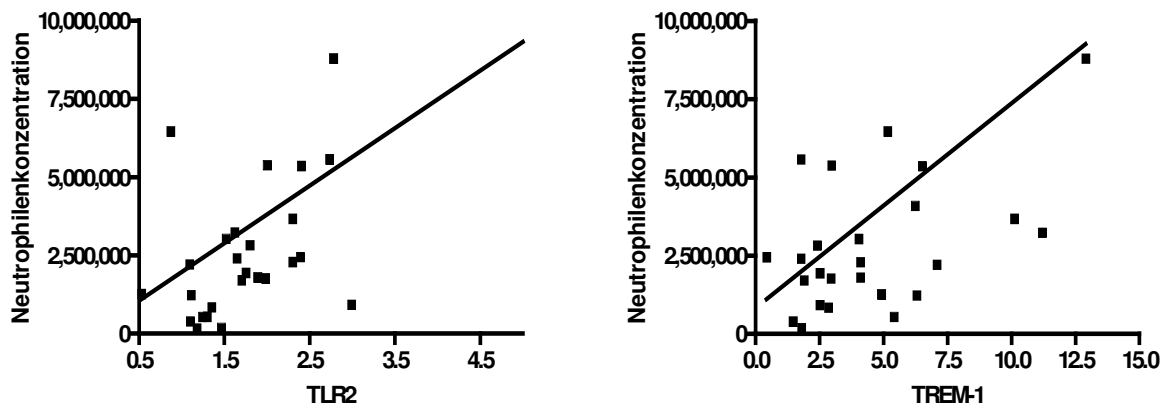
**Abbildung 7:** Durchflusszytometrische Darstellung der CD66b Expression der Sputumlukozyten im Histogramm. Die mit R2 markierten Zellen definieren die Granulozyten.

#### 2.5.4 Expression der Oberflächenmoleküle auf Neutrophilen im Vergleich zur Neutrophilenzahl und –konzentration

Sowohl die Neutrophilenkonzentration als auch die absolute Zahl Neutrophiler im Sputum korreliert signifikant mit CXCR2 und TLR2, die Neutrophilenkonzentration zeigt darüber hinaus auch eine signifikante Korrelation mit TREM-1 (siehe Tabelle 8; Abbildung 8).

**Tabelle 8:** Korrelation zwischen der Expression von Oberflächenmolekülen auf Neutrophilen und der Neutrophilenzahl und –konzentration im Sputum

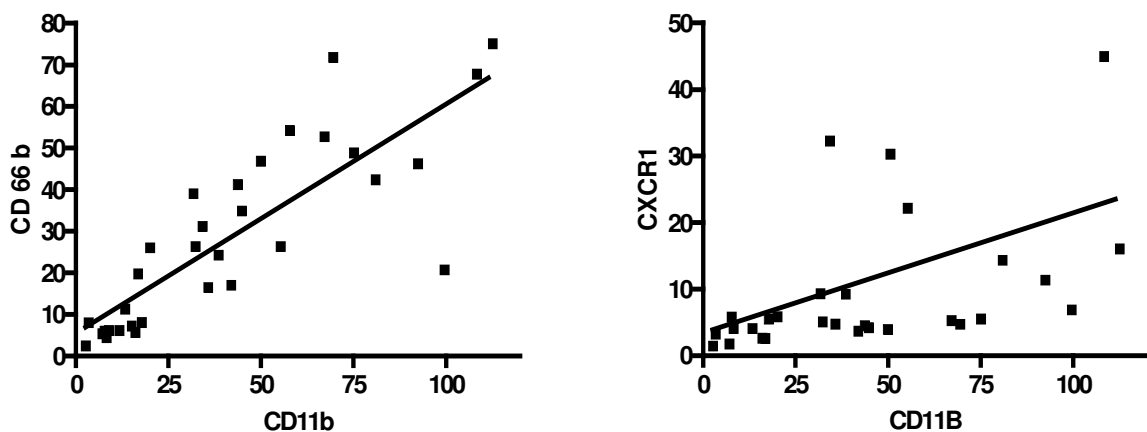
	p-Wert	r-Wert	Anzahl
Neutrophilenkonzentration - CXCR1	<0,001	0,72	26
Neutrophilenkonzentration - TLR2	<0,01	0,55	28
Neutrophilenkonzentration - TREM-1	<0,05	0,47	27
Neutrophilenzahl - CXCR1	<0,001	0,72	26
Neutrophilenzahl - TLR2	<0,001	0,59	28



**Abbildung 8:** Korrelation zwischen der Expression der Oberflächenmoleküle TLR2 und TREM-1 auf Neutrophilen und der Neutrophilenkonzentration im Sputum

### 2.5.5 Expression der Oberflächenmoleküle auf Neutrophilen im Vergleich untereinander

Bei der weiteren Auswertung fällt außerdem auf, dass CD11b signifikant mit CD66b ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,83$ ) und CXCR1 ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,39$ ) korreliert (siehe Abbildung 9). Unter den übrigen Oberflächenmolekülen besteht keine Korrelation (siehe Tabelle 9).



**Abbildung 9:** Korrelation zwischen CD11b und CD66b sowie zwischen CD11b und CXCR1

**Tabelle 9:** Zusammenhang zwischen CD11b und weiteren Oberflächenmolekülen auf Neutrophilen

	p-Wert	r-Wert
CD11b – CXCR2	0,47	-0,13
CD11b – TREM-1	0,054	0,34
CD11b – TLR2	0,46	0,14

## 2.6 Enzyme-linked-immuno-sorbant-assay (ELISA)

### 2.6.1 Prinzip des ELISAs

Der ELISA ermöglicht die Untersuchung und Quantifizierung eines Antigens in einer Probe. In dieser Studie wurde mittels eines „solid phase sandwich ELISAs“ die CXCL-8 - Konzentration im Sputumüberstand bestimmt. Dazu wird eine mit gegen das zu messende Zytokin gerichteten Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte beschickt, so dass das Zytokin an die Platte adsorbiert. Anschließend wird die Oberfläche mit der Lösung eines unspezifischen Proteins beschickt. Dadurch wird vermieden, dass in den folgenden Schritten weitere Proteine an der Mikrotiterplatte adsorbieren. Anschließend wird die Oberfläche mit einer Lösung behandelt, die einen Antikörper gegen das zu untersuchende Zytokin (Antigen) enthält. Dieser Antikörper stellt den primären Antikörper dar. Durch waschen werden nicht-gebundene Antikörper entfernt. Anschließend wird ein biotinkonjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt. In einem dritten Schritt wird das Enzym Streptavidin-Peroxidase, das an Biotin bindet, hinzugegeben. Die Streptavidin-Peroxidase katalysiert nach Zufügen einer Substratlösung eine Farbreaktion deren Intensität direkt proportional zu der Zytokin-Konzentration in der ursprünglichen Probe ist und photometrisch quantifiziert werden kann.

## 2.6.2 Durchführung des ELISAs

Für die Bestimmung der CXCL8-Konzentration mittels ELISA wurde der bereits oben erwähnte Sputumüberstand verwandt:

- Capture-Antikörper (= Primärantikörper) mit PBS ohne BSA verdünnen und 100µl/well pipettieren. Bei 25°C 12-24 Stunden inkubieren.
- Dreimal mit PBS + Tween waschen
- Pro well 300µl Blockpuffer hinzufügen und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- Erneut dreimal waschen.
- Hinzufügen von 100µl Standard/Probe pro well und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Abermals dreimal waschen.
- Anschließend 100µl Detektions –Antikörper pro well dazugeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Dreimal waschen.
- 100µl Streptavidin-HRP pro well dazugeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Wiederum dreimal waschen.
- 100µl Substrat Lösung A+B hinzufügen und erneut 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- 50µl Stop-Lösung (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dazugeben.
- Bei 450nm messen.

## 2.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Statistica Version 5, Edition '97 durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Der Gruppenvergleich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels Paarvergleich (Wilcoxon) und der Subgruppenvergleich mittels U-Test durchgeführt. Korrelationen wurden mit dem Spearman Test errechnet. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant angesehen.

### **3 Material**

#### **3.1 Geräte**

- NO- Analysator CLD 88 sp (ECO-Medics, Dürnten, Schweiz)
- DENOX88 (ECO-Medics, Dürnten, Schweiz)
- Spiroware Software(ECO-Medics, Dürnten, Schweiz)
- Laborwaage (Hassa, Lübeck, Deutschland)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Cellcounter (Rierner Medi Tech, Blaustein, Deutschland)
- Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Vortexer (Hassa, Lübeck, Deutschland)
- Zentrifuge (Hassa, Lübeck, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge für Zytospins (Shandon, Pittsburgh, USA)
- Durchflusszytometer: FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Macintosh Power PC 7300 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Minishaker (Hassa, Lübeck, Deutschland)
- Reagiergefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Einmalpipetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

#### **3.2 Durchflusszytometrie**

Antikörper und Reagenzien

- IgM FITC als Isotyp (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- CD66b FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- CXCR1 FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- IgG 2b FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- CD66b + PE anti mouse Ig als Brücke (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- IgG1 PE als Isotyp (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- CD11b PE (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- CXCR2 PE (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- Trem-1 PE (R&D Systems, Mineapolis, USA)
- TLR2 PE (e Bioscience, San Diego, USA)

- IgG 2a PE (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)
- 3 % Paraformaldehyd (PFA) (Riedel-de haen, Seelze, Deutschland)
- FACS Puffer (1x PBS (Gibco, Carlsbad, USA) + 1% BSA + 0,05% NaN<sub>3</sub>)
- Messröhrchen (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA)

### **3.3 Sputumaufbereitung**

- RPMI Medium (Lonza, Basel, Schweiz)
- DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA )
- Sputumröhrchen 25ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zentrifugen- Röhrchen 15ml und 50ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Nylonfilternetze der Größe 41µm, 20µm und 11µm (Millipore, Billerica, USA)
- Filterhalter (Millipore, Billerica, USA)
- 10ml Spritzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

### **3.4 ELISA**

Die CXCL8-Konzentration wurde mit einem ELISA-Testkit der Firma ELISA Development System (Minneapolis, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers gemessen.

