

Aus der Medizinischen Klinik der  
Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

# **Exhalatkondensat bei Gesunden und thorakal bestrahlten Patienten**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Markus Schneider  
aus Vellberg

Würzburg, Juni 2004

Referent: Professor Dr. med. Michael Schmidt

Korreferent: Professor Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2004

Der Promovend ist Arzt.

*Meinen lieben Eltern.*

# Inhaltsverzeichnis

<i>Kapitel</i>		<i>Seite</i>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Probanden, Patienten und Methoden</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Probanden- und Patientenkollektive</b>	<b>10</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Probanden</b>	<b>10</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Patienten, Diagnosen und Follow-Up</b>	<b>10</b>
3.1.2.1	Patienten	10
3.1.2.2	Diagnosen	11
3.1.2.3	Follow-Up	11
<b>3.2</b>	<b>Materialgewinnung und –verarbeitung</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Sammeln des Exhalat-Kondensats, Messung des geatmeten Volumens</b>	<b>13</b>
3.2.1.1	Aufbau der Messanordnung, Prinzip der Exhalat-Kondensat-Gewinnung	13
3.2.1.2	Bestimmung des während des Messzeitraums geatmeten Volumens	15
3.2.1.3	Verhinderung von Verunreinigungen der Proben, Hygienevorschriften	15
3.2.1.4	Durchführung der Messungen	16
3.2.1.5	Weiterverarbeitung des Untersuchungsmaterials	16
<b>3.2.2</b>	<b>Gewinnung und Verarbeitung des Cubitalvenenblutes</b>	<b>17</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Biochemische Tests</b>	<b>17</b>
3.2.3.1	TGF- $\beta$ im Exhalat-Kondensat und im Serum	17
3.2.3.2	Gesamtprotein im Exhalat	19
3.2.3.3	Gesamtprotein im Serum	21
<b>3.3</b>	<b>Statistische Methoden</b>	<b>21</b>

<i>Kapitel</i>		<i>Seite</i>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchte Kollektive und demographische Daten</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Untersuchte Kollektive</b>	<b>23</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Demographische Daten</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Exhalatparameter der Probanden über die drei Messtage</b>	<b>25</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung</b>	<b>25</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Exhalatparameter und demographische Daten</b>	<b>25</b>
4.2.2.1	Exhalatparameter und Geschlecht	26
4.2.2.2	Exhalatparameter und Körpermaße	27
<b>4.2.3</b>	<b>Exhalatparameter und ihre Abhängigkeit voneinander</b>	<b>27</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Exhalatparameter und Tag-zu-Tag-Variabilität</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Exhalatparameter von Probanden und Patienten</b>	<b>31</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung</b>	<b>31</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Exhalat und demographische Daten</b>	<b>31</b>
4.3.2.1	Exhalat und Geschlecht	32
4.3.2.2	Exhalat, Alter und Körpermaße	35
<b>4.3.3</b>	<b>Änderung der Exhalatparameter vom ersten zum zweiten Messtermin, erster Vergleich zwischen Probanden und Patienten</b>	<b>39</b>
4.3.3.1	Vergleich der beiden Kollektive	41
4.3.3.1.1	Änderungen der Exhalatparameter der Probanden	43
4.3.3.1.2	Änderungen der Exhalatparameter der Patienten	45
4.3.3.2	Exhalatparameter am jeweils ersten und zweiten Messtermin, sowie Änderungen der Parameter, im Vergleich der beiden Kollektive	47
4.3.3.3	Änderungen der Exhalatparameter von Probanden und Patienten vom ersten zum zweiten Messtermin im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten	48
<b>4.3.4</b>	<b>Exhalatparameter von Patienten und Probanden</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Serumparameter von Probanden und Patienten</b>	<b>50</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung</b>	<b>50</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Serumwerte und demographische Daten</b>	<b>50</b>
4.4.2.1	Serumwerte und Geschlecht	51
4.4.2.2	Serumwerte, Alter und Körpermaße	52

<i>Kapitel</i>		<i>Seite</i>
<b>4.4.3</b>	<b>Serumwerte: Interaktionen, Unterschiede zwischen beiden Kollektiven und Änderungen während der Strahlentherapie</b>	<b>53</b>
4.4.3.1	Hängen Protein- und TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Serum voneinander ab?	53
4.4.3.2	Unterschiede der Serumwerte zwischen Probanden und Patienten	54
4.4.3.3	Änderung der Serumparameter während der Strahlentherapie	54
<b>4.5</b>	<b>Exhalat- und Serumwerte der beiden Kollektive</b>	<b>55</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Serum- und Exhalatwerte an den beiden Messterminen</b>	<b>55</b>
4.5.1.1	Serum- und Exhalatwerte am ersten Messtermin	55
4.5.1.2	Serum- und Exhalatwerte am zweiten Messtermin	57
<b>4.5.2</b>	<b>Änderung der Serum- und Exhalatparameter und eventuelle Abhängigkeiten</b>	<b>57</b>
4.5.2.1	Änderung der Serum- und Änderung der Exhalatparameter der Patienten während der Strahlentherapie	57
4.5.2.2	Quotienten der (Total-) Proteinkonzentrationen in Exhalat und Serum im Vergleich von Probanden und Patienten	59
4.5.2.3	Ausgangswerte von Protein und TGF- $\beta$ im Serum und Änderung der Proteinkonzentration im Exhalat in beiden Kollektiven	61
4.5.2.4	Änderungen der Serumwerte der Patienten im Vergleich zu den Exhalatparametern vor Beginn der Strahlentherapie	62
<b>4.5.3</b>	<b>Serumwerte und Durchschnittswerte des Exhalats</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodik, Messung von Total-Protein und TGF-<math>\beta</math></b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Exhalatparameter bei gesunden Probanden</b>	<b>66</b>
<b>5.3</b>	<b>Unterschiede und / oder Parallelen von Probanden und Patienten</b>	<b>68</b>
<b>5.4</b>	<b>Serumwerte von Protein und TGF-<math>\beta</math></b>	<b>72</b>
<b>5.5</b>	<b>Serumwerte und Exhalatparameter</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenanhang</b>	<b>84</b>

# 1 Einleitung

Die Diagnostik von Lungenkrankheiten stützt sich heute neben Anamnese, körperlicher Untersuchung, den üblichen Labortests und bildgebenden Verfahren (wie etwa dem konventionellen Röntgen, der Computertomographie und der Bronchoskopie) vor allem auf Funktionsuntersuchungen, zum Beispiel die Bodyplethysmographie, die Ergospirometrie und die Bestimmung der Diffusionskapazität der Lunge (z. B. durch Helium-Einwaschung). Zur direkten Untersuchung der alveolären Oberfläche und des Lungengewebes ist man auf relativ invasive Verfahren, wie die bronchoalveoläre Lavage (BAL), die bronchoskopische Biopsie und teilweise auch das induzierte Sputum, angewiesen. Diese Verfahren haben allerdings den Nachteil, dass schon durch die Untersuchung per se eine Veränderung des untersuchten Materials stattfindet und die Probengewinnung für den Patienten anstrengend und unangenehm, in manchen Fällen auch infolge von Morbidität unmöglich, ist. Außerdem können die Untersuchungen nicht beliebig oft wiederholt werden und Verlaufskontrollen sind damit methodisch limitiert.

Schon lange sucht man deshalb nach Möglichkeiten, die Lungenoberfläche und den Bereich der alveolären „Blut-Luft-Schranke“, in welchem viele krankhafte Prozesse ablaufen können, möglichst wenig invasiv und aufwendig untersuchen zu können.

Eine vielversprechende diagnostische Möglichkeit hat sich hierbei in den letzten Jahren mit der Möglichkeit der Gewinnung von Exhalat-Kondensat ergeben. Das Prinzip besteht darin, dass nicht nur in Wasser lösliche Stoffe, welche die Lunge beim Ausatmen zwangsläufig verlassen, sondern auch wasserunlösliche Stoffe, die durch große Wassertröpfchen „mitgerissen“ werden können, in der ausgeatmeten Luft enthalten sind und so im Kondensat dieser Luft – entstanden etwa an einem Kühlkörper – einem Nachweis zugänglich werden [9]. Die Exhalat-Kondensat-Gewinnung ist eine einfache, auch gut bei Patienten mit schlechter Lungenfunktion und bei Kindern durchführbare Methode, die prinzipiell bei zahlreichen Erkrankungen der Lunge zur Anwendung kommen kann; zahlreiche Stoffe wurden bisher sowohl im Exhalat selbst als auch in dessen Kondensat nachgewiesen [18, 19]. Dabei sind Kondensat-Volumen und Atemvolumen ( $V'E$ ) intraindividuell relativ stabil [13]. Im Tierversuch ließ sich bei Kälbern sogar eine noch geringere intraindividuelle Varianz der Exhalatmenge nachweisen als bei menschlichen Kollektiven [27]. Eine eingeschränkte Lungenfunktion ist kein Hinderungsgrund für die Gewinnung von Exhalat-Kondensat und individuelle Verlaufskontrollen sind methodisch leicht durchführbar [6].

In den meisten Studien wurde Exhalat-Kondensat auf niedermolekulare Moleküle hin untersucht, vor allem auf Wasserstoffperoxid [8, 10, 12, 26, 29] und Thiobarbitursäure-Derivate (TBAR, [20, 26]), die als Marker für Entzündungen der tiefen Lungenabschnitte angesehen werden. Die Konzentration von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches in den tiefen Lungenabschnitten im Rahmen oxidativer Prozesse gebildet wird, im Exhalat-Kondensat hängt dabei unter anderem von der expiratorischen Flussrate ab und variiert intraindividuell [29]. Raucher haben höhere  $H_2O_2$ - und TBAR-Konzentrationen im Exhalat, wobei  $H_2O_2$  circadianen Schwankungen unterworfen ist; es sind „Trainingseffekte“ durch Mehrfachmessungen zu erkennen, außerdem sind möglichst vergleichbare Kontrollkollektive für eine Standardisierung nötig [26].

Bei Asthmatikern ist  $H_2O_2$  im Exhalat-Kondensat oft erhöht, eventuell ergibt sich hier sogar in Zukunft eine Möglichkeit, die Schwere der Erkrankung zu erfassen [10]. Bei chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) ist  $H_2O_2$  im Exhalat ebenfalls erhöht, bei Exazerbation der Erkrankung steigt es deutlich an; insgesamt korrelieren hier die Messwerte sehr gut mit dem klinischen Verlauf [8].

Stickstoffmonoxid (NO) und Nitrotyrosine im Exhalat-Kondensat sind v. a. bei Entzündungen der tiefen Atemwege erhöht; der Nitrotyrosin-Konzentrations-Verlauf korreliert gut mit einer antiasthmatischen Steroidtherapie [15]. Rauchen erhöht zwar kurzfristig NO und seine Metabolite im Exhalat, längerfristig findet sich allerdings keine dauerhafte Erhöhung; dies ist im Exhalat-Kondensat gut nachvollziehbar [5]. In einer Studie war die Messung von NO und  $H_2O_2$  im Exhalat-Kondensat für das Monitoring von Asthma bei Kindern zur Verlaufskontrolle genauso gut geeignet wie induziertes Sputum [14]. Inhaliertere Corticosteroide (hier Beclomethason) reduzieren die NO-Konzentrationen im Exhalat-Kondensat von Nichtrauchern mit COPD, es ist hierbei ein guter Parameter zur Erfassung der Schwere der Entzündung [12].

Es konnten auch Elektrolyte und Laktat im Exhalat-Kondensat nachgewiesen werden, wobei auch ein Hauptproblem der Methode – der unsichere Verdünnungsfaktor in Abhängigkeit von Luftfeuchtigkeit, individueller Atemtechnik und unterschiedlichen alveolären Dampfdrücken – klar wurde [9]; allerdings hat man auch bei bisher etablierten Methoden einen nicht exakt zu bestimmenden Verdünnungseffekt – bei der BAL ist dieser wahrscheinlich sogar deutlich höher als bei der Exhalat-Methode.

Das Alveolarepithel neutralisiert Säuren in ähnlicher Weise wie die renalen Tubuli, eine Glutaminase-Inhibition verursacht wahrscheinlich den in einer Studie gefundenen niedrigen pH im Exhalat-Kondensat von Asthmatikern [17].



Auch höhermolekulare Stoffe, z. B. Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels – Leukotriene [6, 15, 27] und Prostaglandine [7] – konnten im Exhalat-Kondensat gefunden werden. Die hierbei nachgewiesenen Leukotriene im Exhalat-Kondensat stammen tatsächlich aus den tiefen Atemwegen, was sowohl im Tierversuch [27], als auch in klinischen Studien [6, 15] gezeigt werden konnte. Eine vorhergegangene BAL verändert die Konzentration von Leukotrien-B<sub>4</sub> im Exhalat von Kälbern, es sollte deshalb stets eine ausreichende Pause zwischen invasiven Manipulationen an der Lunge und der Gewinnung von Exhalat-Kondensat eingehalten werden [27].

Bei Patienten mit Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) korreliert 8-iso-Prostaglandin-F<sub>2α</sub> im Exhalat gut mit der Konzentration im Urin; damit stellt die Exhalat-Methode auch eine gute Möglichkeit dar, um oxidativen Stress der Lunge – auch unabhängig von der Ventilationsleistung – erfassen zu können [7].

Es konnten schon zahlreiche Proteine [9, 13] nachgewiesen werden, wobei einige Autoren vermuten, dass deren Messung als Total- / Gesamt-Protein in Zukunft vor allem Bedeutung in der Diagnostik einer entzündlichen Schrankenstörung im alveolären Bereich erlangen könnte [13]. Die Menge an Total-Protein ist dem Kondensatvolumen proportional und es finden sich keine Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten mit COPD [13].

Die Vorteile der Exhalat-Kondensat-Methode sind also zum gegenwärtigen Zeitpunkt vor allem darin zu sehen, dass sie einfach und schnell durchführbar, beliebig oft wiederholbar und nicht invasiv ist [18]. Es gibt aber auch deutliche Nachteile: So stellen die bisher oft mangelnde Standardisierung und Vergleichbarkeit von Messanordnungen und Labormethoden und die nicht anatomisch-spezifische Aussagekraft – wie etwa bei der BAL, bei der der Ort der Probeentnahme ja klar nachvollziehbar ist – ein noch ungelöstes Problem dar. Bislang gibt es außerdem nur wenig Klarheit über die Bedeutung von vielen nachgewiesenen Substanzen, insbesondere bei diversen interstitiellen Lungenerkrankungen [24]. Einige Stoffe – etwa die TBAR – sind darüber hinaus nur begrenzt stabil und nicht sehr lange haltbar [20].