- Microplate Reader (Bio RAD, Hercules, USA)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungskollektiv

In die Studie wurden insgesamt 20 Patienten mit CAP aufgenommen. Die Diagnose wurde sowohl klinisch als auch radiologisch gestellt. Bei allen Patienten lag ein nicht-schwerer Verlauf der Pneumonie vor, sie konnten im Durchschnitt nach 9 Tagen (1 Tag – 34 Tage) nach Hause entlassen werden.

Elf Patienten waren männlichen und neun weiblichen Geschlechts. Das durchschnittliche Alter betrug  $66,25 \pm 17$  Jahre.

Insgesamt fünf Patienten waren an chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), von diesen litt zusätzlich einer unter Asthma bronchiale, einer an einem Bronchialkarzinom und ein weiterer an Lungenfibrose erkrankt. Eine Übersicht hierüber gibt Tabelle 10.

Zu den darüber hinaus vorkommenden Grunderkrankungen zählten Diabetes mellitus Typ II, arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Herzrhythmusstörungen, Niereninsuffizienz, rheumatische Arthritis, Vaskulitis, Lymphome und Tumorleiden.

**Tabelle 10:** Übersicht über das Patientenkollektiv

<b>Geschlecht</b>			
Männlich	11	Weiblich	9
<b>Pneumonieform</b>			
Bronchopneumonie	16	Atypische Pneumonie	1
Pleuropneumonie	3		
<b>Pulmonale Vorerkrankungen</b>			
COPD	5	Bronchialkarzinom	1
Asthma bronchiale	1	Lungenfibrose	1
<b>Nikotin</b>			
Nichtraucher	17	Raucher	3

Drei der Patienten waren bereits präklinisch antibiotisch vorbehandelt worden, bei zwei Patienten wurde aufgrund von Therapieversagen die antibiotische Therapie fünf Tage nach Aufnahme umgestellt. Neben der antibiotischen Therapie erhielten neun Patienten zusätzlich Glucocorticoide. Dies ist bei sieben Patienten auf eine pulmonale

Vorerkrankung (siehe Tabelle 10) und bei zweien auf eine Erkrankung des rheumatischen Formenkreises zurückzuführen. Einen Überblick über Erregerspektrum, Therapie und Verlauf der Pneumonie im untersuchten Patientenkollektiv gibt Tabelle 11.

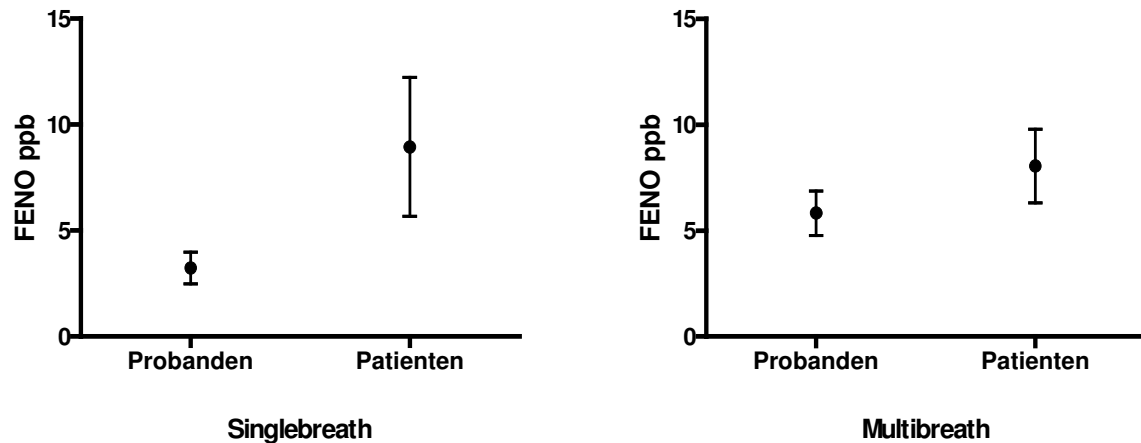
**Tabelle 11:** Erregerspektrum, Therapie und Verlauf der Pneumonien  
(CRP: C-reaktives Protein)

<b>Erregerspektrum</b>			
<i>Citrobacter freundii</i>	1	<i>β</i> -hämolisierende Streptokokken	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	<i>Branhamella catarrhalis</i>	1
Erreger nicht nachweisbar	16		
<b>Antibiotikatherapie</b>			
Moxifloxacin	4	Cephalosporin 2./3.Generation	2
Ampicillin + Sulbactam	1	Piperacillin + Tazobactam	1
Cefuroxim + Clarithromycin	12		
<b>Glucocorticoide</b>			
Keine Glucocorticoidtherapie (GT)	11	inhalative GT	4
Systemische GT	3	systemische und inhalative GT	2
<b>Verlauf:</b>			
Primäres Therapieversagen	2		
Verweildauer im Krankenhaus $\leq$ 7d	11	Verweildauer im Krankenhaus $>$ 7d	9
beatmungspflichtige Patienten	0	verstorbene Patienten	0
<b>Systemische Entzündungsmarker zum Zeitpunkt t0</b>			
CRP 5-100 mg/l	11	CRP 101-200 mg/l	5
CRP $>$ 200 mg/l	4		
Leukozyten $>$ 9000/ $\mu$ l	11	Leukozyten $<$ 4000/ $\mu$ l	0
Temperatur $>$ 38°C	5	Temperatur $<$ 36,5°C	3

## 4.2 FENO-Messung bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zu Gesunden

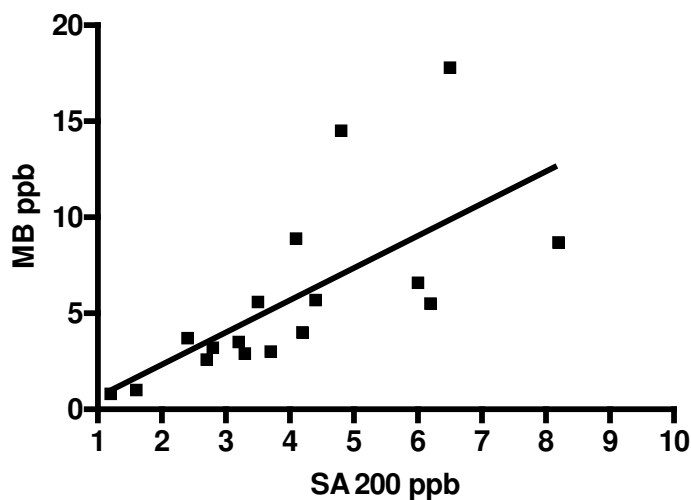
Bei dem Kollektiv der gesunden Probanden wurde im Singlebreath ein FENO von 3,23  $\pm$  0,75 (mean  $\pm$  SEM) und im Multibreath ein FENO von 5,83  $\pm$  1,05 ermittelt. Demgegenüber zeigten sich bei den Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Singlebreath

signifikant ( $9,89 \pm 4,28$ ,  $p < 0,05$ ) sowie im Multibreath grenzwertig signifikant ( $8,43 \pm 2,04$ ,  $p = 0,054$ ) höhere Werte. Dies wird in Abbildung 10 veranschaulicht. Wird nur der nicht mit Glucocorticoiden behandelte Teil des Patientenkollektivs mit den gesunden Probanden verglichen, so sind die FENO-Werte im Patientenkollektiv sowohl im Single- als auch im Multibreath signifikant höher (SA200:  $p = 0,037$ ; MB:  $p = 0,045$ )



**Abbildung 10:** Vergleich der FENO-Konzentration zwischen dem gesundem Probandenkollektiv (N=7) und Pneumoniepatienten zum Aufnahmezeitpunkt t0 gemessen im Singlebreath- (N=17) und Multibreathverfahren (N=20) (SA 200:  $p = 0,046$ ; MB:  $p = 0,054$ )

Im Patientenkollektiv besteht dabei eine signifikante Korrelation zwischen den FENO-Werten im Single- und Multibreath ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,88$ , siehe auch Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Korrelation zwischen FENO-Konzentrationen gemessen im Single- und Multibreathverfahren (N = 32,  $p < 0,001$ )

Während bei den Messungen im Multibreath bei allen Patienten auswertbare Ergebnisse erzielt wurden, konnte der Singlebreath bei einem Viertel der Patienten keine verwertbaren Ergebnisse liefern. Dies galt insbesondere bei den schwerer beeinträchtigten Patienten, für die das im Singlebreath erforderliche Atemmanöver zu anstrengend war.

#### **4.2.1 FENO bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zu systemischen Entzündungsparametern**

Zwischen systemischen Entzündungsparametern und FENO ergab sich weder im Single- noch im Multibreath ein statistisch signifikanter Zusammenhang. Einen Überblick hierüber gibt Tabelle 12.