Die therapeutische Bestrahlung der Lunge und anderer Thoraxorgane ist mittlerweile ein unverzichtbares Instrument moderner Tumortherapie geworden. Dabei ist es trotz Einsatz moderner Bestrahlungstechniken oft nicht zu vermeiden, dass neben dem Tumor auch gesundes Lungengewebe mitbestrahlt wird. Die Lunge reagiert auf Strahlenbelastung zunächst mit einer interstitiellen Entzündung, welche als Strahlenpneumonitis bezeichnet wird, und die nach klinischer Symptomatik und apparativen Befunden in verschiedene Stadien eingeteilt wird, z. B. anhand der „Common Toxicity Criteria“ (CTC, [25]). In der

Regel bleibt diese interstitielle Entzündung folgenlos und klinisch inapparent, im Extremfall kann sie aber auch zum Tode des Patienten führen, weshalb ein möglichst frühes Erkennen von gefährlichen Verläufen unabdingbar ist für eine effiziente Corticosteroid-Therapie. Klinisch verläuft die manifeste Pneumonitis (ab Grad 2 der CTC) in drei Stadien: Etwa einen Monat nach Bestrahlung kommt es zu einer asymptomatischen, nur histologisch nachweisbaren, Schrankenstörung mit Verringerung der Surfactantproduktion des Alveolarepithels, Zerstörung von „Alveolar lining cells“ und einer Transsudation von Protein in den Alveolarraum; es folgt eine zwei bis vier Monate dauernde Intermediärphase (sogenannte „akute Pneumonitis“ mit typischer Klinik wie Dyspnoe, Husten, selten auch Fieber) und schließlich beginnt ein über Monate fortschreitender Fibrosierungsprozess mit Verdickung der Alveolarsepten, alveolärer Obliteration und progredienter Verschlechterung der Lungenfunktion; Endzustand ist eine Lungenfibrose [1, 22, 23]. Je nach Studie sind von dieser Komplikation der Strahlentherapie zwischen 1% und 34% (im Durchschnitt 7-8%) der Patienten betroffen; radiologische Veränderungen sind bei 13-100% (im Schnitt 43%) zu finden [23]. Dabei scheinen Einzeldosen von mehr als 2,67Gy das Risiko deutlich zu erhöhen [1, 23]; ab einer Gesamt-Energiedosis von 25Gy können Dauerschäden der Lunge auftreten und ab 40Gy ist sicher mit bleibenden Veränderungen des Lungenparenchyms zu rechnen, welche allerdings für die meisten Patienten (klinisch) folgenlos bleiben [23]. Hohe Dosen auf kleinen Bestrahlungsfeldern und bereits vorhergegangene Strahlentherapien oder bestehende Lungenerkrankungen erhöhen das Risiko, an einer klinisch relevanten Strahlenpneumonitis zu erkranken [23], ebenso eine gleichzeitig durchgeführte Chemotherapie [22, 23].

Anhand von 201 Patienten mit Bronchial-Carcinom, die sich einer Strahlentherapie unterziehen mussten, wurde festgestellt, dass allein anhand dosimetrischer Faktoren das individuelle Pneumonitis-Risiko grob abgeschätzt werden kann, die Tumorlokalisation hatte dabei keinerlei Einfluss auf das Pneumonitis-Risiko; allerdings werden für eine zuverlässige Risiko-Stratifizierung multivariate Modelle nötig sein, über deren Aufbau momentan ziemliche Unklarheit herrscht [16].

In Tierversuchen (Bestrahlung von Mäusen mit verschiedenen Einzel- und Gesamtdosen) konnte gezeigt werden, dass die DNA-Expression für diverse Kollagene in Fibroblasten schon deutlich vor der Fibrose (ca. ab der zweiten bis achten Woche nach Bestrahlung) ansteigt, eine Fibroblastenaktivierung erfolgt hierbei vor allem im Zusammenspiel von Typ-II-Pneumozyten und Makrophagen [28]. Auf molekularer Ebene spielen hierbei vor allem Zytokinkaskaden eine Rolle [1], wobei sich zunehmend die Überzeugung durchsetzt, dass es sich insgesamt nicht um phasenhafte, sondern um kontinuierlich ablaufende Vorgänge handelt

[4, 22, 28]. Diese Zytokinkaskaden sind der Schlüssel zum Verständnis der Pneumonitis und Lungenfibrose, beteiligt sind unter anderem Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Fibronectin, sowie verschiedene Interleukine und Interferone [23]. Eine zentrale Rolle scheint ein in erster Linie von Makrophagen freigesetztes Zytokin, der Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) zu spielen [1, 28]. Eine seiner drei bekannten Isoformen, TGF- $\beta$ 1 (ein 25-kDa-Protein, welches in einem Proteinkomplex eingebunden sezerniert wird und für welches bisher zwei Rezeptortypen auf einigen Zelltypen der Lunge bekannt sind), dient in erster Linie der Regulation und Inhibition von Zellwachstum, der Immunsuppression und der Aktivierung von Fibroblasten, die dann vermehrt zelluläre Matrix im Gewebe ablagern; im Tierversuch konnten Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1 bereits künstlich ausgelöste Fibroseprozesse aufhalten [21].

In einer Reihe von Studien wurden Verläufe der Konzentration von TGF- $\beta$  im Blutserum von Patienten, die sich einer Strahlentherapie unterziehen mussten, untersucht [2, 3, 4]. Dabei konnte in einer prospektiven Studie an Patienten mit Bronchial-Carcinom gezeigt werden, dass über Wochen anhaltende hohe Serumkonzentrationen von TGF- $\beta$  nach Ende der Strahlentherapie Zeichen von Gewebsschädigungen sind; herkömmliche Tests wie die Bodyplethysmographie oder die Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) sind nicht prädiktiv für das Pneumonitis-Risiko, wohingegen Anstiege der Serumkonzentrationen von TGF- $\beta$  Hinweise für eine zu erwartende Strahlenpneumonitis waren [2, 3, 4]. Zum Teil waren die TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Vergleich zu Gesunden schon vor Beginn der Strahlentherapie deutlich erhöht, weshalb manche Autoren vermuten, dass einige Tumoren eventuell selbst TGF- $\beta$  produzieren können [4]. Patienten mit Strahlentherapie bei Bronchial-Carcinom, Morbus Hodgkin und Thymom entwickelten in einer Studie zu 36% eine Pneumonitis infolge der Strahlenbehandlung [3]; war dabei ihre „TGF-Ratio“ ( $= \frac{\text{TGF-Konzentration (nach Ende der Strahlentherapie)}}{\text{TGF-Konzentration (vor Beginn der Strahlentherapie)}}$ ) größer als 1, dann bestand ein deutlich erhöhtes Pneumonitis-Risiko [2, 3]. In diesem Zusammenhang sind Trends und Verläufe der Serum-TGF-Konzentrationen entscheidend, keine Absolutwerte; eine individuelle Risikoabschätzung – unter Einbeziehung der Serumkonzentrationen von TGF – könnte so in Zukunft eine individuelle Dosisanpassung ermöglichen [3]. Bei 73 Bronchial-Carcinom-Patienten entwickelten in einer Studie 21% eine Pneumonitis, falls jedoch die Konzentration von TGF- $\beta$  in Serum nach Ende der Strahlentherapie wieder auf das Ausgangsniveau absank, entwickelten die Patienten zu 90% keine Pneumonitis; eine Identifikation von Risikopatienten und solchen, die für eine Eskalationstherapie, also einer

Bestrahlung mit hohen Abschlussdosen, geeignet sind, wird so in Zukunft eventuell möglich sein [2].

Die einzige etablierte Therapie der Pneumonitis besteht bisher neben allgemeinen Maßnahmen (wie etwa der Sauerstoffgabe, gegebenenfalls auch der maschinellen Beatmung, der Kreislaufstabilisation, etc.) in der Gabe von Corticosteroiden [23]. Neue, bisher nur experimentelle, Therapieansätze sind die Verabreichung von liposomaler Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase zur Downregulation der TGF- $\beta$ 1-Sekretion, der Gabe von  $\alpha$ -Tocopherol (= Vitamin E) in Kombination mit Pentoxifyllin (Xanthinderivat mit vasodilatierender und fluiditätsverbessernder Wirkung) oder der Einnahme von Interferon- $\alpha_{2b}$  (zur Modulation autokriner Wachstumsfaktoren). In Zukunft könnte die Anwendung von TGF- $\beta$ 1-Antikörpern hinzukommen [21].

Um so wichtiger wäre eine schnelle, einfach zu handhabende Diagnostik der Pneumonitis zu einem möglichst frühen Zeitpunkt; bisher sind jedoch zur Früherkennung nur schlecht standardisierte, noch nicht für die Routine geeignete Labortests verfügbar, unter anderem zur Messung von TGF- $\beta$ , Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), Prokollagen-3 und Prostazyklinen im Blutserum [22].

## 2 Fragestellung

Anhand dieser Arbeit sollen sowohl allgemeine Fragen zur Methodik, Handhabung und möglichen intra- und interindividuellen Variabilität der Exhalatparameter (geatmetes Volumen, Exhalatmenge und Konzentration von Total-Protein und von TGF- $\beta$ ) bei lungengesunden Probanden, als auch zu möglichen Unterschieden im Vergleich dieser Probanden zu Patienten vor einer Strahlentherapie und nach Erhalt einer definierten Gesamt-Energiedosis, beantwortet werden. Auch die Blutserum-Konzentrationen von Total-Protein und TGF- $\beta$  sollen untersucht werden und ihr Verhältnis zu den Exhalatparametern soll geklärt werden.

Es soll so insgesamt zu einer besseren Standardisierung der Exhalat-Methode beigetragen und eine eventuelle Möglichkeit zum Einsatz der Methode in der Früherkennung der Strahlenpneumonitis geprüft werden; im Einzelnen müssen unter Anderem folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist die Methode technisch geeignet? Wie sind die Messungen am besten durchzuführen?  
Kann man Gesamtprotein und TGF- $\beta$  in Exhalat-Kondensat und Serum messen?
2. Gibt es auffällige Veränderungen der Exhalatparameter (Exhalatmenge, geatmetes Volumen während der Sammelzeit ( $V^E$ ), Protein- und TGF- $\beta$ -Konzentrationen) bei gesunden Probanden?
  - a. Haben demographische Parameter im untersuchten Probandenkollektiv Einfluss auf die Exhalatparameter während des gesamten Messzeitraums?
  - b. Gibt es bei den Probanden irgendwelche Abhängigkeiten der einzelnen Exhalatparameter voneinander?
  - c. Wie stark variieren die drei Exhalatparameter der Probanden von Tag zu Tag?
3. Gibt es Unterschiede und / oder Gemeinsamkeiten zwischen den Exhalatparametern der Probanden und denjenigen von Patienten, welche sich einer therapeutischen Bestrahlung im Thoraxbereich unterziehen mussten, bei der auch wesentliche Teile der Lunge mitbestrahlt werden müssen?
  - a. Exhalatparameter und demographische Daten: Wie verhalten sich die Messwerte im gesamten untersuchten Kollektiv und getrennt nach den jeweiligen Gruppen

(Probanden und Patienten) in bezug auf Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und Body-Mass-Index der Untersuchten? Gibt es auffällige Tendenzen, gleich- oder gegensinnige Entwicklungen bei Probanden und / oder Patienten?

- b. Wie ändern sich die einzelnen Exhalatparameter vom ersten zum zweiten Messtermin
  - der Probanden, bzw.
  - von 0 zu 50Gy bei den Patienten?
  - Wie sehen diese Veränderungen im Vergleich der beiden Kollektive aus (gibt es Unterschiede / Parallelen)?
  - Hängen die Veränderungen der Exhalatparameter von den jeweiligen Ausgangswerten ab?
- c. Wie verhalten sich die aus den drei Einzelmessungen der Probanden ermittelten Durchschnittswerte zu den Messergebnissen bei den Patienten? Gibt es Unterschiede vor Beginn der Strahlentherapie und nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy?

#### 4. Serumwerte von Protein und TGF- $\beta$ :

- a. Gibt es Zusammenhänge zwischen den Serumwerten und demographischen Daten im Gesamt- und / oder den beiden Teilkollektiven?
- b. Interaktionen der Serumwerte, Unterschiede / Gemeinsamkeiten beider Kollektive und Änderung der Serumwerte während der Strahlentherapie der Patienten:
  - Hängen bei den Probanden und / oder den Patienten die Serumkonzentrationen von Protein und TGF- $\beta$  voneinander ab?
  - Unterscheiden sich die Werte der Probanden von denjenigen der Patienten vor Beginn der Strahlentherapie?
  - Wie ändern sich die Serumkonzentrationen im Laufe der Strahlentherapie bei den Patienten?

#### 5. Serumwerte und Exhalatparameter:

- a. Wie verhalten sich Serum- und Exhalatparameter an den beiden ersten Messterminen (Probanden) bzw. bei 0 und bei 50Gy (Patienten)?
- b. Wie ändern sich die Konzentrationen von Protein und TGF- $\beta$  im Serum der Patienten im Laufe der Strahlentherapie? Gibt es Zusammenhänge mit eventuellen Änderungen der Exhalatparameter? Hängen Änderungen der Exhalatparameter mit

den Ausgangswerten für Protein und / oder TGF- $\beta$  im Serum zusammen? Gibt es im Patientenkollektiv Zusammenhänge zwischen möglichen Änderungen der Serumwerte im Laufe der Bestrahlung und den Ausgangswerten der Exhalatparameter vor Beginn der Strahlentherapie?

- c. Hängen Serumwerte und die aus den drei Messterminen der Probanden ermittelten Durchschnittswerte der Exhalatparameter in irgendeiner Form voneinander ab?

## **3 Probanden, Patienten und Methoden**

### **3.1 Probanden- und Patientenkollektive**

#### **3.1.1 Probanden**

Es wurden insgesamt 14 Probanden in die Studie aufgenommen, welche alle lungengesund und Nichtraucher waren. Keiner von ihnen litt während des Untersuchungszeitraums an Erkrankungen, insbesondere nicht an solchen, welche bekanntermaßen mit einer Einschränkung der Lungenfunktion einhergehen.

Die Gewinnung des Exhalat-Kondensats erfolgte bei jedem Probanden an drei aufeinander folgenden Tagen, insgesamt wurden alle Probanden in einem Zeitraum von ca. einem Monat untersucht. Die Probanden (6 Frauen, 8 Männer) waren durchschnittlich  $23,7 \pm 1,7$  Jahre alt mit einer Spannweite von 22 bis 29 Jahren. Genaue demographische Daten sind Kapitel 4 zu entnehmen.

Am jeweiligen Untersuchungstermin wurde von jedem Probanden über einen Zeitraum von insgesamt 15 Minuten Exhalat-Kondensat gewonnen. Pausen wurden nicht zum Untersuchungszeitraum gerechnet; jeder Proband atmete also exakt 15 Minuten in das Gerät. Zusätzlich erfolgte am ersten Messtag die Abnahme von einem Serum-Röhrchen Blut aus einer Cubitalvene.

#### **3.1.2 Patienten, Diagnosen und Follow-Up**

##### **3.1.2.1 Patienten**

Über einen Zeitraum von etwa zehn Monaten (Anfang November 2000 bis Ende August 2001) konnten für die Studie 16 Patienten aus den Kliniken für Strahlentherapie und Pneumologie der Universität Würzburg für eine Teilnahme an der Studie gewonnen werden, wobei zwei davon ihre Strahlentherapie abbrachen beziehungsweise nicht mehr zu ihrem zweiten Untersuchungstermin erschienen; somit wurden letztendlich 14 Patienten (3 Frauen, 11 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von  $61,9 \pm 11,0$  Jahren (Spannweite 44 bis 81 Jahre) in die Studie aufgenommen. Auch für die Patienten sind die genauen demographischen Daten aus Kapitel 4 ersichtlich.

Die Bestrahlungsbehandlung erstreckte sich über ca. fünf Wochen, während der die Patienten üblicherweise an fünf Wochentagen eine Einzeldosis von jeweils 2,0Gy und eine durchschnittliche Gesamt-Energiedosis von  $60,0 \pm 8,0$ Gy erhielten.



Die Gewinnung von Exhalat-Kondensat erfolgte bei den Patienten einmal vor Beginn der Strahlentherapie und zu einem Zeitpunkt, an dem der Patient eine Gesamt-Energiedosis von ca. 50Gy erhalten hatte. Auch hier wurde streng darauf geachtet, dass Pausen nicht in die Exhalat-Gewinnungszeit eingerechnet wurden und jeder Patient tatsächlich genau 15 Minuten am Gerät atmete; zusätzlich wurde den Patienten an beiden Terminen ein Serum-Röhrchen Cubitalvenen-Blut entnommen.

### **3.1.2.2 Diagnosen**

Die Patienten mussten sich wegen folgender Erkrankungen einer Bestrahlungsbehandlung im Thoraxbereich unterziehen (aus den Patientenakten erhobene Befunde vor Beginn der Strahlentherapie):

1. Adeno-Carcinom der Lunge (Stadium IV, T<sub>4</sub>N<sub>x</sub>M<sub>1</sub>)
2. Plattenepithel-Carcinom der Lunge (Stadium III B, pT<sub>4</sub>N<sub>x</sub>M<sub>0</sub>)
3. kleinzelliges Bronchial-Carcinom (limited disease)
4. mediastinale Metastasen eines unbekanntes Primärtumors
5. kleinzelliges, neuroendokrines mediastinales Carcinom bei unbekanntem Primärtumor
6. pulmonale Filiae eines invasiv-duktales Mamma-Carcinoms
7. Adeno-Carcinom der Lunge (Stadium III B, cT<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>)
8. großzelliges neuroendokrines Bronchial-Carcinom (Stadium IV, cT<sub>4</sub>N<sub>3</sub>M<sub>1</sub>)
9. Plattenepithel-Carcinom der Lunge (Stadium III A, cT<sub>3</sub>cN<sub>3</sub>cM<sub>0</sub>)
10. kleinzelliges Bronchial-Carcinom (extensive disease)
11. Plattenepithel-Carcinom der Lunge (Stadium II B, pT<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>)
12. Plattenepithel-Carcinom der Lunge (Stadium III B, cT<sub>4</sub>cN<sub>x</sub>M<sub>0</sub>)
13. Ösophagus-Carcinom (Stadium III B, cT<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>)
14. muzinöses Adeno-Carcinom der Lunge (Stadium II A, pT<sub>1</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>)

### **3.1.2.3 Follow-Up**

Jeder Patient wurde in der Klinik für Strahlentherapie während der gesamten Dauer der Behandlung auf Nebenwirkungen der Therapie überwacht, insbesondere auf negative Folgen im Sinne einer Strahlenpneumonitis. Auch nach Ende der Bestrahlungen erschienen alle zur Nachsorge in der Klinik, das erste Mal üblicherweise ca. drei bis sechs Wochen nach dem letzten Bestrahlungstermin, dann finden vierteljährliche Nachkontrollen statt. Standardmäßig wird an jedem dieser Termine eine konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax angefertigt

und eine gründliche körperliche Untersuchung durchgeführt; der Patient wird gezielt nach typischen Symptomen einer Pneumonitis (Husten, Dyspnoe, weißlicher Auswurf) gefragt. Falls erforderlich, wird eine weitergehende Diagnostik (Computertomographie, Lungenfunktion, etc.) eingeleitet.

Jeder Patient wird schon vor Beginn der Strahlentherapie über die Risiken und Nebenwirkungen der Behandlung aufgeklärt und instruiert, bei typischen Beschwerden im Sinne einer Pneumonitis unverzüglich den Arzt aufzusuchen.

Es wurde ermittelt, ob die Patienten eine Pneumonitis als Folge ihrer Bestrahlungsbehandlung entwickelten. Für die Entscheidung, ob die Patienten tatsächlich an einer klinisch relevanten Strahlenpneumonitis erkrankten, wurde folgende Einteilung gemäß den Common Toxicity Criteria (CTC, [25]) des amerikanischen National Cancer Institute zugrunde gelegt:

- Pneumonitis Grad 0: keine Infiltrate nachweisbar, keine klinischen Beschwerden
- Pneumonitis Grad 1: lediglich radiologisch nachweisbare typische Veränderungen der Lunge (siehe unten), keine oder lediglich sehr milde klinische Symptomatik, keine Gabe von Steroiden nötig
- Pneumonitis Grad 2: zusätzlich klinische Zeichen einer Lungenschädigung, wie etwa Husten, Dyspnoe, weißlicher Auswurf etc.; die Gabe von Steroiden oder Diuretika wird notwendig
- Pneumonitis Grad 3: zusätzlich wird die Gabe von Sauerstoff (z. B. über eine Maske) notwendig, die Patienten sind schwer krank
- Pneumonitis Grad 4: der Patient muss intubiert werden, eine maschinelle Beatmung ist nötig

In dieser Studie galten Patienten als an einer Pneumonitis erkrankt, wenn sie im Laufe oder infolge der Strahlentherapie Symptome im Sinne einer Pneumonitis mindestens zweiten Grades entwickelten und gleichzeitig eine entsprechende radiologische Veränderung des Lungeninterstitiums wie

- unscharfe Gefäßzeichnungen, schleierartige Trübungen, fleckige Verdichtungen, später dann auch streifige Verdichtungen und Pleuraverdickungen in der konventionellen Röntgenaufnahme (mit strenger Begrenzung auf das bestrahlte Areal) und/oder

- im Verlauf zunehmende Verdichtungen, fleckige Infiltrate – die jetzt auch über das bestrahlte Gebiet hinausreichen - und einer im Bestrahlungsfeld leichten Dichteanhebung des Parenchyms im computertomographischen Bild

nachweisbar war. Zu beachten ist, dass die radiologischen Zeichen häufig erst mit einer Latenzzeit von bis zu sechs Wochen auftreten und der Krankheitsverlauf sich oft über mehrere Monate erstreckt. Falls auch nach mindestens einem halben Jahr keine klinischen Symptome auftraten, galt die stets nachzuweisende diskrete radiologische Veränderung im Strahlenfeld als „normale“ Reaktion des Lungenparenchyms auf ionisierende Strahlung. Auch Symptome, die mehr als ein halbes Jahr nach Erhalt der letzten Einzeldosis auftreten, sind nicht mehr eindeutig in einen kausalen Zusammenhang mit der Bestrahlungsbehandlung zu bringen und können ebenso Folgen der Grunderkrankung sein. Dementsprechend wurden solche eventuell später aufgetretene Beschwerden auch nicht als Pneumonitis-Erkrankungen gewertet.

Es erkrankten insgesamt drei Patienten (Nr. 7, 9 und 12, ihre Diagnosen sind Kapitel 3.1.2.2 zu entnehmen) infolge der Strahlentherapie an einer Pneumonitis zweiten, einer an einer Pneumonitis dritten Grades (Nr. 5 aus Kapitel 3.1.2.2). Die Pneumonitis trat im Durchschnitt  $43,5 \pm 27,6$  Tage nach dem zweiten Messtermin auf.

## **3.2 Materialgewinnung und -verarbeitung**

### **3.2.1 Sammeln des Exhalat-Kondensats, Messung des geatmeten Volumens**

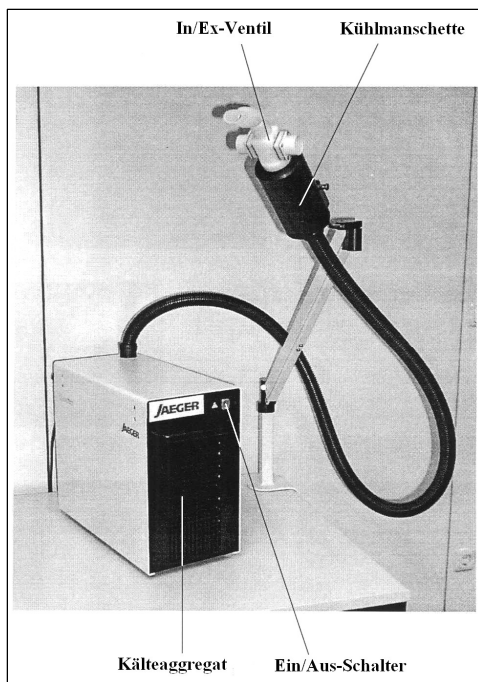
#### **3.2.1.1 Aufbau der Messanordnung, Prinzip der Exhalat-Kondensat-Gewinnung**

Zum Sammeln des Exhalat-Kondensats diente das Gerät „ECoScreen“ der Firma Erich Jaeger Medizintechnik GmbH, Würzburg (siehe Abbildung 1a). Die Methode ist für das Sammeln von Exhalat-Kondensat etabliert, das Gerät wurde z. B. auch schon von Balint et al. [5], Gessner et al. [13], Hanazawa et al. [15] und Lärstad et al. [20] benutzt. Es erlaubt das Kondensieren von nichtgasförmigen Bestandteilen der ausgeatmeten Luft durch einen biologisch inerten, kälte- und chemikalienbeständigen Probensammler, welcher durch eine Kühlmanschette auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt wird. Der Probensammler wiederum besteht aus einem Lamellenkondensator und einer abschraubbaren Probensammelkappe, die gemäß Abbildung 1b zusammengesraubt und wie in Abbildung 1c auf das Nichtrückatmungsventil gesteckt werden. Anschließend wird diese eigentliche Sammelvorrichtung (Probensammler + In-/Ex-Ventil mit Krümmer und Mundstück) in die Kühlmanschette eingesetzt (siehe Abbildung 1d). Es hat sich bewährt, den Probensammler dabei kurz zuvor mit etwas Alkohol abzureiben,

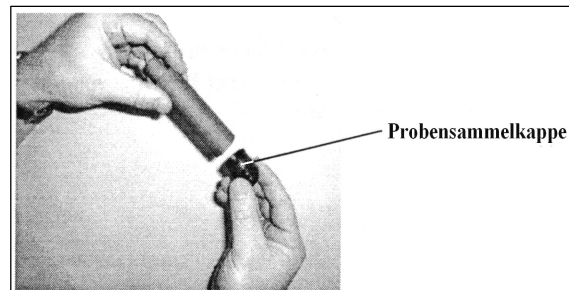
damit dieser nicht im Kühlmantel festfriert. Der Ansatz des Probensammelrohrs beginnt frei im In/Ex-Ventilblock, also nicht der Wandung anliegend, damit keinerlei Speichel ins Rohr gelangen kann (eventuell sich ansammelnder Speichel wird in der Außenwandung des Ventilansatzes zurückgehalten).

Vor jeder Messung wurde der ECoScreen mit eingesetzter Sammelvorrichtung mindestens 20 Minuten im „Leerlauf“ betrieben, um die geforderte Betriebstemperatur zu gewährleisten.

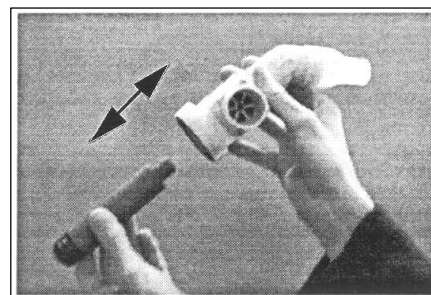
Der Proband bzw. Patient atmet in das Mundstück, an welchem sich proximal als zusätzlicher Schutz bei eventuell großen Mengen an entstehendem Speichel ein Speichel-Sammelröhrchen befindet (dieses muss nach jeder Messung auf Speichel geprüft und bei Bedarf ausgetauscht werden); er muss dabei eine Nasenklemme tragen, um jegliche Nasenatmung zu unterbinden. Die exhalierete Luft durchströmt nun das Ventil und gelangt in das innere Rohr des Probensammlers, wobei sie ständig weiter abgekühlt wird und nichtgasförmige Bestandteile an der Wandung abkondensieren; auf diese Weise sammelt sich das Exhalat-Kondensat in der Probensammelkappe entsprechend Abbildung 2. Nun strömt die ausgeatmete Luft wieder nach proximal, wobei sie gemäß dem Gegenstromprinzip zunehmend erwärmt wird, während sich die nach distal strömende Luft des Innenrohres ihrerseits abkühlt; das Nichtrückatmungsventil verhindert dabei zuverlässig ein Zurückströmen der ausgeatmeten Luft.