**Tabelle 12:** Korrelation zwischen der FENO-Konzentration gemessen im Single- und Multibreathverfahren und systemischen Entzündungsparametern

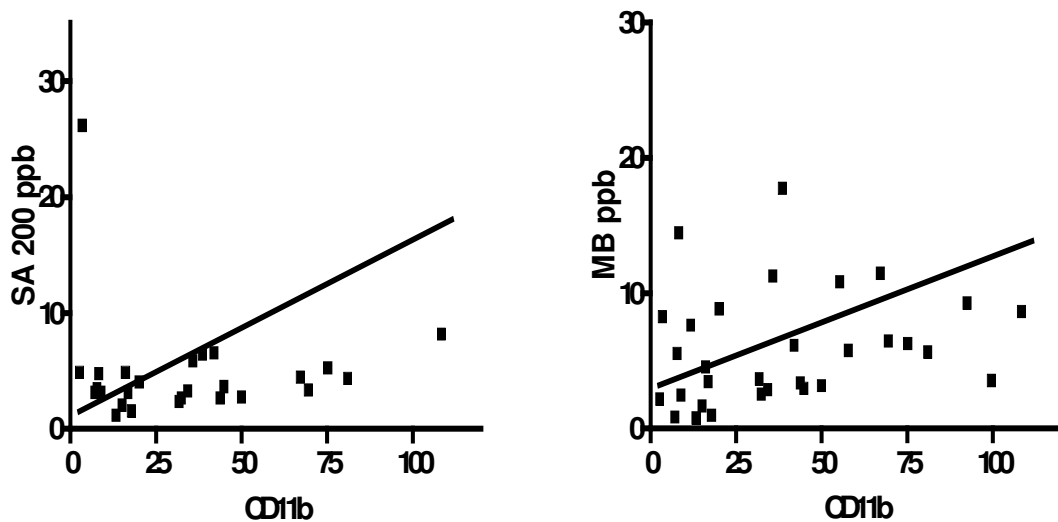
	<b>p-Wert</b>	<b>r-Wert</b>
SA200 – CRP	0,29	0,28
SA200 – Leukozyten	0,4	0,23
SA200 – Temperatur	0,56	-0,2
MB – CRP	0,35	0,22
MB – Leukozyten	0,49	0,17
MB – Temperatur	0,14	-0,4

Betrachtet man jedoch nur den Teil des Patientenkollektivs, der nicht mit Glucocorticoiden behandelt wurde, so zeigt sich eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,56$ ;  $N = 9$ ) zwischen dem CRP-Wert bei Aufnahme und dem FENO gemessen zum Zeitpunkt t0 im Multibreath.

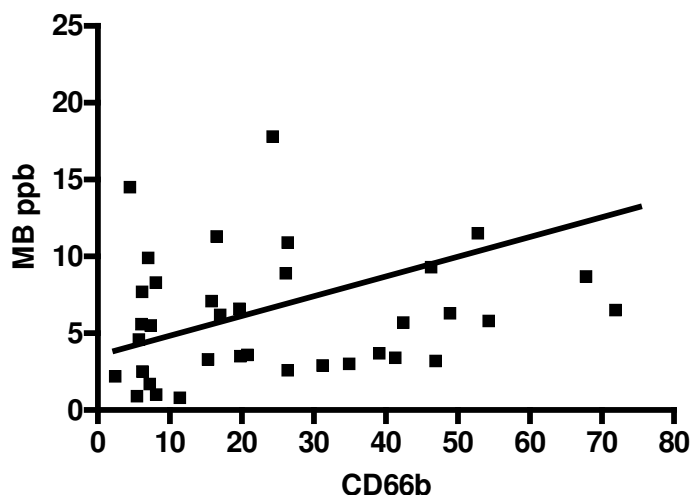
#### **4.2.2 FENO bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Vergleich zu lokalen Entzündungsparametern**

Im Sputum wurden neben der Neutrophilenkonzentration und der absoluten Neutrophilenzahl Aktivierungsmarker von Granulozyten und die CXCL8-Konzentration

bestimmt. Die statistische Auswertung dieser Daten zeigt eine signifikante Korrelation von CD11b mit FENO gemessen im Single- ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,43$ ) und Multibreath ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,46$ ; siehe Abbildung 12) sowie eine signifikante Korrelation von CD66b mit FENO des Multibreath ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,4$ ; siehe Abbildung 13).



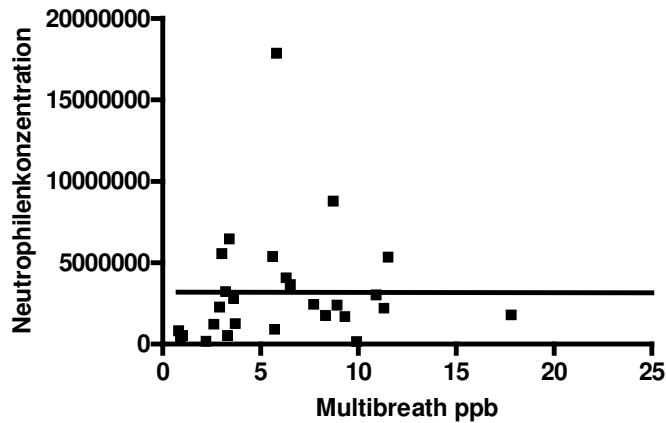
**Abbildung 12:** CD11b in Korrelation mit der FENO-Konzentration gemessen im Singlebreath ( $p = 0,03$ ;  $N = 27$ ) und Multibreath ( $p = 0,01$ ;  $N = 32$ )



**Abbildung 13:** CD66b in Korrelation mit FENO im Multibreath ( $p = 0,01$ ;  $N = 37$ )

Bei den übrigen Parametern ergab sich keine signifikante Korrelation. So besteht, wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, trotz der signifikanten Korrelation zwischen FENO und

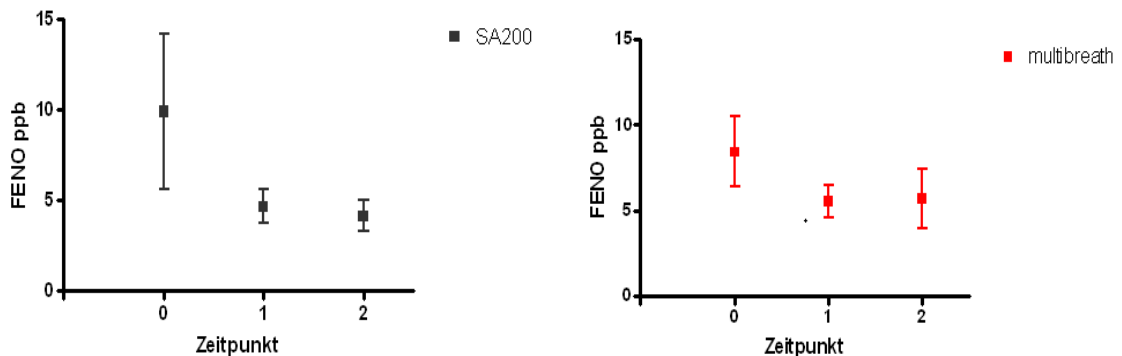
Neutrophilenaktivierungsmarkern kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Neutrophilenkonzentration im Sputum und FENO.



**Abbildung 14:** Zusammenhang zwischen der Neutrophilenkonzentration im Sputum (angegeben in Zellen pro Gramm) und FENO gemessen im Multibreathmodus ( $p=0,98$ ;  $N=28$ )

### 4.3 FENO-Werte im Verlauf

Die FENO-Werte wurden zum Zeitpunkt  $t_1$  und  $t_2$  erneut gemessen. Im Vergleich zur Messung bei Aufnahme ( $t_0$ ) ist in der Verlaufsmessung ( $t_2$ ) sowohl im Single- als auch im Multibreath eine signifikante Abnahme des FENO-Wertes zu erkennen ( $p<0,05$  Wilcoxon matched pair; siehe Abbildung 15). Die genauen Werte sind Tabelle 13 zu entnehmen.



**Abbildung 15:** Darstellung des signifikanten Abfalls der FENO-Konzentration bei Pneumoniepatienten am Aufnahmetag ( $t_0$ ) im Vergleich zur

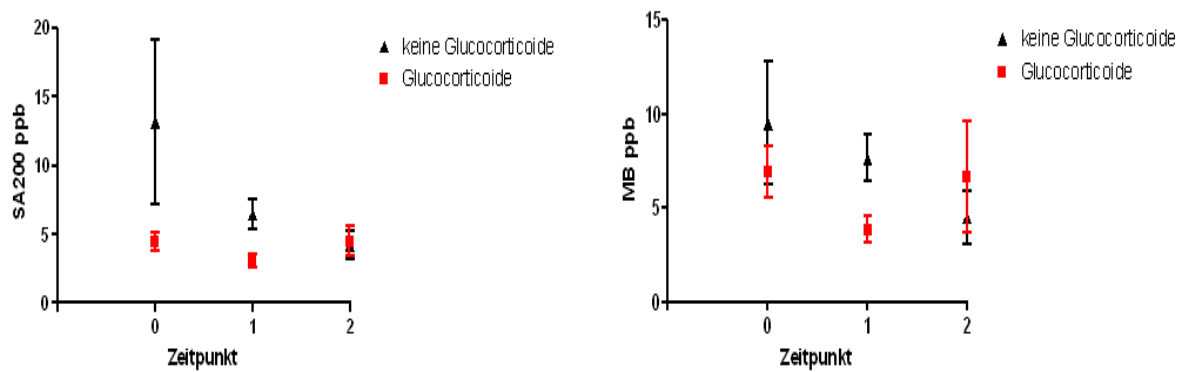
Kontrolluntersuchung zum Zeitpunkt t1. Die FENO-Messung wurde im Singlebreath- und Multibreathverfahren durchgeführt.

**Tabelle 13:** Übersicht über die FENO-Konzentration gemessen im Singlebreath- und Multibreathverfahren bei Pneumoniepatienten zu den Zeitpunkten t0 – t2 angegeben in mean ± SEM

Zeitpunkt	Singlebreath	Multibreath
t 0	9,89 ± 4,28 ppb	8,42 ± 2,04 ppb
t 1	4,66 ± 0,92 ppb	5,54 ± 0,94 ppb
t 2	4,15 ± 0,86 ppb	5,69 ± 1,71 ppb

#### 4.4 Einfluss einer begleitenden Glucocorticoidtherapie auf die FENO-Messung

Aus der Literatur ist bekannt, dass die induzierbare NO-Synthase und somit auch die NO-Produktion in den Atemwegen durch Glucocorticoide gehemmt werden. Da neun der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit Glucocorticoidpräparaten behandelt wurden, bietet sich ein Vergleich zwischen der aus elf Patienten bestehenden Nicht-Glucocorticoidgruppe und der Glucocorticoidgruppe an. In beiden Messmodi sind signifikant höhere FENO-Werte bei der Nicht-Glucocorticoidgruppe als bei der Glucocorticoidgruppe während des Zeitpunktes t0 ( $p < 0,05$ , U-Test) zu erkennen. Zum Zeitpunkt t2 sind im Singlebreath die FENO-Werte beider Gruppen nahezu gleich, während im Multibreath das FENO bei der Glucocorticoidgruppe deutlich höher ist als bei der Nicht-Glucocorticoidgruppe. Die FENO-Werte zu den einzelnen Messzeitpunkten sind Tabelle 14 zu entnehmen, ihr zeitlicher Verlauf wird in Abbildung 16 veranschaulicht.



**Abbildung 16:** FENO-Werte im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von einer begleitenden Glucocorticoidtherapie zu den Zeitpunkten t0 –t2 gemessen im Singlebreath (SA 200) und Multibreath (MB). (Nicht-Glucocorticoidgruppe: N=11; Glucocorticoidgruppe: SA 200: N=7, MB: N=9)

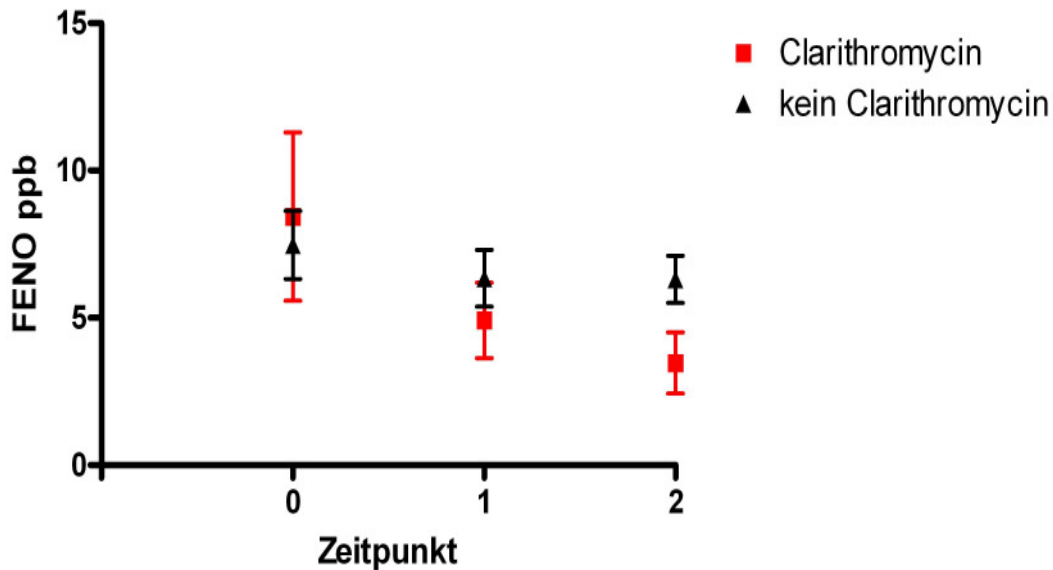
**Tabelle 14:** FENO-Werte im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von einer begleitenden Glucocorticoidtherapie im Single- und Multibreath zu den Zeitpunkten t0 – t2 angegeben in mean ± SEM

Modus	Zeitpunkt	Nicht-Glucocorticoidgruppe	Glucocorticoidgruppe
SA200	t 0	13,16 ± 5,95	4,43 ± 0,68
	t 1	6,45 ± 1,09	3,04 ± 0,48
	t 2	4,25 ± 1,05	4,25 ± 1,08
MB	t 0	9,51 ± 3,29	6,94 ± 1,35
	t 1	7,65 ± 1,23	3,83 ± 0,72
	t 2	4,48 ± 1,41	6,66 ± 2,97

#### 4.5 Einfluss der antibiotischen Therapie auf die FENO-Messung

Ein Teil der Patienten wurde mit dem Makrolid-Antibiotikum Clarithromycin behandelt, von dem neben der antimikrobiellen Wirkung auch immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben sind. Daher verglichen wir, ob ein Unterschied zwischen den FENO-Werten von Patienten besteht, die Clarithromycin erhalten haben, im Unterschied zu anders behandelten Patienten. Aufgrund der niedrigen Fallzahl war eine statistische Auswertung

nicht sinnvoll, so dass lediglich eine graphische Darstellung angefertigt wurde (siehe Abbildung 17).



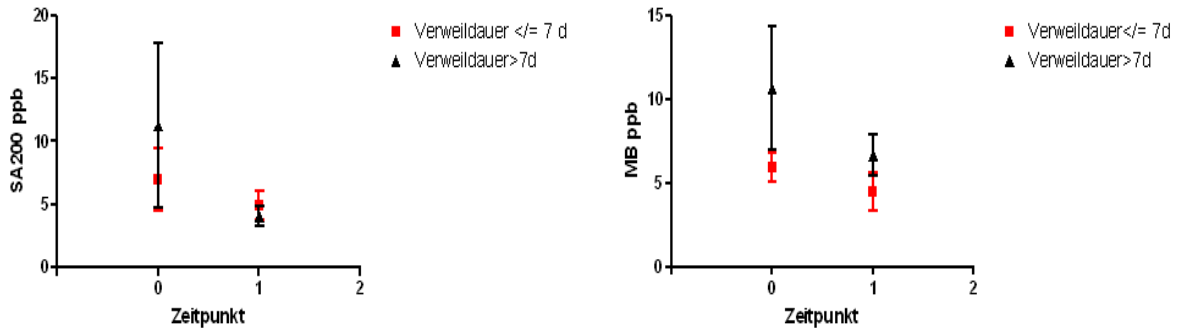
**Abbildung 17:** FENO-Konzentration gemessen im Multibreath im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der antibiotischen Therapie (Clarithromycin: N=12, Kein Clarithromycin: N=8).

In der graphischen Darstellung ist in der Clarithromycingruppe ein stärkerer Abfall der FENO-Konzentration zu erkennen als in der Nicht-Clarithromycingruppe. Allerdings liegt die durchschnittliche FENO-Konzentration zum Zeitpunkt t0 in der Clarithromycingruppe ppb höher als in der Nicht-Clarithromycingruppe.

#### 4.6 Zusammenhang zwischen FENO-Konzentration und Verweildauer

Die Verweildauer im Krankenhaus stellt einen Indikator für den Schweregrad einer Pneumonie dar. Patienten mit nicht-schwerer Pneumonie können in der Regel nach fünf bis sieben Tagen aus dem Krankenhaus entlassen werden, während die Verweildauer bei Patienten mit schwerer Pneumonie deutlich höher liegt. Daher untersuchten wir, ob es einen Zusammenhang zwischen FENO und der Verweildauer gibt. Wir teilten das Patientenkollektiv in zwei Gruppen ein. Dabei bilden die Patienten, die innerhalb von sieben oder weniger Tagen entlassen wurden, die erste Gruppe, die Patienten mit einer längeren Verweildauer als sieben Tage die zweite Gruppe. Trotz des in Abbildung 18

erkennbaren Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt t0, ergibt die statistische Auswertung keine Signifikanz (SA200:  $p=0,53$ ; MB:  $p=0,37$ ; U-Test).



**Abbildung 18:** Darstellung der FENO-Konzentration gemessen im Single- und Multibreath zu den Zeitpunkten t0 und t1 nach Unterteilung des Patientenkollektivs in Abhängigkeit von der Verweildauer im Krankenhaus. (Verweildauer  $\leq 7$  Tage:  $N=11$ , Verweildauer  $> 7$  Tage:  $N=9$ )

Über den Zeitpunkt t2 kann aufgrund der zu kleinen Fallzahl in der ersten Gruppe keine Aussage getroffen werden.

## 5 Diskussion

FENO ist bei Pneumonien bisher unzureichend untersucht. Die Literaturrecherche ergab lediglich eine Arbeit, in der nasale und tracheale NO-Konzentrationen bei intubierten Patienten gemessen wurden. In dieser konnte gezeigt werden, dass intubierte Patienten mit beatmungsassoziierter Pneumonie höhere NO-Werte haben, als beatmete Patienten ohne komplizierende Pneumonie (Adrie et al., 2001). Diese von Adrie et al. erzielten Ergebnisse gelten jedoch nur für das relativ kleine Kollektiv der Patienten mit beatmungsassoziierter Pneumonie. Daher war es Ziel dieser Studie, das Verhalten von FENO bei nicht-schwerer ambulant erworbener Pneumonie, die einen wesentlich größeren Anteil an Patienten betrifft herauszuarbeiten.