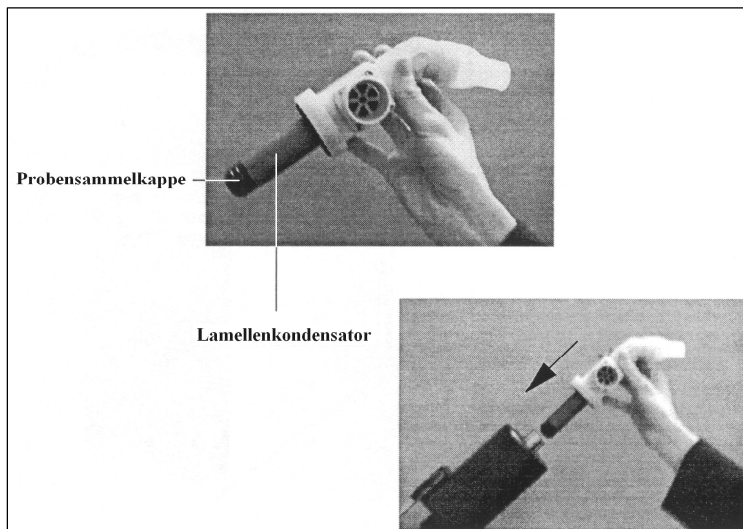
**Abb. 1a** Jaeger ECoScreen



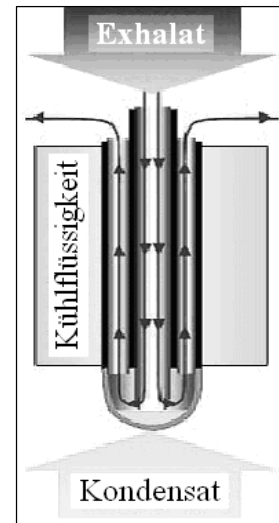
**Abb. 1b** Zusammenschrauben von Probensammelkappe und Lamellenkondensator



**Abb. 1c** Aufstecken des Probensammlers auf das In/Ex-Ventil



**Abb. 1d** Einsetzen der Sammelvorrichtung in die Kühlmanschette



**Abb. 2** Prinzip der Exhalat-Kondensation

(Abbildungen 1a–d und Abb. 2: © Fa. Erich Jaeger Medizintechnik GmbH, Würzburg)

### 3.2.1.2 Bestimmung des während des Messzeitraums geatmeten Volumens

Zwischen das In/Ex-Ventil und das Mundstück des Geräts wurde zusätzlich noch eine Volumen-Messsonde (TripeIV<sup>®</sup> Volume Sensor, Fa. Jaeger) des Ergospirometers „Oxycon“ (ebenfalls Fa. Jaeger) geschaltet. Auf diese Weise wird eine exakte Erfassung des während der Sammelperiode geatmeten Volumens ermöglicht; die Computersoftware LabManager (Fa. Jaeger, Version 4.52c) erlaubt hierbei auch das Erkennen und Eliminieren eventueller Untersuchungspausen aus den Messdaten. Überdies kann dem Probanden oder Patienten durch Ablesen des respiratorischen Quotienten sofort mitgeteilt werden, falls er während der Messphase hypo- oder hyperventilieren sollte und somit Schwindel nach und Panik während der Untersuchung wirksam vorgebeugt werden.

### 3.2.1.3 Verhinderung von Verunreinigungen der Proben, Hygienevorschriften

Um die Proben nicht zu verfälschen, wurde für die Desinfektion aller Geräte-Bestandteile 80%iger hochgereinigter Alkohol benutzt, der vollkommen rückstandsfrei verdunstet; die Probensammelkappen wurden jeweils nur einmal benutzt und danach entsorgt. Nach völligem Verdunsten aller Alkoholreste wurden die zusammengeschraubten Probensammler gewogen (Laborwaage Scaltec SBA 33), wobei Latex-Einmalhandschuhe getragen wurden, um keine

Fremdmaterialien in oder an die Probensammler zu bringen und eine Verfälschung des Gewichts zu verhindern.

Nach jeder Benutzung des ECoScreen wurden alle verunreinigten Geräteteile gemäß den Vorschriften der Firma Jaeger [11] desinfiziert.

#### **3.2.1.4 Durchführung der Messungen**

Es wurde darauf geachtet, dass die Studienteilnehmer an den Messtagen keinen besonderen körperlichen Anstrengungen, forcierten Atemmanövern oder ähnlichem ausgesetzt waren und auch andere pulmonale Belastungen, wie etwa inhalative Allergentests oder bronchologische Untersuchungen mindestens eine Woche zurück lagen.

Jedem Studienteilnehmer gelang es, die insgesamt geforderten 15 Minuten reiner Sammelzeit am ECoScreen zu absolvieren, auch bei den auf Grund ihrer Krankheit geschwächten Patienten konnten die Messungen wie gefordert problemlos durchgeführt werden. Jedem Teilnehmer wurde angeboten, bei Unwohlsein die Messung vorzeitig abubrechen; es machte jedoch keiner von dieser Option Gebrauch.

Trat ein Hustenreiz oder ähnliches auf, wurde die Messung kurzzeitig gestoppt und der Messperson genügend Zeit zum Abhusten, Schnäuzen und dergleichen gegeben; diese Zeit wurde dann selbstverständlich nicht in die Messzeit mit einbezogen.

Das in der Messzeit von genau 15 Minuten gemessene Volumen betrug bei den Probanden über die drei Messtage gemittelt  $153,6 \pm 21,6l$  (siehe Tabelle 5, Kapitel 4.2.4); die Patienten atmeten im Mittel  $168,4 \pm 46,6l$  vor Beginn der Strahlentherapie und  $184,5 \pm 50,0l$  nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy (siehe Tabellen 37 und 38, Kapitel 8).

#### **3.2.1.5 Weiterverarbeitung des Untersuchungsmaterials**

Nach Abnahme des Exhalats wurde dieses bei Zimmertemperatur aufgetaut und für zehn Minuten bei 4000 U/min und 21°C zentrifugiert (Laborzentrifuge Hettich Universal 30 RF, Rotor 1424A), anschließend der Probensammler gewogen und schließlich die Sammelkappe vorsichtig vom Lamellenkondensator abgeschraubt. Aus der Differenz beider Wägungen lässt sich so das Gewicht des jeweils gewonnenen Exhalat-Kondensats bestimmen. Nun wurde das Exhalat in Sammelröhrchen aus Polypropylen (GLW Kryotubes) pipettiert, wobei man das Volumen des Kondensats bestimmen kann; die Messung erfolgte hierbei bis auf 10µl genau. (Bei allen hier beschriebenen Tätigkeiten wurden wieder Latex-Einmalhandschuhe getragen.) Es zeigte sich jedoch im Verlaufe der Untersuchungen, dass die Probensammelkappen es nie erlauben, wirklich alles abzupipettieren (es bleiben immer kleine Reste in der Sammelkappe,

die je nach Fertigung etwas variieren), weshalb für spätere Berechnungen und die Statistik lediglich die verlässlichen Ergebnisse der Wägungen herangezogen wurden. Es konnte so im Durchschnitt bei den Probanden (gemittelt über die drei Messtage, siehe Kapitel 4.2.4, Tabelle 5)  $2456,9 \pm 232,1 \mu\text{g}$  Exhalat-Kondensat und bei den Patienten  $2705,4 \pm 420,8 \mu\text{g}$  bei 0Gy und  $2995,8 \pm 557,0 \mu\text{g}$  bei 50Gy gewonnen werden (siehe Tabellen 37 und 38, Kapitel 8). (Zum Vergleich betragen die ungenaueren Pipettierwerte  $2463,6 \pm 429,2 \mu\text{l}$  bei den Probanden und  $2722,5 \pm 474,7 \mu\text{l}$  bzw.  $3145,1 \pm 680,2 \mu\text{l}$  bei den Patienten.)

Zu guter letzt wurden die Proben in einem Tiefkühlschrank (Forma Scientific -86C Freezer) bei ca.  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse eingefroren; hierbei erschien ein Aufteilen der Proben auf mehrere Sammelröhrchen sinnvoll, da so ein Wiederverwenden schon aufgetauter Proben für weitere Tests entfällt.

### **3.2.2 Gewinnung und Verarbeitung des Cubitalvenenblutes**

Jedem Studienteilnehmer wurde zu den unter 3.1.1 und 3.1.2.1 genannten Terminen - stets vor Beginn der Exhalat-Gewinnung - ein Serum-Röhrchen (Fa. Sarstedt, Modell „S-Monovette“, Saugkolbenprinzip) Blut aus einer großkalibrigen Cubitalvene abgenommen (Probanden: einmalig vor dem jeweils ersten Messtag, Patienten: vor jeder der beiden Messungen). Das Blut wurde nach einer Gerinnungszeit von ca. zehn bis 15 Minuten bei 4000 U/min und  $21^{\circ}\text{C}$  für zehn Minuten zentrifugiert (Hettich Universal 30 RF, Rotor 1424A). Danach wurde das Serum abpipettiert, unverzüglich auf Sammelröhrchen aus Polypropylen (GLW Kryotubes) verteilt - wieder auf jeweils mehrere Portionen verteilt, um mehrfache Auftauvorgänge zu verhindern - und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dieses zügige Verarbeiten des Blutes ist besonders wichtig, da die im Vollblut enthaltenen Thrombozyten im Laufe der Zeit TGF- $\beta$  an das Serum abgeben und so die Untersuchungen verfälschen würden.

### **3.2.3 Biochemische Tests**

#### **3.2.3.1 TGF- $\beta$ im Exhalat-Kondensat und im Serum**

Zur Messung der Konzentrationen an TGF- $\beta$  im Untersuchungsmaterial dienten „Quantikine“-ELISA-Kits der Firma R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA). Diese sind spezifisch für TGF- $\beta$ 1 und zur Messung von TGF- $\beta$ 1 in Blutserum etabliert (viel gebraucht z. B. von Anscher et al. [2, 3, 4]).

Im ersten Schritt wird hierbei der eventuell im Untersuchungsgut (Exhalat-Kondensat: jeweils  $500 \mu\text{l}$  pro Probe, Blutserum:  $100 \mu\text{l}$ ) vorhandene Transforming Growth Factor in einem Reaktionsgläschen aus Polypropylen mit  $100 \mu\text{l}$  1N Salzsäure (Exhalatproben) beziehungsweise  $100 \mu\text{l}$  2,5N Essigsäure / 10M Harnstoff (Serumproben) aktiviert und nach

10 Minuten die Lösung wieder mit 100µl 1,2N NaOH / 0,5M HEPES (Exhalatproben) bzw. 100µl 2,7N NaOH / 1M HEPES (Serumproben) neutralisiert. Vor Beginn des eigentlichen Immunoassays müssen aus festem TGF-β1 (rekombinanter menschlicher TGF-β1, Artikel 890207 der Fa. R&D Systems) in einer Verdünnungsreihe Standards bereitet werden; hierzu wurde für die Exhalat-Proben der dem Kit beiliegende, auch für Zellüberstände zu verwendende, also wasserklare, Kalibrator-Verdünner RD5I verwendet; für die Serumproben wurde der dafür beiliegende Kalibrator-Verdünner RD6M verwendet. Außerdem wurden die Serumproben, da in ihnen im allgemeinen recht hohe Konzentrationen an TGF-β vermutet werden müssen, mit dem Kalibrator-Verdünner RD6M in einem Verhältnis von 1:30 verdünnt, damit die Messwerte im linearen Bereich der Extinktionskurve bleiben. Bei Proben, die außerhalb dieses linearen Bereiches lagen, wurde eine erneute Messung mit sechzigfacher Verdünnung durchgeführt. Anschließend wurden die Messergebnisse selbstverständlich gemäß der jeweiligen Verdünnung wieder zurückgerechnet. Jetzt wird in einer Mikrotiterplatte eine Doppelbestimmung jeder so präparierten Probe vorgenommen, wobei pro Well (= Vertiefung) 200µl Probenmaterial notwendig ist. Nach Inkubation für drei Stunden bei Raumtemperatur erfolgt dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit dem zubereiteten Waschpuffer. Anschließend werden pro Well 200µl TGF-β1-Konjugat zugefügt und nochmals für 1½ Stunden inkubiert (wieder bei Raumtemperatur). Nach einem erneuten dreimaligen Waschen der Mikrotiterplatte erfolgt die Zugabe von 200µl Substrat pro Well; dieses Substrat bindet an das TGF-β1-Konjugat und leitet so eine Farbreaktion ein. Da diese Farbreaktion lichtempfindlich ist, erfordert der anschließende, 20 Minuten bei Raumtemperatur dauernde, Inkubationsschritt absolute Dunkelheit, was in einem lichtdichten Schrank gelang. Jetzt wurde jedem Well 50µl Stopperflüssigkeit zugefügt, die die Farbreaktion abbricht. Abschließend wurde die Mikrotiterplatte im Photometer „Dynatech MR 5000“ (MTX Lab Systems Inc., Vienna, Virginia, USA) gemessen, welches ein integriertes Programm zum direkten Umrechnen der Extinktion in die Konzentration der Proben ermöglicht.

Falls bei der Doppelbestimmung einer Probe eine Standardabweichung der beiden optischen Dichten von mehr als zehn Prozent gemessen wurde, erfolgte für diese Probe eine erneute Messung. Es konnte so eine mittlere Standardabweichung der beiden Einzelmessungen einer doppelbestimmten Probe von 4,7% (Exhalat-Kondensat der Probanden), 5,2% (Exhalat-Kondensat der Patienten), 2,7% (Serum-Proben der Probanden) und 2,4% (Serum-Proben der Probanden) erzielt werden. Der Hersteller gibt für die Messung von Zellüberstands-Proben eine Intra-Assay-Präzision von 5,7-7,5% und eine Inter-Assay-Präzision von 4,5-6,3% an. Für



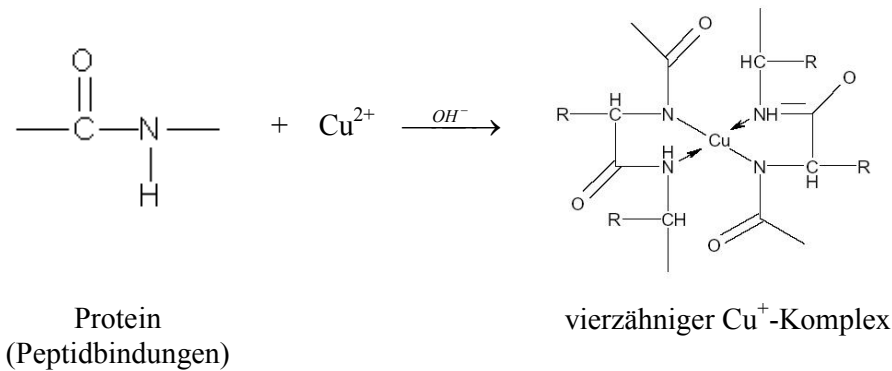
Blutserum-Proben werden in der Herstellerliteratur eine Intra-Assay-Präzision von 3,7-7,3% und eine Inter-Assay-Präzision von 7,1-11,7% angeführt.