Dazu wurde zunächst bei einem Kollektiv von gesunden Probanden FENO im Singlebreath (Mean  $\pm$  SEM: 3,23 ppb  $\pm$  0,75 ppb; Median: 4,0 ppb) und im Multibreath (Mean  $\pm$  SEM: 5,83 ppb  $\pm$  1,05 ppb; Median: 6,7) ermittelt. In der reveno-Studie führten Olivieri et al. die FENO-Messung mit dem auch in dieser Studie verwandten Chemilumineszenz- Analysator (CLD88, Ecomedics, Dürnten, Schweiz) an 204 gesunden Probanden durch, mit dem Ziel Referenzwerte für die FENO-Messung zu etablieren. Die Messungen wurden bei einer Flussrate von 50, 100 und 200 ml/s im Singlebreath-Modus durchgeführt. Als wichtigstes Ergebnis dieser Studie wurden bei Männern signifikant höhere FENO-Werte als bei Frauen gemessen.

Aufgrund der großen Variationsbreite der FENO-Werte im 50ml/s-Modus wurde empfohlen, Werte, die zwischen der 5- und 95%-Perzentile liegen (Männer: 4,5 - 20,6 ppb, Median: 11,4 ppb; Frauen: 3,6 - 18,2 ppb, Median: 9,7 ppb), als Referenzwerte anzusehen. Bei einer Flussrate von 200ml/s ergeben sich dementsprechend Referenzwerte von 1,6 – 8,3 ppb (Median: 4,1 ppb) bei Männern und 1,6 - 5,9 ppb (Median: 3,3 ppb) bei Frauen (Olivieri et al., 2006). Die Messergebnisse bei gesunden Probanden unserer Studie entsprechen somit im Singlebreath bei einer Flussrate von 200ml/s annähernd dem Medianwert der reveno-Studie. Der Median von FENO bei einer Flussrate von 50 ml/s, der in unserer Studie im Multibreath gemessen wurde, liegt mit 6,7 ppb zwischen der 20. und 25. Perzentile in der reveno-Studie. Diese Abweichung kann einerseits auf unsere kleine Probandenzahl (N=7) zurückzuführen sein, andererseits auf der Tatsache, dass in unserer Studie FENO bei einer Flussrate von 50 ml/s im Multibreath-Modus gemessen wurde, während in der reveno-Studie hierzu der Singlebreath verwendet wurde, beruhen.

Der Vergleich zwischen dem Kollektiv der gesunden Probanden und den Pneumoniepatienten zeigt, dass die FENO-Werte bei den Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t0 im Singlebreath signifikant und im Multibreath grenzwertig signifikant höher sind als bei den Gesunden. Dies bestätigt die Erfahrungen von Adrie et al., die nasales und tracheales FENO bei beatmeten Patienten untersucht und bei Patienten mit beatmungsassoziiertes Pneumonie signifikant höhere FENO-Konzentrationen gemessen haben, als bei beatmeten Patienten ohne Pneumonie (Adrie et al., 2001). Vergleicht man nur den Teil des Patientenkollektivs, der nicht mit Glucocorticoiden behandelt wurde, mit den Gesunden, so liegt das Signifikanzniveau deutlich höher, so dass im Patientenkollektiv auch im Multibreath die FENO-Werte signifikant höher liegen als bei den gesunden Probanden. FENO stellt somit insbesondere bei nicht mit Glucocorticoiden behandelten Patienten einen geeigneten Parameter, Entzündung in der Lunge anzuzeigen, dar.

Da sowohl im Single- als auch im Multibreath die FENO-Werte der meisten Pneumoniepatienten innerhalb des in der reveno-Studie vorgeschlagenen Referenzbereichs liegen, wird deutlich, dass diese vorgeschlagenen Referenzwerte nur eine grobe Orientierung bieten können. „Eine Orientierung am intraindividuellen Normalwert“ scheint, da die „intraindividuellen...NO-Werte...ohne krankheitsbedingte Einflüsse in der Regel sehr stabil und...gut reproduzierbar“ sind, „aussagekräftiger, als ein anhand von Gruppenuntersuchungen ermittelter Medianwert“ (Holz et al., 2007).

Die stark positive Korrelation zwischen den bei unterschiedlichen Flussraten gemessenen FENO-Werten ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,88$ ), wird durch die reveno-Studie bestätigt (Olivieri et al., 2006). Daher kann angenommen werden, dass beide Methoden eine geeignete Möglichkeit darstellen, FENO zu bestimmen. In der reveno-Studie wurde die Messung bei einer Flussrate von 200 ml/s nicht empfohlen, da bei einigen Probanden keine reproduzierbaren Werte erzielt werden konnten (Olivieri et al., 2006; Scadding, 2007).

Aus der Literatur ist bekannt, dass FENO eine starke Korrelation mit eosinophiler Atemwegsentszündung aufweist. Dieser Zusammenhang ist bei Asthma (Jatakanon et al., 1998; Berlyne et al., 2000; Ramirez-Prieto et al., 2006) sehr gut untersucht, konnte aber auch bei COPD und eosinophiler Bronchitis nachgewiesen werden (Taylor et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte bei unserem Patientenkollektiv, das sich durch niedrige Eosinophilenzahl im Sputum auszeichnete, keine signifikante Korrelation zwischen FENO und Eosinophilen im induzierten Sputum nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin,

dass die vermehrte NO-Bildung bei Pneumonie durch eine andere Zellpopulation bewerkstelligt wird. Dazu sollten Epithel, Neutrophile und Makrophagen in Betracht gezogen werden (Nevin und Broadley, 2002; Ricciardolo, 2003; Holz et al., 2007). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen FENO und Neutrophilen im Sputum konnte nicht nachgewiesen werden, aber es ist eine signifikante Korrelation zwischen FENO im Single- und Multibreath und dem Neutrophilenaktivierungsmarker CD11b, sowie zwischen FENO im Multibreath und dem selektiven Neutrophilenaktivierungsmarker CD66b zu sehen. Da die NO-Produktion durch Neutrophile deren Aktivierung voraussetzt (Verchier et al., 2007), kann davon ausgegangen werden, dass die aktivierten Neutrophilen an der gesteigerten NO-Produktion bei Pneumonien beteiligt sind. Die FENO-Messung stellt somit eine geeignete und schnelle Methode dar, um lokale Entzündungsaktivität bei Pneumonie zu beurteilen.

Obwohl die nicht-schwere Pneumonie eine lokal umschriebene Entzündung darstellt, spielen bei ihrer Diagnostik und Verlaufskontrolle systemische Entzündungsparameter, wie CRP, Leukozytenkonzentration im Blut und Körpertemperatur, eine wichtige Rolle. In dieser Studie bestand zwischen keinem dieser systemischen Marker der Entzündung und FENO eine signifikante Korrelation. Dies bestätigt die Ergebnisse von Sutherland et al., die bei Asthmapatienten zeigten, dass kein Zusammenhang zwischen Atemwegsentzündung, bestimmt durch exhalierendes NO und der systemischen Reaktion auf die Entzündung, gemessen durch CRP und Fibrinogen, besteht (Sutherland et al., 2007).

Im Gegensatz dazu zeigt sich, wenn man nur den Teil des Patientenkollektivs, der nicht mit Glucocorticoiden behandelt wurde, betrachtet zum Zeitpunkt t0 eine signifikante Korrelation zwischen CRP und FENO im Multibreath. Gegebenfalls ist das Resultat im Gesamtkollektiv verzerrt worden, da eine inhalative Glucocorticoidtherapie, die bei knapp einem Drittel der Patienten vorlag, ihren immunmodulatorischen Effekt stärker auf die pulmonalen als auf die systemischen Entzündungsreaktionen ausübt. Aufgrund der kleinen Fallzahl (N = 9) sollte dieser Zusammenhang jedoch vorsichtig betrachtet werden.

Bei den Verlaufsmessungen zeigte sich ein signifikanter Abfall des FENO-Wertes zum Zeitpunkt t2 gegenüber dem Aufnahmezeitpunkt t0. Dies unterstützt die These, dass die erhöhten FENO-Werte auf die Pneumonie zurückzuführen sind. Darüber hinaus wird dadurch deutlich, dass die Messung des FENO bei Pneumonien eine Methode zur Therapiekontrolle darstellen kann. Möglicherweise können so Therapieversager

frühzeitiger erkannt und ihre antibiotische Therapie umgestellt werden. Dieses nicht-invasive Verfahren wird bereits erfolgreich bei Asthma eingesetzt und ermöglicht es dort, die Therapie für den einzelnen Patienten zu optimieren (Kharitonov und Barnes, 2006; Schafroth et al., 2007).

Christ-Crain et al. zeigten vor zwei Jahren, dass Procalcitonin ein empfindlicher Marker bei CAP ist, die Anwesenheit einer Infektion sowie ihr Ansprechen auf die Antibiotikatherapie zu bewerten. Ebenso beschrieben Schuetz et al. vor Kurzem, dass bei CAP die systemische Konzentration von Endothelin-1 Precursorpeptiden mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Kurzzeit-Outcome korreliert. Diese beiden neuen Biomarker müssen jedoch noch in großen multizentrischen Studien untersucht werden, bevor eine endgültige Aussage zu ihrem diagnostischen Nutzen getroffen werden kann (Christ-Crain et al., 2006; Schuetz et al., 2008).

Während durch die Bestimmung von Procalcitonin und Endothelin-1 Precursorpeptide die systemische Reaktion auf ambulant erworbene Pneumonien und ihre Antibiotikatherapie überwacht werden kann, wird bei der FENO-Messung die kompartimentbezogene Reaktion auf diese erfasst.