Es konnte nur in den Blutserum-Proben TGF-β1 nachgewiesen werden, bei allen untersuchten Exhalatproben lagen die Extinktionswerte dagegen weit unter der unteren Nachweisgrenze. Auf eine Ankonzentrierung der Exhalatproben musste aufgrund zu geringer Probenmengen, die lediglich eine Ankonzentrierung auf das Doppelte der Ursprungskonzentration erlaubt hätten, verzichtet werden.

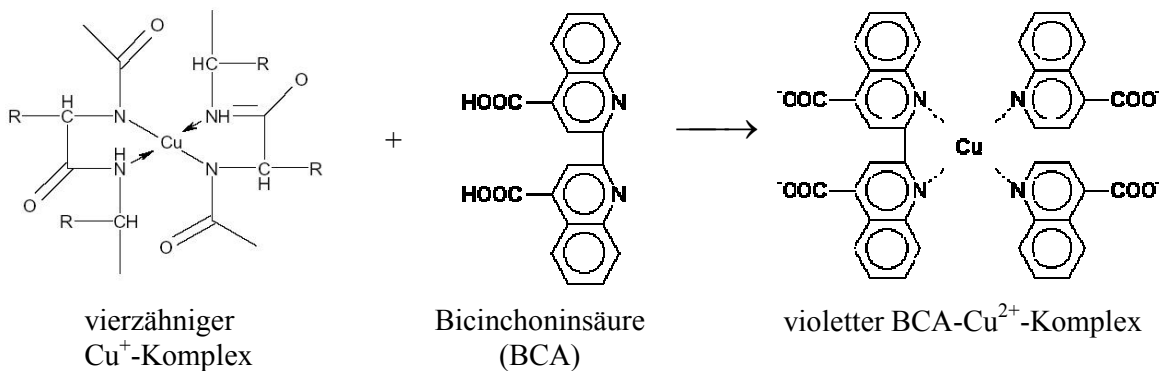
### 3.2.3.2 Gesamtprotein im Exhalat

Um Protein im Exhalat zu bestimmen, wurde das „Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“ der Firma Pierce (Rockford, Illinois, USA) verwendet. Diese Methode kam auch schon bei Effros et al. [9] und Gessner et al. [13] zur Messung von Total-Protein im Exhalat-Kondensat zum Einsatz. Prinzip des Nachweissystems ist die Anlagerung von Kupferionen im alkalischen pH-Wert-Bereich an die Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden. Voraussetzung für die Reaktion ist das Vorhandensein von mindestens zwei Peptidbindungen (Tripeptid). Grundlage des Nachweissystems bildet eine Bicinchoninsäure(= BCA)-Kupferkomplexbildungsreaktion gemäß dem folgendem Schema:

1. Reaktion:



2. Reaktion:



Die Intensität der dabei entstehenden Violettfärbung ist in einem weiten Bereich linear der Zahl der Peptidbindungen und damit der Proteinkonzentration der untersuchten Probe.

Als Grundlage der Verdünnungsreihe zum Erstellen einer Standardkurve dient bei diesem System ein Albumin-Standard (bovines Serumalbumin, Artikel 23209 der Fa. Pierce), aus dem eine Ausgangslösung mit einer Konzentration von 2,0mg/ml erstellt wird. Für das Mikrotiter-Platten-Protokoll wird aus dieser Lösung eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 1µg/ml und 20µg/ml erstellt.

Es werden pro Well der Mikrotiterplatte 150µl Standard bzw. Probenlösung benötigt, wobei auch hier wieder für jeden Standard und jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, um systematische Fehler oder Pipettierfehler zu erkennen. Anschließend werden 150µl des Arbeitsreagenz hinzugefügt, welches zuvor nach Anleitung des Herstellers aus den drei Ausgangsreagenzien MA (= Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat und Natriumtartrat in 0,2N Natronlauge), MB (= 4,0%ige Bicinchoninsäure) und MC (= 4,0% Kupfersulfat-Pentahydrat in Wasser) hergestellt wurden. (Das Arbeitsreagenz muss unbedingt vor jedem Versuch frisch zubereitet werden, da es längstens einen Tag lang verwendet werden kann, bevor es durch Redoxreaktionen zerstört und damit unbrauchbar wird.) Nach dem Zufügen des Arbeitsreagenz muss die Mikrotiterplatte für ca. 30 Sekunden mit einem Mikrotiterplatten-Schüttelapparat (Schüttler MTS 2 der Firma IKA, Wilmington, North Carolina) gut durchmischt werden, anschließend wird sie für 120 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank (Hybaid Mini Oven MK 11, Firma Rich-Mond, Wigan, England, Großbritannien) inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgt die Messung der Extinktion der Einzelproben im Photometer Dynatech MR 5000 bei einer Wellenlänge von 562nm.

Aus den Messwerten der Standardproben lässt sich nun im Computerprogramm „Excel 2000“ (Fa. Microsoft, Redmond, Washington, USA) eine Standardkurve durch Trendlinienbestimmung ermitteln, aus der sich wiederum die Formel zur Berechnung von Konzentrationen aus Extinktionswerten ableiten lässt. Mit deren Hilfe kann die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

Auch für dieses Messverfahren wurde durch die Doppelbestimmung der Einzelproben sichergestellt, dass bei einer Standardabweichung der beiden optischen Dichten von mehr als zehn Prozent eine erneute Messung dieser Probe erfolgte. So konnte eine mittlere Standardabweichung der Proben von 3,4% (Probanden) und 3,1% (Patienten) erreicht werden. Der Hersteller gibt für das System einen mittleren Test-zu-Test-Variationskoeffizienten von bis zu 11,43% an.

In allen Exhalatproben war Gesamtprotein nachzuweisen, sowohl bei den Probanden, als auch bei den Patienten.

### **3.2.3.3 Gesamtprotein im Serum**

Auch für diese Messungen wurde ein System der Firma Pierce (Rockford, Illinois, USA) benutzt, diesmal allerdings das „BCA Protein Assay Kit“, welches sich besonders für höhere Konzentrationen an Protein eignet. Das Verfahren ist identisch mit dem unter 3.2.3.2 beschriebenen, deshalb kann auf eine genauere Beschreibung an dieser Stelle verzichtet werden. Es muss lediglich erwähnt werden, dass für das Arbeitsreagenz lediglich zwei Komponenten, nämlich die BCA Reagenzien A (=  $\text{NaCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_2$ , BCA und  $\text{Na}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2$  in 0,2N NaOH) und B (= 4%  $\text{CuSO}_{4(\text{aq})}$ ), erforderlich sind. Es wurden hier Standards bereitet, die von 25 bis 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Albumin reichen, außerdem wurden alle zu testenden Serumproben vor Beginn des Assays mit destilliertem Wasser auf 1/100 der ursprünglichen Konzentration verdünnt, da die Proteinkonzentration im Serum ja bekanntermaßen im allgemeinen zwischen 60 und 80g/dl liegt. Des Weiteren werden im ersten Schritt lediglich 25  $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe pro Well der Mikrotiterplatte benötigt und jeweils 200  $\mu\text{l}$  des Arbeitsreagenz hinzugefügt. Nach Mischen am Mikrotiterplatten-Schüttelapparat (Schüttler MTS 2 der Firma IKA, Wilmington, North Carolina) für ca. 30 Sekunden wurden die Mikrotiterplatten für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und bei einer Wellenlänge von 562nm im Dynatech MR 5000 die Extinktion der Einzelproben gemessen.

Auch hier wurde jede Probe, bei der die Doppelbestimmung eine Standardabweichung von mehr als 10% aufwies, nochmals gemessen. So konnte eine durchschnittliche Standardabweichung der beiden Einzelmessungen jeder Probe von jeweils 1,7% für Probanden und Patienten erreicht werden. Für das verwendete Kit gibt der Hersteller einen Variationskoeffizienten zwischen einzelnen Messungen von 14,7% an.

Weder bei den Probanden, noch bei den Patienten fielen bei den Messungen gravierende Hyper- oder Hypoproteinämien auf (Probanden 64,41 – 77,67g/dl, Patienten vor Therapie 61,60 - 82,80g/dl und nach Therapie 63,97 – 81,69g/dl, siehe Kapitel 8).

## **3.3 Statistische Methoden**

Die Originaldaten der Messungen wurden in Microsoft Excel 2000 eingegeben, hiermit wurden auch alle Standardkurven der Proteinmessungen erzeugt und die daraus gewonnenen Formeln zum Berechnen der Gesamtprotein-Konzentrationen der Proben genutzt. Als

Statistiksystem diente das Programm WinMedas der Firma Grund EDV-Systeme, Margetshöchheim.

Es handelt sich hier um eine prospektive beschreibende Studie; folgende Tests kamen zur Anwendung: Die Probitanalyse diente zur Beurteilung der Daten auf Normalverteilung (Gaußverteilung), die Rangvarianzanalyse nach Friedman zur Untersuchung auf Gleichheit der Variablen einer Messreihe, der  $\chi^2$ -Test (Vierfeldertest) zur Untersuchung der Abhängigkeit zweier klassifizierter Variablen voneinander, die Spearman'sche Rangkorrelation als Test auf Zusammenhänge zwischen zwei Variablen eines Probanden/Patienten, der U-Test nach Mann und Whitney zum Testen auf Verschiedenheit einer Variablen in zwei Gruppen (für beliebig verteilte Variablen, der t-Test ist das Äquivalent für normalverteilte Variablen), der Wilcoxon-Test als nichtparametrischer Test auf Verschiedenheit zweier Variablen, die beim gleichen Probanden/Patienten erhoben wurden und schließlich der Test nach Olkin und Siotani auf Gleichheit von zwei Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten.

Zur vergleichbaren Quantifizierung der Testergebnisse werden p-Werte berechnet. p-Werte unter 0,05 werden als signifikant bezeichnet und als wesentlich interpretiert; wie allgemein üblich werden die p-Werte bei Signifikanz mit Sternchen hervorgehoben ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  und  $p < 0,001^{***}$ ).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchte Kollektive und demographische Daten

#### 4.1.1 Untersuchte Kollektive

Untersucht wurden 14 Probanden und 14 Patienten.

#### 4.1.2 Demographische Daten

Vergleiche innerhalb der demographischen Daten werden getrennt nach Zugehörigkeit zu den beiden untersuchten Kollektiven durchgeführt, da ja vom Studiendesign her beide Gruppen im Rahmen der Studie vorrangig vergleichend auf Unterschiede untersucht werden sollen. Dieser Abschnitt charakterisiert beide Kollektive, wobei klar ist, dass sie sich grundsätzlich deutlich voneinander unterscheiden (Probanden: gesund, jung und Nichtraucher, Patienten: älter, krank und häufig Raucher) – es geht daher zunächst vor allem um die Beschreibung der Ausmaße dieser Unterschiede.

	Status				p
	Patienten		Probanden		
Geschlecht	n	%	n	%	
Männlich	11	78,6 %	8	57,1 %	0,42
Weiblich	3	21,4 %	6	42,9 %	
Gesamt	14	100,0 %	14	100,0 %	—

**Tabelle 1.** Anzahl und Prozentsatz der **Patienten und Probanden**, aufgeteilt nach Geschlecht und insgesamt. p aus dem exakten Chi-Quadrat-Test nach Fisher und Yates.

Bei den Patienten waren ca. 79% männlich und bei den Probanden 57%. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

	Status				p
	Patienten		Probanden		
	MW	ST	MW	ST	
Alter [Jahre]	61,9	11,0	23,7	1,7	0,00001***
Größe [cm]	171,6	7,5	178,4	12,4	0,13
Gewicht [kg]	79,6	15,9	71,0	16,8	0,23
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	26,9	4,4	22,0	3,2	0,0030**

**Tabelle 2.** Alter und Körpermaße der **Patienten und Probanden**. BMI = Body-Mass-Index, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Die Patienten waren im Mittel 62 Jahre alt, der jüngste war 44, der älteste 81 Jahre alt. Die Probanden waren signifikant jünger, im Mittel 24 Jahre mit einer Spannweite von 22 bis 29 Jahren. Die Patienten waren kleiner und schwerer als die Probanden, beides ist nicht signifikant, wohl aber hatten die Patienten einen signifikant höheren Body-Mass-Index im Vergleich zu den Probanden.

Ein Test auf Geschlechtsunterschiede ist für Größe und Gewicht erwartungsgemäß signifikant, man kann höchstens Alter und BMI vergleichen; hierzu wurde, getrennt nach Probanden- und Patientenkollektiv, der U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Es fand sich jedoch in keiner der beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern.

Zwischen den Männern des Probandenkollektivs mit  $24,1 \pm 2,0$  Jahren und den Frauen mit  $23,2 \pm 1,2$  Jahren zeigte sich kein signifikanter Altersunterschied ( $p = 0,34$ ). In der Gruppe der Patienten waren die Männer im Durchschnitt  $64,3 \pm 11,2$  Jahre alt und die Frauen  $53,3 \pm 3,8$ ; auch dieser Unterschied ist nicht signifikant ( $p = 0,10$ ).

Der Body-Mass-Index der Männer innerhalb der Probanden war  $23,1 \pm 3,8$ , der der Frauen  $20,6 \pm 1,6$ , ein Unterschied, der mit  $p = 0,11$  nicht signifikant ist. Ebenso zeigte sich bei den Patienten zwischen den Männern mit einem mittleren Body-Mass-Index von  $27,6 \pm 3,7$  und den Frauen mit  $24,2 \pm 6,7$  kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,38$ ).

Des Weiteren wurde der Einfluss des Alters auf BMI und Körpergröße untersucht. Da die beiden Kollektive altersmäßig sehr unterschiedlich sind (siehe Tab. 2), wurden sie getrennt getestet. In der Spearman'schen Rangkorrelation konnte diesbezüglich jedoch keine Signifikanz festgestellt werden. Bei den Kontrollen ergab sich  $p = 0,27$  für den Body-Mass-Index und  $p = 0,50$  für die Körpergröße, bei den Patienten wurden  $p = 0,16$  für den Body-Mass-Index und  $p = 0,16$  für die Körpergröße errechnet.