Der Vergleich der FENO-Werte zwischen Patienten, die keine Glucocorticoide erhielten und Patienten, die Glucocorticoide erhielten, zeigte zum Zeitpunkt t0 deutlich niedrigere Werte in der Glucocorticoidgruppe. Dies entspricht den Erfahrungen bei Asthmapatienten (Schafroth et al., 2007) und ist auf die Hemmung der iNOS durch Glucocorticoide zurückzuführen (Kitsiopoulou et al., 2007). Der Anstieg des FENO zum Zeitpunkt t2 beruht wahrscheinlich auf einer Reduktion der Glucocorticoiddosis. Der signifikante Unterschied zwischen den FENO-Werten der beiden Subgruppen wirft die Frage auf, ob Glucocorticoide einen günstigen Effekt bei nicht-schwerer ambulant erworbener Pneumonie haben. Confalonieri et al. beschrieben 2005 nach Durchführung einer randomisierten, kontrollierten Studie, dass die intravenöse Gabe von niedrigdosiertem Hydrocortison bei schwerer CAP die Rückbildung der Entzündung unterstützt und neuem Auftreten von sepsisassoziierten Komplikationen vorbeugt (Confalonieri et al., 2005; Confalonieri und Trevisan, 2006). Diese Studie wurde jedoch stark kritisiert, da ein Ungleichgewicht zwischen Verum- und Kontrollgruppe aufgrund der kleinen Patientenzahl vorlag (Scales et al., 2005; Restrepo et al., 2005) und die Patienten nicht auf eine Nebennierendysfunktion untersucht worden sind (Jalloul, 2005).

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Makroliden nicht nur eine antibiotische sondern auch eine immunmodulatorische Wirkung bei CAP besitzen (Amsden, 2005; Giamarellos-Bourboulis, 2008). Da in unserer Studie die Fallzahl klein und die antibiotische Therapie der Patienten heterogen war, ist eine statistische Auswertung unserer Daten nicht sinnvoll. In der graphischen Darstellung ist jedoch tendenziell zu erkennen, dass der Abfall des FENO in der Clarithromycingruppe stärker ausgeprägt ist, als in der Nicht-Clarithromycingruppe. Dies passt gut zu dem in der Literatur vermuteten Sachverhalt, da FENO Entzündungsintensität anzeigt.

Des Weiteren richteten wir ein Augenmerk auf die Frage, ob anhand des FENO-Wertes eine Aussage im Hinblick auf Schweregrad oder Verlauf der Pneumonie getroffen werden kann. Da in dem von uns betrachteten Patientenkollektiv keine intensivmedizinische Versorgung notwendig war und kein Patient im Rahmen seiner Pneumonie verstarb, nutzten wir die Verweildauer der Patienten im Krankenhaus, als indirekten Hinweis auf die Schwere der Pneumonie. Das Patientenkollektiv wurde daher anhand der Verweildauer in zwei Gruppen aufgeteilt und die FENO-Werte dieser Subgruppen analysiert. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte dabei nicht ermittelt werden. Jedoch ist anhand der grafischen Darstellung besonders im Multibreath eine interessante Tendenz zu erkennen. Bei der Analyse der FENO-Werte in den beiden Subgruppen wurden weitere Faktoren, die FENO beeinflussen, aufgrund der kleinen Fallzahl in unserer Studie nicht berücksichtigt. Insbesondere die begleitende Glucocorticoidtherapie sowie Begleiterkrankungen können die Ergebnisse verfälscht haben. Insofern ist eine größere Fallzahl erforderlich, um festzustellen, ob die in der Grafik erkennbare Tendenz zufällig ist oder doch ein signifikanter Zusammenhang besteht.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die FENO-Messung bei Patienten mit nicht-schwerer CAP eine geeignete Methode ist, um Entzündungsaktivität im unteren Respirationstrakt bei Pneumonien zu ermitteln und die Rückbildung der lokalen Entzündung nach Beginn der antibiotischen Therapie zu überwachen. Während die Messung im Singlebreath bei einer Flussrate von 200ml/s für einen Teil der Patienten nicht durchzuführen ist und in der reveno-Studie aufgrund von schlechter Reproduzierbarkeit nicht empfohlen wurde, bietet der Multibreath mit einer Flussrate von 50 ml/s ein auch für schwerer beeinträchtigte Patienten gut durchzuführendes, schnelles, nicht-invasives und reproduzierbares (Olivieri et al., 2006) Messverfahren.

Bevor der klinische Nutzen der FENO-Messung bei CAP endgültig bewertet werden kann, sind weitere Untersuchungen notwendig. So müssen größere Patientenkollektive mit unterschiedlichen Schweregraden untersucht werden, damit Einflussgrößen auf die FENO-Messung, wie eine begleitende Glucocorticoidtherapie, Art der Antibiotikatherapie, Vorerkrankungen, Alter und Geschlecht, erfasst werden und das Patientenkollektiv entsprechend der Einflussgrößen differenziert betrachtet werden kann.

Weiterhin sollte erforscht werden, inwieweit sich die FENO-Messung bei Pneumoniepatienten, die eine immunsuppressive Therapie erhalten, als sinnvoll erweist.

Darüber hinaus sollte die FENO-Messung auch bei Patienten mit nosokomialen Pneumonieformen untersucht werden, da auch bei diesen ein klinischer Nutzen möglich ist. Insbesondere bei beatmungsassoziierten Pneumonien wäre es wünschenswert, anhand nicht-invasiver Methoden wie der FENO-Messung die Antibiotikatherapie zu optimieren und protektive Beatmungsstrategien zu identifizieren.

## 6 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) wird in unterschiedlichen Zellen des Respirationstraktes durch die NO-Synthase (NOS) produziert. Zu diesen zählen Epithel, Endothel, autonome Nervenzellen sowie Leukozyten. Während den konstitutiven Isoformen der NOS im Respirationstrakt eine bronchoprotektive Funktion zugesprochen wird, gilt NO, das von der induzierbaren NOS gebildet wird, als proinflammatorischer und immunmodulatorischer Mediator.

Bei Asthmapatienten wird die Messung von NO im Exhalat als Maß für Entzündungsintensität eingesetzt. Dadurch gelingt es, einerseits diagnostische und prognostische Aussagen zu treffen, andererseits ist ein Monitoring des Krankheitsverlaufs und dadurch eine Optimierung der Therapie möglich. Während die NO-Messung bei einer Vielzahl von Atemwegserkrankungen bereits untersucht wurde, ist ihre Wertigkeit bei der Diagnose und Überwachung von Pneumonien bisher unzureichend erforscht. Unklar ist dabei, ob sich NO-Werte bei Pneumoniepatienten von den NO-Werten gesunder Probanden unterscheiden, ob es einen Zusammenhang zu anderen lokalen und systemischen Entzündungsmarkern gibt und welchen Einfluss die Therapie auf die NO-Werte hat.

Dazu wurde bei sieben gesunden Probanden das fraktionierte endexpiratorische NO (FENO) in einem Singlebreathverfahren bei einer Flussrate von 200 ml/s und in einem Multibreathverfahren bei 50 ml/s bestimmt. Diese beiden Messungen wurden ebenfalls bei einem Kollektiv von 20 hospitalisierten Patienten mit nicht-schwerer ambulant erworbener Pneumonie (community acquired pneumonia, CAP) am Aufnahmetag (t<sub>0</sub>) sowie zu zwei Kontrollzeitpunkten drei bis vier Tage (t<sub>1</sub>) und fünf bis acht Tage (t<sub>2</sub>) nach Aufnahme durchgeführt. Bei den Patienten wurde zusätzlich an allen drei Zeitpunkten die Neutrophilenzahl und -aktivierung im Sputum bestimmt. Die Neutrophilenaktivierung wurde anhand der Expression von Oberflächenmolekülen, die durchflusszytometrisch an einem FACScan Analyzer gemessen wurden, ermittelt. Darüber hinaus wurde im Sputumüberstand die Konzentration von Interleukin-8 (IL-8/CXC Chemokin 8, CXCL8) mittels eines ELISA bestimmt.

Die FENO-Werte lagen in beiden Messverfahren bei Pneumoniepatienten zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> signifikant höher als bei Gesunden (SA200:  $9,89 \pm 4,28$  vs.  $3,23 \pm 0,75$ ; MB:  $8,43 \pm 2,04$  vs.  $5,83 \pm 1,05$ ). Darüber hinaus zeigten sich bei Messungen am Kontrollzeitpunkt t<sub>2</sub> signifikant niedrigere FENO-Werte als zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> ( $p < 0,05$ ). Außerdem ergab sich

eine hochsignifikante Korrelation zwischen den FENO-Werten in Single- und Multibreath ( $p < 0,001$ ). Während der Vergleich mit systemischen Entzündungsparametern keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ergab, konnte eine signifikante Korrelation zwischen FENO (Single- und Multibreath) und der Expression des Neutrophilenaktivierungsmarkers CD11b auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten im induziertem Sputum ( $p < 0,05$ ) sowie FENO (Multibreath) und der Expression des selektiven Neutrophilenaktivierungsmarkers CD66b auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten im induzierten Sputum ( $p < 0,05$ ) errechnet werden.

Eine begleitende Glucocorticoidtherapie war mit signifikant niedrigere FENO-Werten assoziiert (Single- und Multibreath:  $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die FENO-Messung insbesondere im Multibreathverfahren bei Patienten mit nicht-schwerer CAP eine geeignete Methode darstellt, um Entzündungsintensität im unteren Respirationstrakt zu messen und um die Therapie zu überwachen. Dabei sollte das Augenmerk auf den individuellen FENO-Wert des Patienten und sein Verlauf gerichtet werden, da Referenzwerte für FENO lediglich eine grobe Orientierung bieten können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine begleitende Glucocorticoidtherapie einen günstigen Effekt auf die lokale Entzündungsintensität bei nicht-schwerer CAP hat.

Eine endgültige Aussage zum klinischen Nutzen der FENO-Messung bei Pneumoniekapatienten ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Dazu sind größer angelegte Studien notwendig, bei denen Einflussgrößen auf die FENO-Messung besser beachtet werden können. Darüber hinaus ist es sinnvoll, die FENO-Messung bei nosokomialen Pneumonieformen zu untersuchen.