## **4.2 Exhalatparameter der Probanden über die drei Messtage**

Die Messergebnisse der Probanden dienen zur Klärung der Verhältnisse bei Gesunden und zur Abschätzung der Tag-zu-Tag-Variabilität der einzelnen Exhalatparameter.

### **4.2.1 Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung**

Für alle Probanden wurden Probitanalysen zur Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung der Variablen Exhalatmenge, V'E und Proteinkonzentration im Exhalat, jeweils für alle drei Messtermine, sowie der Differenzen dieser drei Werte vom ersten zum zweiten Messtag (diese werden erst in 4.3 benötigt), durchgeführt.

Alle untersuchten Variablen zeigten im Patientenkollektiv eine wesentliche Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung.

Für die Exhalatmenge des ersten Messtermins und die Differenz von V'E zwischen dem ersten und dem zweiten Messtermin sind für das Probandenkollektiv t-Test, Varianzanalyse und Produkt-Moment-Korrelation nicht mehr zuverlässig. Deshalb wurden durchgehend nichtparametrische Tests verwendet.

### **4.2.2 Exhalatparameter und demographische Daten**

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die demographischen Daten der Probanden auf die mittleren Werte der Exhalatparameter über den Messzeitraum Einfluss nehmen. Da die Probanden hinsichtlich ihres Alters nur wenig variieren (siehe Kapitel 4.1.2), ist eine Untersuchung des Alterseinflusses auf die Exhalatparameter sinnlos.

#### 4.2.2.1 Exhalatparameter und Geschlecht

Einen Test auf Geschlechtsunterschiede der Exhalatparameter zeigt Tabelle 3:

Exhalatparameter	Geschlecht				p
	männlich (n = 8)		weiblich (n = 6)		
	MW	ST	MW	ST	
<b>Mittlere Werte über die 3 Messtage</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2593,1	377,17	2275,2	292,0	0,18
V'E [l]	163,6	30,1	140,0	18,4	0,14
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	6,069	1,470	6,309	1,251	0,95
<b>Streuung der Werte</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	229,4	166,7	235,8	221,1	0,95
V'E [l]	23,0	24,6	19,7	22,6	0,95
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1,425	0,758	0,700	0,658	0,11

**Tabelle 3.** Alle 14 **Probanden** der Studie: Parameter des Exhalats, gemittelt über drei Tage sowie die Standardabweichung der drei Messwiederholungen, im Vergleich der Geschlechter. V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.) , MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Die Exhalatmenge und das V'E ist bei den weiblichen Probanden niedriger, dies ist jedoch nicht signifikant. Bezüglich des Proteins im Exhalat finden sich keinerlei Geschlechtsunterschiede. Auch hinsichtlich der Streuung der drei Exhalatparameter finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern.



#### 4.2.2.2 Exhalatparameter und Körpermaße

Im Folgenden wurde überprüft, ob die drei Exhalatparameter von den Körpermaßen der Probanden abhängen:

	Körpergröße [cm] rho p	Gewicht [kg] rho p	BMI [kg/m <sup>2</sup> ] rho p
<b>Mittlere Werte über die 3</b>			
<b>Messtage</b>			
Exhalatmenge [µg]	0,17 0,62	0,36 0,29	0,28 0,41
V'E [l]	0,40 0,24	0,53 0,051	0,34 0,32
Protein im Exhalat [µg/ml]	-0,09 0,80	-0,06 0,87	-0,17 0,61
<b>Streuung der Werte</b>			
Exhalatmenge [µg]	-0,22 0,52	0,17 0,63	0,11 0,74
V'E [l]	-0,13 0,71	0,24 0,48	0,34 0,32
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,32 0,35	0,24 0,47	0,05 0,89

**Table 4.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Probanden** der Studie: Parameter des Exhalats, gemittelt über drei Tage sowie die Standardabweichung der drei Messwiederholungen, in Abhängigkeit von den Körpermaßen Größe, Gewicht und Body-Mass-Index (BMI). V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

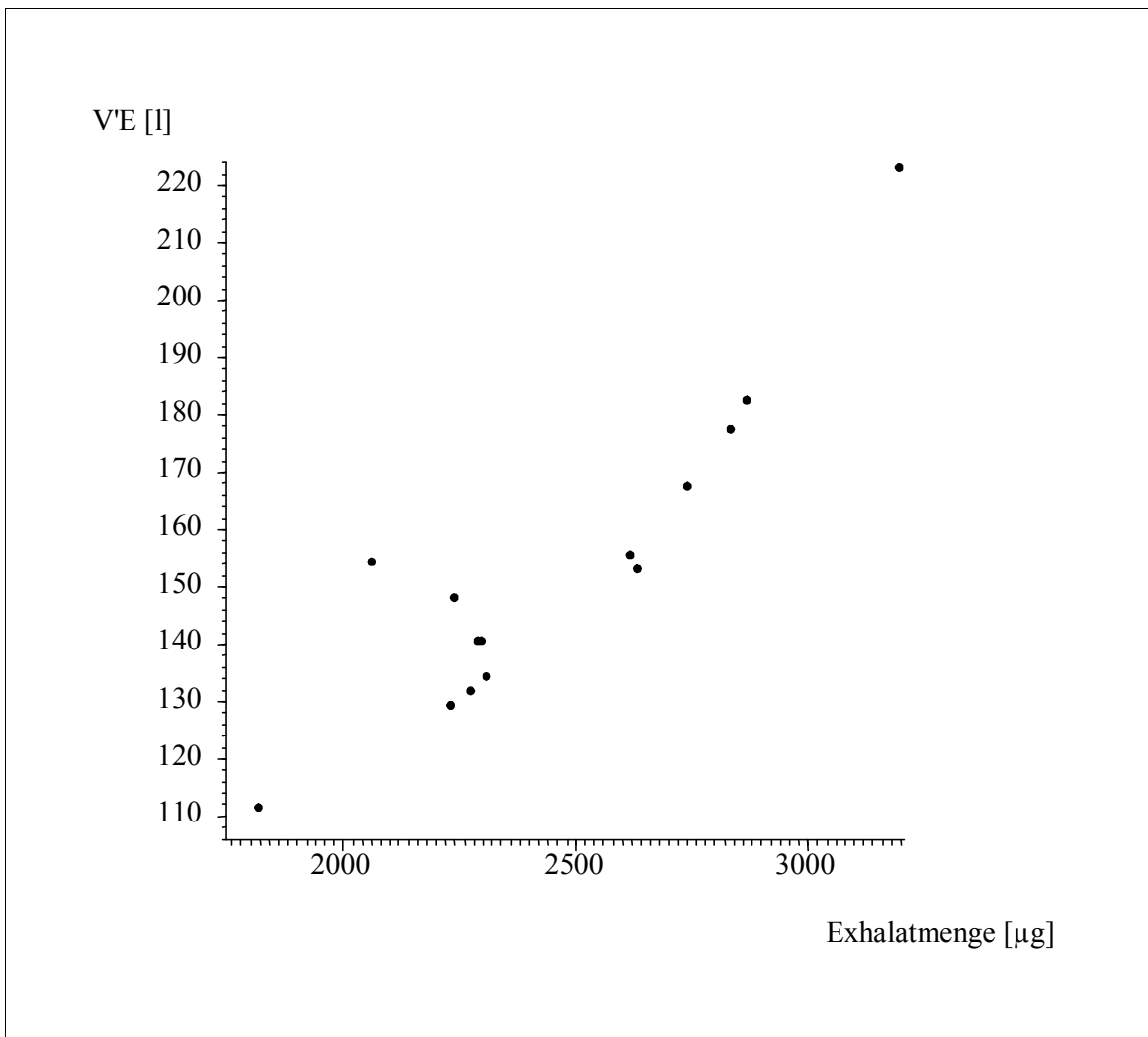
Über den gesamten Messzeitraum finden sich keinerlei Abhängigkeiten der Exhalatparameter von den Körpermaßen (Größe, Gewicht und BMI) der untersuchten Kontrollpersonen.

#### 4.2.3 Exhalatparameter und ihre Abhängigkeit voneinander

Es wurde die Abhängigkeit der mittleren Werte aller Exhalatparameter über die drei Messtage des Untersuchungszeitraums voneinander getestet. Dabei ergab die Spearman'sche Rangkorrelation eine sehr hohe positive Korrelation zwischen V'E und der Exhalatmenge (rho = 0,81 bei p = 0,0004\*\*\*, siehe auch Abbildung 3), was bedeutet, dass im Probandenkollektiv für höhere Werte bei V'E auch signifikant größere Exhalatmengen zu erwarten sind.

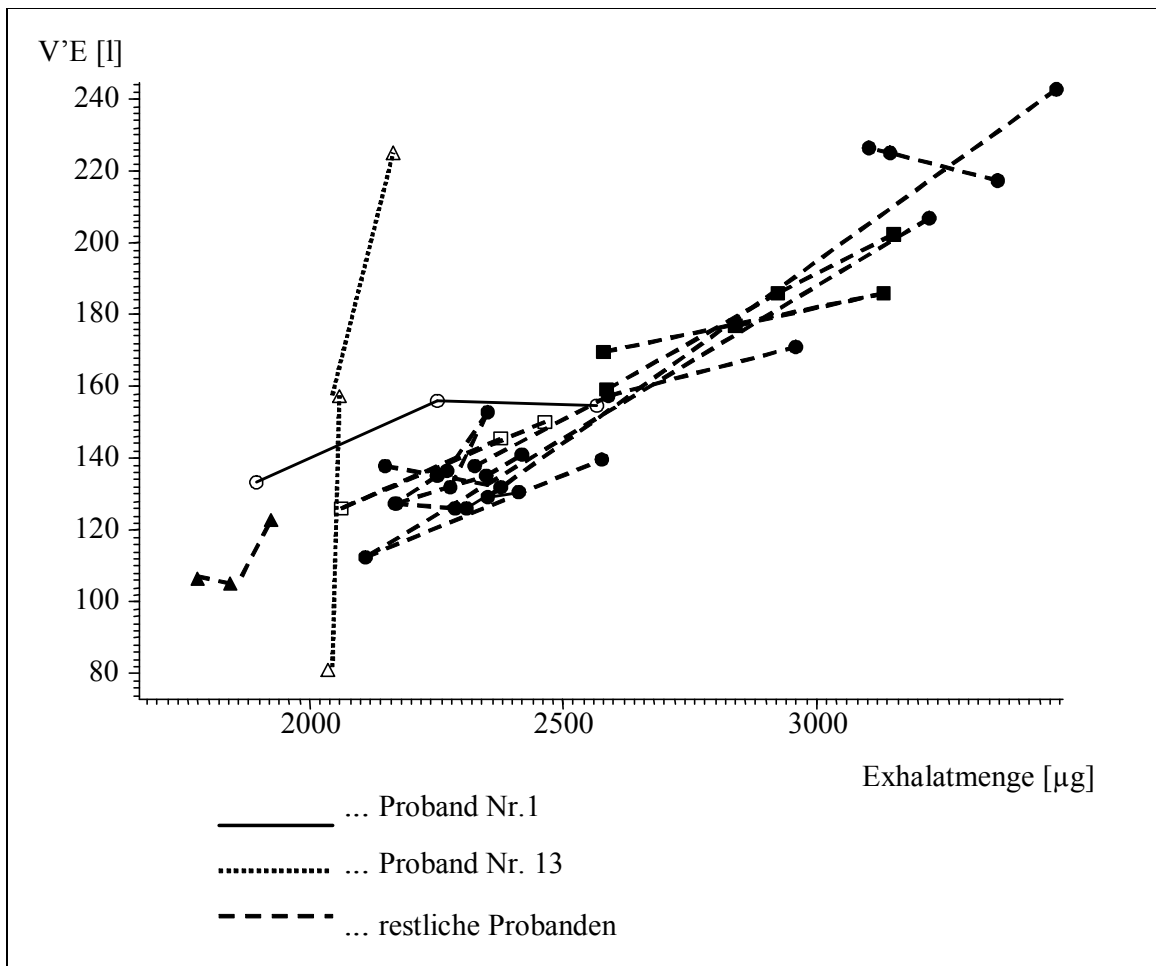
Höhere Konzentrationen an Protein im Exhalat gehen dagegen mit niedrigeren Werten für V'E (rho = -0,20 bei p = 0,56) einher, wobei sich allerdings keine Signifikanz zeigte.

Schließlich ist zwischen Protein im Exhalat und der dazugehörigen Exhalatmenge ( $\rho = 0,02$  bei  $p = 0,96$ ) bei den Probanden keinerlei Zusammenhang zu erkennen.



**Abbildung 3.** Abhängigkeit des Atemvolumens (gemittelt über die drei Untersuchungstermine) während der Sammelzeit (15 min.), von den Durchschnittswerten der dabei gewonnenen Exhalatmenge [µg]. Einbezogen wurden alle **Probanden** der Kontrollgruppe ( $n = 14$ ).

Es gibt hier insgesamt vier Ausreißer im Probandenkollektiv, von denen zwei besonders deutlich aus dem Kollektiv herausstechen; so fällt z.B. auf, dass bei Proband Nr. 1 die Exhalatmenge, bezogen auf das jeweils geatmete V'E, stark schwankt (sollte immer ca. 2500µg sein, ist jedoch ca. 2600, 2300 und 1900µg) und bei Proband Nr. 13 das V'E bei ungefähr gleich bleibenden Werten der Exhalatmenge deutlich variiert (sollte immer ca. 120l sein, ist jedoch ca. 80, 160 und 225l). Zur Veranschaulichung dieser Problematik wurde Abbildung 4 angefügt, in der alle drei Einzelwerte der Probanden dargestellt sind:



**Abbildung 4.** Exhalatmenge und dazugehöriges  $V'E$  über die drei Messtage. Dargestellt sind alle 14 **Probanden**, wobei die drei Messwerte eines Probanden der Übersichtlichkeit halber durch Linien miteinander verbunden wurden. Deutlich erkennt man die beiden Ausreißer (Nr. 1, durchgezogene Linie und Nr. 13, eng gepunktet dargestellt).  $V'E$  = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.)