## 7 Literatur

Aderem, A.: Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. *Crit Care Med* 29, 16-18 (2001)

Adrie, C., Monchi, M., Dinh-Xuan, A.T., Dall'Ava-Santucci, J., Dhainaut, J.F., Pinsky, M.R.: Exhaled and nasal nitric oxide as a marker of pneumonia in ventilated patients. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 163, 1143-1149 (2001)

Amsden, G. W.: Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J.Antimicrob.Chemother.* 55, 10-21 (2005)

Barnes, P.J., Liew, F.Y.: Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today* 16, 128-30 (1995)

Berlyne, G.S., Parameswaran, K., Kamada, D., Efthimiadis, A., Hargreave, F.E.: A comparison of exhaled nitric oxide and induced sputum as markers of airway inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 106, 638-44 (2000)

Bleharski, J.R., Kiessler, V., Buonsanti, C., Sieling, P.A., Stenger, S., Colonna, M., Modlin, R.L.: A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J.Immunol.* 170, 3812-3818 (2003)

Böcker, W., Denk, H., Heitz, U.: Entzündung. In: Böcker, W., Denk, H., Heitz, U.: *Pathologie. 2. Auflage*, 71-73, Urban und Fischer, München (2001)

Borregaard, N., Cowland, J.B.: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 89, 3503-3521 (1997)

Bouchon, A., Dietrich, J., Colonna, M.: Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J.Immunol.* 164, 4991-4995 (2000)

- Brindicci, C., Ito, K., Barnes, P.J., Kharitonov, S.A.: Effect of an inducible nitric oxide synthase inhibitor on differential flow-exhaled nitric oxide in asthmatic patients and healthy volunteers. *Chest*. 132, 581-588 (2007)
- Buhling, F., Ittenson, A., Kaiser, D., Tholert, G., Hoffmann, B., Reinhold, D., Ansorge, S., Welte, T.: MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia. *Immunol.Lett*. 71, 185-190 (2000)
- Chakrabarti, S., Zee, J. M., Patel, K.D.: Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J.Leukoc.Biol*. 79, 214-22 (2006)
- Christ-Crain, M., Stolz, D., Bingisser, R., Muller, C., Miedinger, D., Huber, P.R., Zimmerli, W., Harbarth, S., Tamm, M., Muller, B.: Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 174, 84-93 (2006)
- Clough, P.N., Trush, B.A.: Mechanism of chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone. *Trans. Faraday Soc*. 63, 915-925 (1967)
- Colonna, M., Facchetti, F.: TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J.Infect.Dis*. 187, 397-401 (2003)
- Condliffe, A.M., Chilvers, E.R., Haslett, C., Dvansfield, I.: Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology*. 89,105-111 (1996)
- Confalonieri, M., Trevisan, R.: Prolonged infusion of hydrocortisone in patients with severe community acquired pneumonia. *Recenti Prog.Med*. 97, 32-326 (2006)
- Confalonieri, M., Urbino, R., Potenta, A., Piatella, M., Parigi, P., Puccio, G., Della,Porta, R., Giorgio, D., Blasi, F., Umberger, R., Meduri, G.U.: Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 171, 242-248 (2005)
- Garn, H., Siese, A., Stumpf, S., Wensing, A., Renz, H., Gemsa, D.: Phenotypical and functional characterization of alveolar macrophage subpopulations in the lungs of NO<sub>2</sub>-exposed rats. *Respir.Res*. 7, 4 (2006)

Gaston, B., Drazen, J.M., Loscalzo, J., Stamler, J.S.: The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149, 538-551 (1994)

Giamarellos-Bourboulis, E.J.: Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. *Int.J.Antimicrob.Agents.* 31, 12-20 (2008)

Guo, R.F. Ward, P.A.: Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model *Free Radic.Biol.Med.* 33, 303-10 (2002)

Holz, O., Buhl, R., Hausen, T., von Berg, A., Weber, M., Worth, H., Magnussen, H.: Measuring airway inflammation in clinical practise - application and interpretation. *Pneumologie.* 61, 194-201 (2007)

Huntemann, I., Lorenz, J.: Ambulant erworbene Pneumonie (AEP) - Community Acquired Pneumonia (CAP). ([www.capnetz.de](http://www.capnetz.de) Tag des Zugriffs: 12. Februar 2008)

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 9265-9269 (1987)

Jalloul, A.: Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: the role of relative adrenal insufficiency. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172, 781 (2005)

Jatakanon, A., Lim, S., Kharitonov, S.A., Chung, K.F., Barnes, P.J.: Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax.* 53, 91-95 (1998)

Kasper, B., Brandt, E., Brandau, S., Pertersen, F.: Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J.Immunol.* 179, 2584-2591 (2007)

Kharitonov, S.A., Barnes, P.J.: Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur.Respir.J.* 16, 781-792 (2000)

Kharitonov, S.A., Barnes, P.J.: Exhaled biomarkers. *Chest.* 130, 1541-1546 (2006)

Kharitonov, S.A., Barnes, P.J.: Nasal contribution to exhaled nitric oxide during exhalation against resistance or during breath holding. *Thorax.* 52, 540-544 (1997)

- Kitsiopoulou, E., Hatziefthimiou, A.A., Gourgoulianis, K.I., Molyvadas, P.A.: Resting tension affects eNOS activity in a calcium-dependent way in airways. *Mediators.Inflamm.* Artikel-ID: 24174.Epub (2007)
- Malik, M., Bakshi, C.S., Sahay, B., Shah, A., Lotz, S.A., Sellati, T.J.: Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis*. *Infect.Immun.* 74, 3657-3662 (2006)
- Menendez, R., Cavalcanti, M., Reyes, S., Mensa, J., Martinez, R., Marcos, M.A., Filella, X., Niedermann, M., Torres, A.: Markers Of Treatment Failure In Hospitalized Community-Acquired Pneumonia. *Thorax.* 63, 447-52 (2008)
- Mizgerd, J.P.: Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin.Immunol.* 14, 123-132 (2002)
- Moncada, S.: The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 28, 97-99 (1993)
- Nevin, B.J., Broadley, K.J.: Nitric oxide in respiratory diseases. *Pharmacol.Ther.* 95, 259-293 (2002)
- O'Neill, H.C., Rancourt, R.C., White, C.W.: Lipoic Acid suppression of neutrophil respiratory burst: effect of NADPH. *Antioxid.Redox.Signal.* 10, 277-286 (2008)
- Olivieri, M., Talamini, G., Corradi, M., Perbellini, L., Mutti, A., Tantucci, C., Malerba, M. : Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. *Respir.Res.* 7, 94-99 (2006)
- Ortega, H.G.: Exhaled nitric oxide: A non-invasive method to assess airways inflammation in asthmatics. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 9. 6, 191-94 (2000)
- Paganin, F., Lilienthal, F., Bourdin, A., Lugagne, N., Tixier, F., Genin, R., Yvin, J.L.: Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *Eur.Respir.J.* 24, 779-785 (2004)
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327, 524-526 (1987)

Pignatti, P., Moscato, G., Casarini, S., Delmastro, M., Poppa, M., Burnett, G., Pisati, P., Balbi, B.: Downmodulation of CXCL8/IL-8 receptors on neutrophils after recruitment in the airways. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115, 88-94 (2005)

Pilione, M.R., Agosto, L.M., Kennett, M.J., Harvill, E.T.: CD11b is required for the resolution of inflammation induced by *Bordetella bronchiseptica* respiratory infection. *Cell Microbiol.* 8, 758-768 (2006)

Raghavendran, K., J. M. Mylotte, and F. A. Scannapieco "Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation" *Periodontol.* 2000; 44: S164-177

Ramirez-Prieto, M.T., Garcia-Rio, F., Villamor, J.: Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring. *Med.Clin.(Barc.).* 127, 386-396 (2006)

Restrepo, M.I., Angel, L.F., Mortensen, E.M., Anzueto, A.: Steroid infusion for severe pneumonia: not so fast. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172, 781-783 (2005)

Ricciardolo, F.L.: Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax.* 58, 175-182 (2003)

Ronnefarth, V.M., Erbacher, A.I., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Nordheim, A., Rammensee, H.G., Decker, P.: TLR2/TLR4-independent neutrophil activation and recruitment upon endocytosis of nucleosomes reveals a new pathway of innate immunity in systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 177, 7740-7749 (2006)

Scadding, G.: Nitric oxide in the airways. *Curr.Opin.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 15, 258-263 (2007)

Scales, D.C., Ferguson, N.D., Friedrich, J.O.: Stop right there...I gotta know right now! Do steroids really help for CAP? *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172, 643-644 (2005)

Schafroth, Torok S., Leuppi, J.D.: Bronchial hyper-responsiveness and exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Swiss.Med.Wkly.* 137, 385-391 (2007)

Schuetz, P., Stolz, D., Mueller, B., Morgenthaler, N., Struck, J., Mueller, C., Bingisser, R., Tamm, M., Christ-Crain, M.: Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC.Infect.Dis.* 8, 22-30 (2008)

Silkoff, P.E., Deykin, A., Dweik, R., Laskowski, D., Baraldi, E., Lundberg, J.O., Erzurum, S.C., Metha, S.: ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 171, 912-930 (2005)

Sutherland, T.J., Taylor, D.R., Sears, M.R., Cowan, J.O., McLachlan, C.R., Filsell, S., Williamson, A., Greene, J.M., Poulton, R., Hancox, R.J.: Association between exhaled nitric oxide and systemic inflammatory markers. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 99, 534-539 (2007)

Taylor, D.R., Pijnenburg, M.W., Smith, A.D., DeJongste, J.C. : Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax.* 61, 817-827 (2006)