#### 4.2.4 Exhalatparameter und Tag-zu-Tag-Variabilität

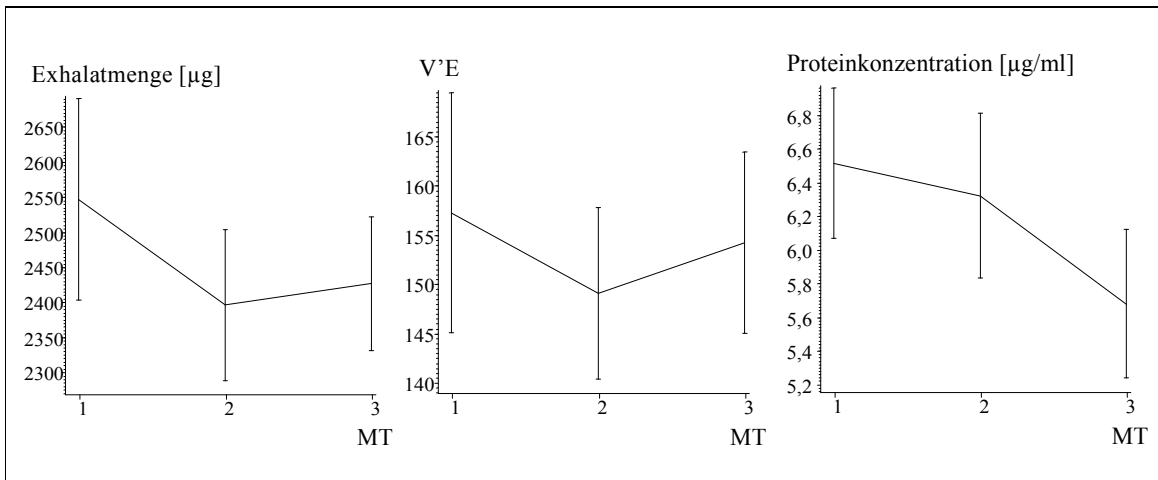
Während der drei Untersuchungstermine mit jeweiliger Bestimmung von Exhalatmenge,  $V'E$  und Protein im Exhalat fand sich kein zeitlicher Trend im Sinne einer einheitlichen Zu- oder Abnahme der drei Exhalatparameter. Eine Rangvarianzanalyse nach Friedman ergab ein  $p = 0,96$  für die Exhalatmenge,  $p = 0,96$  für  $V'E$  und  $p = 0,40$  für das Protein im Exhalat.

Anschließend wurden von allen Exhalatparametern über die drei Messtage Mittelwerte und Streuungen, sowie ihre jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen, berechnet:

	Mittel über 3 Tage		Streuung über 3 Tage	
	MW	ST	MW	ST
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2456,9	232,1	368,9	183,8
V'E [l]	153,6	21,6	27,7	22,9
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	6,172	1,114	1,335	0,784

**Tabelle 5.** Alle 14 Probanden der Studie: Werte des Exhalats, gemittelt über drei Tage. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.)

Man erkennt deutliche Schwankungen der Mittelwerte aller Exhalatparameter bei gleichzeitig recht hohen Standardabweichungen über die drei Messtage. Auch die Mittelwerte und Standardabweichungen der Streuungen selbst variieren ganz erheblich. Um die Schwankungen der Messwerte im Laufe des Messzeitraums zu veranschaulichen, wurde Abbildung 5 angefügt:



**Abbildung 5.** Alle Probanden ( $n = 14$ ): Exhalatparameter (mit Standardabweichung für jeden Messtermin) über die drei Messtage. MT = Messtag, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.)

## **4.3 Exhalatparameter von Probanden und Patienten**

### **4.3.1 Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung**

Für die Patienten wurden ebenfalls Probitanalysen zur Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung der drei Exhalatparameter (jeweils bei 0 und bei 50Gy), sowie der Differenzen der 50- und 0Gy-Werte von Exhalatmenge, V'E und Proteinkonzentration im Exhalat, durchgeführt.

Analog zu den Verhältnissen bei den Probanden zeigten alle untersuchten Variablen im Patientenkollektiv eine erhebliche Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung.

Für V'E bei 0Gy und die Differenz von V'E zwischen 0 und 50Gy sind im Patientenkollektiv t-Test, Varianzanalyse und Produkt-Moment-Korrelation nicht mehr zuverlässig; auch in diesem Abschnitt wurden deshalb ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet.

### **4.3.2 Exhalat und demographische Daten**

Hier wurde auf Abhängigkeiten der Messwerte des ersten und des zweiten Messtermins, sowie der Differenzwerte der Exhalatparameter zwischen dem ersten und dem zweiten Messtermin (Probanden) bzw. dem 0- und 50Gy-Wert (Patienten) von Geschlecht (Tab. 6, 7 und 8), sowie Alter (Tab. 9 und 11), Gewicht, Körpergröße und Body-Mass-Index (Tab. 9, 10 und 11) getestet. Es wurden das Gesamtkollektiv (n = 28, Tab. 6 und 9) und die beiden Teilkollektive der Probanden (Tab. 7 und 10) und der Patienten (Tab. 9 und 11) untersucht. Auf Altersunterschiede wurde nur im Gesamtkollektiv und bei den Patienten getestet, weil das Probandenkollektiv eine sehr enge Altersspanne aufweist (siehe auch Kapitel 4.1.2).

#### 4.3.2.1 Exhalat und Geschlecht

	Geschlecht				p
	männlich (n = 19)		weiblich (n = 9)		
	MW	ST	MW	ST	
<b>Werte am 1. MT</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2740,4	452,4	2385,2	494,6	0,085
V'E [l]	169,3	48,4	149,3	41,0	0,18
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	7,557	3,242	7,544	1,933	0,81
<b>Werte am 2. MT</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2851,9	587,0	2367,4	409,4	0,029*
V'E [l]	177,6	50,6	144,0	24,0	0,037*
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	11,194	18,887	8,839	6,288	0,89
<b>Exhalatparameter (<math>\Delta 2./1.\text{MT}</math>)</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	111,6	556,5	-17,8	627,0	0,47
V'E [l]	8,4	34,7	-5,3	51,0	0,38
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	3,638	17,686	1,295	5,591	0,00034***

**Tabelle 6. Alle 28 Teilnehmer der Studie: Parameter des Exhalats am 1. und 2. Messtermin, der Differenzwerte des Exhalats (vom ersten zum zweiten Messtermin bzw. von 0 zu 50Gy), sowie die Standardabweichung der beiden Messwiederholungen. MT = Messtermin,  $\Delta 2./1.\text{MT}$  = Differenzwert 2.Messtermin – 1.Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.) , MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.**

Im Gesamtkollektiv aller untersuchten Personen war die Exhalatmenge an beiden Messterminen bei den Frauen kleiner als bei den Männern, dieser Unterschied war am zweiten Termin sogar signifikant. Der Anstieg der Exhalatmenge vom ersten zum zweiten Messtermin zeigte jedoch keinen signifikanten geschlechtsbezogenen Unterschied (trotz Zunahme bei den Männern und Abnahme bei den Frauen); Analoges gilt für das V'E. Bei den Frauen ist das V'E am zweiten Messtermin signifikant niedriger als bei den Männern, während sich für die Änderung des V'E vom ersten zum zweiten Messtermin keinerlei Unterschied zeigt (trotz leichter Zunahme bei den männlichen und leichter Abnahme bei den weiblichen Teilnehmern der Studie).

Für die Konzentration an Protein im Exhalat findet sich am ersten und zweiten Messtermin keinerlei Unterschied zwischen den Männern und den Frauen. Der Anstieg der

Proteinkonzentration vom ersten zum zweiten Messtermin ist jedoch bei den Männern signifikant höher als bei den Frauen (vgl. Tabelle 8).

	Geschlecht				p
	männlich (n = 8)		weiblich (n = 6)		
	MW	ST	MW	ST	
<b>Werte am 1. MT</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2625,9	530,6	2441,7	577,6	0,75
V'E [l]	159,8	47,5	154,0	46,8	0,90
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	6,572	2,015	6,437	1,232	0,75
<b>Werte am 2. MT</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2547,5	454,9	2195,5	222,3	0,34
V'E [l]	160,9	36,9	133,5	18,9	0,11
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	6,187	2,025	6,499	1,702	0,75
<b>Exhalatparameter (<math>\Delta 2./1.\text{MT}</math>)</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	-78,4	492,9	-246,2	494,1	0,48
V'E [l]	1,1	47,6	-20,5	48,0	0,41
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	-0,384	1,249	0,062	1,124	0,41

**Tabelle 7. Alle 14 Probanden:** Parameter des Exhalats am 1. und 2. Messtermin, der Differenzwerte des Exhalats (vom ersten zum zweiten Messtermin), sowie die Standardabweichung der beiden Messwiederholungen, im Vergleich der Geschlechter. MT = Messtermin,  $\Delta 2./1.\text{MT}$  = Differenzwert 2. Messtermin – 1. Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Bei den Probanden finden sich an beiden Untersuchungsterminen und bezüglich der Differenzwerte dieser beiden Termine keinerlei signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich aller untersuchten Exhalatparameter, obwohl V'E und Exhalatmenge bei den weiblichen Probanden vom ersten zum zweiten Messtag stärker sinken als bei den männlichen und die Proteinkonzentration der Männer leicht ab-, die der Frauen dagegen leicht zunimmt.

	Geschlecht				p
	männlich		weiblich		
	(n = 11)		(n = 3)		
	MW	ST	MW	ST	
<b>Werte am 1. MT</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2823,6	391,4	2272,3	340,3	0,085
V'E [l]	176,2	50,2	140,0	32,7	0,23
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	8,273	3,839	9,759	0,346	0,30
<b>Werte am 2. MT</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	3073,4	589,3	2711,3	530,0	0,30
V'E [l]	189,8	57,2	165,0	20,8	0,67
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	14,836	24,589	13,520	10,082	0,67
<b>Exhalatparameter (<math>\Delta 2./1.MT</math>)</b>					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	249,7	581,0	439,0	702,0	0,89
V'E [l]	13,6	22,4	25,0	50,5	0,67
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	6,563	23,229	3,761	10,402	0,0045**

**Tabelle 8.** Alle 14 Patienten: Parameter des Exhalats am 1. und 2. Messtermin, der Differenzwerte des Exhalats (von 0 zu 50Gy), sowie die Standardabweichung der beiden Messwiederholungen, im Vergleich der Geschlechter. MT = Messtermin,  $\Delta 2./1.MT$  = Differenzwert 2. Messtermin (50Gy) – 1. Messtermin (0Gy), V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Bei den Patienten sind hinsichtlich Exhalatmenge, V'E und Proteinkonzentration im Exhalat an beiden Messterminen keinerlei Unterschiede zwischen Männern und Frauen zu erkennen, dies gilt auch für Exhalatmenge und V'E im Laufe der Strahlentherapie.

Das Patientenkollektiv zeigt jedoch bei den Differenzwerten von 0Gy zu 50Gy einen deutlichen Unterschied zwischen den Geschlechtern bezüglich der Proteinkonzentration im Exhalat; die Männer zeigten hier einen signifikant stärkeren Anstieg der Werte vom ersten zum zweiten Messtermin.

Zusammen mit dem Ergebnis aus Tab. 11 (keine Signifikanz bei den Probanden diesbezüglich) zeichnen die Patienten damit maßgeblich für den beim Gesamtkollektiv signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration im Exhalat verantwortlich.



### 4.3.2.2 Exhalat, Alter und Körpermaße

	Alter [a]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
	rho p	rho p	rho p	rho p
<b>Werte am 1. MT</b>				
Exhalatmenge [µg]	0,18 0,36	0,21 0,27	0,41 0,031*	0,40 0,035*
V'E [l]	0,13 0,52	0,20 0,30	0,43 0,022*	0,44 0,021*
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,34 0,076	-0,16 0,42	-0,04 0,85	0,08 0,68
<b>Werte am 2. MT</b>				
Exhalatmenge [µg]	0,61 0,0006***	0,12 0,55	0,35 0,067	0,39 0,038*
V'E [l]	0,37 0,052	0,26 0,18	0,44 0,019*	0,34 0,076
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,38 0,045*	-0,11 0,56	0,06 0,78	0,27 0,17
<b>Exhalatparameter (Δ2./1.MT)</b>				
Exhalatmenge [µg]	0,37 0,054	-0,04 0,85	0,04 0,83	0,09 0,64
V'E [l]	0,32 0,10	0,12 0,55	0,22 0,27	0,16 0,43
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,08 0,67	0,03 0,90	0,14 0,49	0,23 0,25

**Tabelle 9.** Korrelationsuntersuchung *aller Teilnehmer* der Studie ( $n = 28$ ): Parameter des Exhalats am 1. und 2. Messtermin, sowie der Differenzwerte des Exhalats (vom ersten zum zweiten Messtermin bzw. von 0 zu 50Gy), im Vergleich von Alter, Körpergröße, Gewicht und Body-Mass-Index. BMI = Body-Mass-Index, MT = Messtermin, Δ2./1.MT = Differenzwert 2. Messtermin – 1. Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.) , MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation). p aus der Spearman'schen Korrelation.

An beiden Messterminen konnte mehr Exhalat gewonnen werden, je älter die Studienteilnehmer waren; auch stieg die Exhalatmenge vom ersten zum zweiten Messtermin um so stärker an, je älter die untersuchten Personen waren; am zweiten Messtermin war dieser Zusammenhang sogar signifikant. Die Exhalatmenge aller untersuchten Personen nimmt außerdem mit höherem Lebensalter, steigender Körpergröße, höherem Gewicht und größerem Body-Mass-Index an beiden Messterminen (0 und 50Gy bzw. erste und zweite Messung) zu, wobei für den jeweils ersten Messtermin für Gewicht und BMI, für den zweiten Messtermin nur für den BMI, eine signifikant höhere Menge an Exhalat mit zunehmendem Körpergewicht und steigendem BMI, gewonnen werden konnte. Der Anstieg der Exhalatmenge vom ersten

zum zweiten Termin ist dagegen nahezu gleich bleibend, egal wie groß und schwer die Personen sind und welchen BMI sie haben.

Im Gesamtkollektiv nimmt V'E bei 0 und 50Gy (Patienten), beziehungsweise an den beiden ersten Messterminen (Probanden), sowie bezüglich deren jeweiliger Änderung (hier allerdings deutlich schwächer ausgeprägt), zu, je älter, größer und schwerer die jeweils untersuchte Person und je höher ihr BMI ist. Ein signifikanter Anstieg des V'E ist für den jeweils ersten Messtermin bei höheren Werten für Körpergewicht und BMI, am jeweils zweiten Messtermin nur bei höherem BMI, zu erkennen.