Verchier, Y., Lardy, B., Nguyen, M.V., Morel, F., Arbault, S., Amatore, C.: Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 361, 493-498 (2007)

Yoon, J., Terada, A., Kita, H.: CD66b Regulates Adhesion and Activation of Human Eosinophils. *J.Immunol.* 179, 8454-8462 (2007)

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung von Zellen in der Lunge, die über eine NO-Synthase verfügen. Die mit \* markierten Zellen sind zur NO-Produktion fähig (Gaston et al.). Die in der Skizze verwendeten Größenverhältnisse sind nicht originalgetreu. Modifiziert nach Gaston et al..... 5
- Abbildung 2: Vom CLD88sp Analysator ermittelte Werte im Singlebreath vor Auswertung durch die Spiroware-Software. Die gelbe Kurve spiegelt die molare Masse wieder, das endexpiratorische Plateau ist deutlich zu erkennen. NO ist in rot dargestellt. Der Spitzenwert zu Beginn der Expiration ist durch die höhere NO-Konzentration im Nasenrachenraum bedingt. (Time: Zeit, Flow: Flussrate, Vol: Volumen (orange), NOR: NO-Range (grau)) ..... 18
- Abbildung 3: Vom CLD88sp Analysator ermittelte Werte im Multibreath vor Auswertung durch die Spiroware-Software. (Time: Zeit, Flow: Flussrate, Vol: Volumen, MM: molare Masse, NO: Stickstoffmonoxid, NOR: NO-Range) ..... 19
- Abbildung 4: Graphische und tabellarische Darstellung der Messergebnisse der FENO-Messung durch die Spiroware-Software (oben im Singlebreath, unten im Multibreath). Die Graphen zeigen die NO-Konzentration im Exhalat (ppb) über dem Ausatemvolumen (L). Der durch die beiden parallel zur Y-Achse verlaufenden Linien markierte Bereich, stellt den Messbereich dar, in dem FENO gemessen wird. Tabellarisch sind die Werte der einzelnen Messungen sowie die Durchschnittswerte aus den drei Messungen dargestellt. (V'NO: NO Output, FINO: fraktioniertes inspiratorisches NO, ppb: pars per billion, SA200: Singlebreath, mb: Multibreath, Mean values: Durchschnittswerte, CV%: Standardabweichung) ..... 20
- Abbildung 5: Durchflusszytometrische Darstellung der Sputumzellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht..... 26
- Abbildung 6: Durchflusszytometrische Darstellung der Sputumzellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die mit R1 umrahmte Punktwolke markiert die Granulozytenwolke..... 27
- Abbildung 7: Durchflusszytometrische Darstellung der CD66b Expression der Sputumluekozyten im Histogramm. Die mit R2 markierten Zellen definieren die Granulozyten..... 28
- Abbildung 8: Korrelation zwischen der Expression der Oberflächenmoleküle TLR2 und TREM-1 auf Neutrophilen und der Neutrophilenkonzentration im Sputum..... 29

Abbildung 9:	Korrelation zwischen CD11b und CD66b sowie zwischen CD11b und CXCR1	30
Abbildung 10:	Vergleich der FENO-Konzentration zwischen dem gesundem Probandenkollektiv (N=7) und Pneumoniepatienten zum Aufnahmezeitpunkt t0 gemessen im Singlebreath- (N=17) und Multibreathverfahren (N=20) (SA 200: p=0,046; MB: p=0,054)	36
Abbildung 11:	Korrelation zwischen FENO-Konzentrationen gemessen im Single- und Multibreathverfahren (N = 32, p< 0,001)	36
Abbildung 12:	CD11b in Korrelation mit der FENO-Konzentration gemessen im Singlebreath (p= 0,03; N = 27) und Multibreath (p = 0,01; N = 32)	38
Abbildung 13:	CD66b in Korrelation mit FENO im Multibreath (p=0,01; N=37)	38
Abbildung 14:	Zusammenhang zwischen der Neutrophilenkonzentration im Sputum (angegeben in Zellen pro Gramm) und FENO gemessen im Multibreathmodus (p=0,98; n=28) Abbildung nicht zeigen	39
Abbildung 15:	Darstellung des signifikanten Abfalls der FENO-Konzentration bei Pneumoniepatienten am Aufnahmetag (t0) im Vergleich zur Kontrolluntersuchung zum Zeitpunkt t1. Die FENO-Messung wurde im Singlebreath- und Multibreathverfahren durchgeführt	39
Abbildung 16:	FENO-Werte im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von einer begleitenden Glucocorticoidtherapie zu den Zeitpunkten t0 –t2 gemessen im Singlebreath (SA 200) und Multibreath (MB). (Nicht-Glucocorticoidgruppe: N=11; Glucocorticoidgruppe: SA 200: N=7, MB: N=9)	41
Abbildung 17:	FENO-Konzentration gemessen im Multibreath im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von der antibiotischen Therapie (Clarithromycin: N=12, Kein Clarithromycin: N=8)	42
Abbildung 18:	Darstellung der FENO-Konzentration gemessen im Single- und Multibreath zu den Zeitpunkten t0 und t1 nach Unterteilung des Patientenkollektivs in Abhängigkeit von der Verweildauer im Krankenhaus. (Verweildauer ≤ 7 Tage: N=11, Verweildauer > 7 Tage: N=9)	43

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erkrankungen, die mit veränderten NO-Konzentrationen einhergehen. Adaptiert nach Kharitonov, Barnes und Ortega.....	4
Tabelle 2:	Pulmonale und extrapulmonale Erkrankungen sowie Immundefizienz als Risikofaktoren für Pneumonien. ....	7
Tabelle 3:	Mögliche Infektionswege einer Pneumonie .....	9
Tabelle 4:	Mediatoren der vaskulären Entzündungsreaktion .....	9
Tabelle 5:	CXCL-Chemonkine, die chemotaktisch auf Neutrophile wirken .....	10
Tabelle 6:	Auswahl von Neutrophilengranula und ihrer Inhaltsstoffe .....	11
Tabelle 7:	In der Durchflusszytometrie untersuchte Parameter und ihre Bedeutung...	24
Tabelle 8:	Korrelation zwischen der Expression von Oberflächenmolekülen auf Neutrophilen und der Neutrophilenzahl und –konzentration im Sputum.....	28
Tabelle 9:	Zusammenhang zwischen CD11b und weiteren Oberflächenmolekülen auf Neutrophilen .....	30
Tabelle 10:	Übersicht über das Patientenkollektiv .....	34
Tabelle 11:	Erregerspektrum, Therapie und Verlauf der Pneumonien (CRP: C- reaktives Protein) .....	35
Tabelle 12:	Korrelation zwischen der FENO-Konzentration gemessen im Single- und Multibreathverfahren und systemischen Entzündungsparametern .....	37
Tabelle 13:	Übersicht über die FENO-Konzentration gemessen im Singlebreath- und Multibreathverfahren bei Pneumoniepatienten zu den Zeitpunkten t0 – t2 angegeben in mean ± SEM .....	40
Tabelle 14:	FENO-Werte im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit von einer begleitenden Glucocorticoidtherapie im Single- und Multibreath zu den Zeitpunkten t0 – t2 angegeben in mean ± SEM .....	41

### **8.3 Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei dem Erstellen, dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. K. Dalhoff für die kontinuierliche und intensive Betreuung, das Bereitstellen des Arbeitsplatzes und Materials sowie die Unterstützung bei der Veröffentlichung der Ergebnisse.

Dr. D. Drömann für die Anregung zu dieser Arbeit, die Einarbeitung in die FENO-Messung, engagierte und hervorragende Betreuung, die Unterstützung beim statistischen Auswerten der Daten sowie bei der Veröffentlichung der Ergebnisse.

Frau Katja Frank und dem gesamten Team der Lungenfunktion, die mich bei den FENO-Messungen unterstützen.

Frau B. Gogoll und Frau H. Richardz für die Unterstützung im Labor sowie die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie.

Frau U. Knuppertz ebenfalls für die Unterstützung im Labor, insbesondere beim Erlernen und Durchführen des ELISAs.

## 8.4 Lebenslauf



### Persönliche Informationen

---

Geburtstag: 30. Juli 1982

Geburtsort: Herdecke

Nationalität: deutsch

### Schulische Ausbildung

---

08/1988 – 07/1992 Aloysius-Grundschule Holzwickede

08/1992 – 06/2001 Pestalozzi Gymnasium Unna

18. 06. 2001 Abitur

### Medizinstudium, Promotion und Berufsleben

---

10/2001 – 09/2003 Ruhr-Universität Bochum

10. 09. 2003 Physikum

10/2003 – 11/2007 Medizinische Universität Schleswig Holstein, Campus zu Lübeck

05/2004 Auswahl des Themas der Dissertation, Vorversuche am CLD88sp

10/2005 Beginn des experimentellen Teils der Dissertation

15. 11. 2007 Ärztliche Prüfung

12/ 2007 - 03/2008 Ausarbeitung des theoretischen Teils der Dissertation

seit 04/2008 Assistenzärztin für Neurologie und Geriatrie, Elisabeth Krankenhause, Recklinghausen-Süd

### Praktisches Jahr

---

08/2006 – 12/ 2006 Klinik für Neurologie, Klinikum Itzehoe

12/ 2006 – 03/2007 Abteilungen für Chirurgie, Sana Klinik Ostholstein, Eutin

04/2007 – 07/2007 Department of internal medicine, Landspítali, University Hospital, Reykjavík, Island

## **8.5 Veröffentlichung**

Posterpräsentation “Exhaled nitric oxide (NO) detection for monitoring airway inflammation in non-severe CAP” auf dem 18. Jahreskongress der European Respiratory Society (ERS) vom 3.-7.10.2008 in Berlin