Die durchschnittliche Proteinkonzentration im Exhalat liegt an beiden Messterminen und bezüglich deren Änderung umso höher, je älter der Untersuchte ist; dieses Ergebnis war am zweiten Messtermin sogar signifikant. Sie nimmt am ersten Messtermin geringfügig ab, je größer die jeweilige Person ist, dabei ist sie aber von Größe und BMI des Untersuchten nahezu unabhängig. Am zweiten Messtermin findet sich ebenfalls eine leichte Abnahme der Proteinkonzentration des Exhalats, je größer die Personen sind; mit steigendem Gewicht ändert sich an diesem Messtermin die Proteinkonzentration kaum, während mit einem höheren BMI wiederum eine leichte Zunahme des Proteins im Exhalat verbunden ist. Die Konzentration an Protein im Exhalat vom jeweils ersten zum zweiten Messtermin ändert sich kaum mit zunehmender Körpergröße und nimmt mit steigendem Gewicht und BMI etwas zu.

	Größe [cm]		Gewicht [kg]		BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	
	rho	p	rho	p	rho	p
<b>Werte am 1. MT</b>						
Exhalatmenge [µg]	0,05	0,88	0,30	0,38	0,24	0,48
V'E [l]	-0,01	0,97	0,21	0,53	0,13	0,71
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,00	1,0	0,07	0,83	-0,08	0,82
<b>Werte am 2. MT</b>						
Exhalatmenge [µg]	0,24	0,48	0,22	0,53	0,06	0,87
V'E [l]	0,53	0,053	0,35	0,30	0,10	0,77
Protein im Exhalat [µg/ml]	-0,15	0,66	-0,00	0,99	-0,05	0,89
<b>Exhalatparameter (Δ2./1.MT)</b>						
Exhalatmenge [µg]	0,21	0,54	0,09	0,79	0,05	0,88
V'E [l]	0,48	0,17	0,30	0,38	0,20	0,56
Protein im Exhalat [µg/ml]	-0,14	0,68	0,02	0,95	0,14	0,68

**Tabelle 10.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Probanden**: Parameter des Exhalats am 1. und 2. Messtermin, sowie der Differenzwerte des Exhalats (vom ersten zum zweiten Messtermin), im Vergleich von Körpergröße, Gewicht und Body-Mass-Index. Im Gegensatz zu den Patienten ist ein Vergleich mit dem Alter wegen der geringen Altersspanne im Probandenkollektiv (siehe oben) nicht sinnvoll. BMI = Body-Mass-Index, MT = Messtermin, Δ2./1.MT = Differenzwert 2. Messtermin – 1. Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.) , MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation). p aus der Spearman'schen Korrelation.

Im Probandenkollektiv ist die jeweils gewonnene Exhalatmenge am ersten Untersuchungstermin von der Körpergröße nahezu unabhängig, während sie mit steigendem Gewicht und BMI etwas zunimmt. Am zweiten Untersuchungstag steigt sie etwas an, je größer und schwerer die Probanden sind, dafür ist sie hier aber vom BMI nahezu unabhängig. Dadurch ergibt sich für die Veränderung der Exhalatmenge vom ersten zum zweiten Messtermin, dass diese etwas größer ausfällt, je größer der Proband ist, dass sie aber von Gewicht und BMI fast unabhängig ist.

Das V'E der Probanden ist am ersten Untersuchungstermin fast unabhängig von der Körpergröße, während es mit steigendem Körpergewicht und höherem BMI zunimmt. Am zweiten Messtermin nimmt das V'E dagegen deutlich zu, je größer die Probanden sind; an diesem Messtermin ist V'E auch größer, je schwerer der jeweilige Proband und je höher sein BMI ist. Demzufolge nimmt V'E vom ersten zum zweiten Messtermin insgesamt zu, je größer

die Probanden sind; auch höheres Gewicht und ein größerer BMI sind mit einer Zunahme des V'E verbunden.

Die Proteinkonzentration im Exhalat ist am ersten Untersuchungstermin nahezu unabhängig von Größe, Gewicht und BMI der jeweils untersuchten Person. Am zweiten Messtag ist eine leichte Abnahme der Proteinkonzentration zu erkennen, je größer der Proband ist, aber analog zum ersten Messtermin ist die Proteinkonzentration auch hier nahezu unabhängig von Gewicht und BMI des Untersuchten. Die Konzentration von Protein im Exhalat nimmt vom ersten zum zweiten Messtermin diskret ab, je größer der Proband ist; sie verändert sich dagegen in keinerlei Weise, egal wie schwer der Untersuchte auch sein mag; sie nimmt allerdings mit steigendem BMI der untersuchten Personen wiederum geringfügig zu.

	Alter [a]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
	rho p	rho p	rho p	rho p
<b>Werte am 1. MT</b>				
Exhalatmenge [µg]	0,22 0,52	0,53 0,051	0,48 0,17	0,38 0,27
V'E [l]	0,19 0,57	0,51 0,065	0,68 0,0072**	0,66 0,0095**
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,02 0,94	-0,25 0,46	-0,37 0,29	-0,35 0,31
<b>Werte am 2. MT</b>				
Exhalatmenge [µg]	0,25 0,47	0,40 0,24	0,23 0,49	0,14 0,68
V'E [l]	-0,05 0,88	0,24 0,49	0,46 0,18	0,44 0,20
Protein im Exhalat [µg/ml]	0,34 0,32	-0,14 0,69	-0,10 0,78	-0,02 0,96
<b>Exhalatparameter (Δ2./1.MT)</b>				
Exhalatmenge [µg]	0,02 0,95	-0,16 0,64	-0,11 0,74	-0,04 0,91
V'E [l]	-0,08 0,81	-0,30 0,38	-0,14 0,68	-0,03 0,92
Protein im Exhalat [µg/ml]	-0,07 0,84	-0,04 0,91	0,12 0,72	0,15 0,65

**Tabelle 11.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten**: Parameter des Exhalats am 1. und 2. Messtermin, sowie der Differenzwerte des Exhalats (von 0 zu 50Gy), im Vergleich von Alter, Körpergröße, Gewicht und Body-Mass-Index. BMI = Body-Mass-Index, MT = Messtermin, Δ2./1.MT = Differenzwert 2. Messtermin (50Gy) – 1. Messtermin (0Gy), V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.) , MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation). p aus der Spearman'schen Korrelation.

Bei den Patienten der Studie konnte sowohl bei 0Gy, als auch bei 50Gy, umso mehr Exhalat gewonnen werden, je älter, größer und schwerer die untersuchte Person und je größer ihr Body-Mass-Index war. Dabei nahm die je Proband gewonnene Exhalatmenge im Laufe der Strahlentherapie bei steigender Körpergröße und mit höherem Gewicht etwas ab, sie war vom Alter und BMI der Untersuchten allerdings fast unabhängig.

Das V'E der Patienten lag bei 0Gy um so höher, je älter die untersuchte Person war; nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy und bezüglich der individuellen Veränderung im Laufe der Strahlentherapie war es dagegen vom Alter in keiner Weise abhängig. Dafür nahm es an beiden Messterminen umso mehr zu, je größer und schwerer die Patienten waren und je größer ihr BMI war, der Anstieg des V'E mit zunehmendem Gewicht und BMI war am ersten Messtermin sogar signifikant. Während der Strahlentherapie sieht man eine Abnahme des V'E, je größer und schwerer die Patienten waren. Trotzdem war im Patientenkollektiv die Veränderung des V'E während des Untersuchungszeitraums in keiner Weise abhängig vom BMI.

Bei den Patienten vor Beginn der Strahlentherapie war die Proteinkonzentration im Exhalat um so geringer, je größer und schwerer der jeweilige Patient war und je höher sein BMI lag; vom jeweiligen Alter fand sich keinerlei Abhängigkeit. Nach Bestrahlung mit 50Gy war die Konzentration von Protein im Exhalat zwar ebenfalls um so geringer, je größer und schwerer der Patient war, sie war vom BMI aber nahezu unabhängig und lag mit steigendem Patientenalter höher. Für die Veränderung der Proteinkonzentration ist zu erkennen, dass sie zwar fast unabhängig vom Alter und von der Körpergröße des Patienten ist, mit steigendem Gewicht und höherem BMI jedoch zunimmt.

#### **4.3.3 Änderung der Exhalatparameter vom ersten zum zweiten Messtermin, erster Vergleich zwischen Probanden und Patienten**

An dieser Stelle muss zunächst geklärt werden, ob es einen statistischen Unterschied macht, wenn bei den Probanden die Differenzwerte der Exhalatparameter aus den Werten des ersten und zweiten, zweiten und dritten oder ersten und dritten Messtages gebildet werden; es folgt also eine Untersuchung der Änderungen für jeden einzelnen Parameter.

##### **1. Exhalat-Menge:**

Der Abfall der Exhalat-Menge vom ersten ( $2546,9 \pm 537,5\mu\text{g}$ ) zum zweiten Messtag ( $2396,6 \pm 403,9\mu\text{g}$ ) setzt sich bei der dritten Messung ( $2427,1 \pm 355,1\mu\text{g}$ ) nicht fort, es kommt sogar

zu einem leichten Wiederanstieg. Weder die Unterschiede erster - zweiter oder zweiter - dritter Messtag, noch der Unterschied der Differenzen ist signifikant (immer  $p > 0,5$  im Wilcoxon-Test). Man kann aber nicht sagen, dass Probanden mit einem stärkeren Abfall vom ersten zum zweiten Messtermin auch einen stärkeren Wiederanstieg vom zweiten zum dritten Messtag hätten ( $p = 0,70$  in der Spearman'schen Rangkorrelation).

Die Korrelation der Exhalatmenge bei der zweiten Messung mit der dritten ist signifikant ( $\rho = 0,70$  mit  $p = 0,0052^{**}$  in der Spearman'schen Rangkorrelation) und auch enger, als die der ersten mit der zweiten ( $\rho = 0,59$  mit  $p = 0,027^*$  in der Spearman'schen Rangkorrelation). Für einen Vergleich der beiden Korrelationen steht nur der parametrische Test nach Olkin und Siotani auf Gleichheit von zwei Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten zur Verfügung. Dieser zeigt keinen signifikanten Unterschied der beiden Korrelationen ( $p = 0,14$ ).

Wenn die Exhalatmenge vom ersten zum zweiten Messtag fällt, vom zweiten zum dritten wieder etwas steigt und der Unterschied nicht signifikant ist, dann kann die Änderung der Exhalatmenge vom ersten zum dritten Messtermin erst recht nicht signifikant sein.

## **2. V'E:**

V'E verhält sich ähnlich wie die Exhalatmenge. Es kommt zu einem Wiederanstieg von der zweiten auf die dritte Messung; der Wiederanstieg scheint hier sogar noch deutlicher. Weder die Unterschiede erster ( $157,3 \pm 45,51$ ) - zweiter ( $149,1 \pm 32,71$ ) oder zweiter - dritter Messtag ( $154,3 \pm 34,41$ ), noch der Unterschied der Differenzen ist signifikant (immer  $p > 0,5$  im Wilcoxon-Test).

Auch hier findet sich keinerlei Zusammenhang zwischen dem Abfall vom ersten auf den zweiten und dem Anstieg vom zweiten auf den dritten Messtermin ( $p = 0,95$  in der Spearman'schen Rangkorrelation).

Die Korrelation von V'E bei der zweiten Messung mit der dritten ist signifikant ( $\rho = 0,76$  mit  $p = 0,0017^{**}$  in der Spearman'schen Rangkorrelation) und enger, als die der ersten mit der zweiten ( $\rho = 0,42$  mit  $p = 0,025^*$  in der Spearman'schen Rangkorrelation). Für einen Vergleich der beiden Korrelationen zeigt der Test nach Olkin und Siotani keinen signifikanten Unterschied der beiden Korrelationen ( $p = 0,11$ ).

## **3. Protein im Exhalat:**

Protein im Exhalat verhält sich anders als die beiden Mengen-Parameter. Hier setzt sich der Abwärts-Trend fort, er verstärkt sich dabei sogar. Weder die Unterschiede erste ( $6,514 \pm$

1,666µg/ml) - zweite (6,321 ± 1,830µg/ml) oder zweite - dritte Messung (5,681 ± 1,647µg/ml), noch der Unterschied der Differenzen ist aber signifikant (immer  $p > 0,5$  im Wilcoxon-Test). Da sich die Abnahmen im Verlauf der Messungen verstärken, ist der Unterschied zwischen der ersten und dritten Messung größer, aber immer noch nicht signifikant ( $p = 0,18$  im Wilcoxon-Test).

Hier zeigt sich eine gegensinnige Abhängigkeit der Abnahmen ( $\rho = -0,55$ ,  $p = 0,043^*$  in der Spearman'schen Rangkorrelation): Probanden, die bei der zweiten Messung viel weniger Protein im Exhalat hatten als bei der ersten, zeigen von der zweiten auf die dritte Messung eine besonders geringe Abnahme; dies ist auch signifikant.

Die Beziehung zwischen den Werten für Protein im Exhalat zwischen erstem und zweitem Messtag ist enger ( $\rho = 0,53$  mit  $p = 0,0040^{**}$  in der Spearman'schen Rangkorrelation), als die zwischen zweitem und drittem Messtermin ( $\rho = 0,18$  mit  $p = 0,59$  in der Spearman'schen Rangkorrelation); die letztere ist damit nicht einmal signifikant. Der Olkin-Test findet wieder keinen Unterschied zwischen den beiden Korrelationen ( $p = 0,67$ ).

Um insgesamt eine möglichst weitgehende Standardisierung und Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden in den folgenden Abschnitten bei den Probanden stets Differenzen aus den Werten des ersten und zweiten Messtermins für Vergleiche mit den Patienten herangezogen.

#### 4.3.3.1 Vergleich der beiden Kollektive

Zunächst wurden die Änderungen der drei Exhalatparameter bei allen 14 Probanden im Vergleich vom ersten zum zweiten Messtermin (Tab. 12a) und bei allen 14 Patienten im Vergleich der Verhältnisse vor Beginn der Strahlentherapie gegenüber denjenigen bei 50Gy (Tab. 12b) im Wilcoxon-Test untersucht:

	<b>Probanden</b>				p
	1. Messtermin		2. Messtermin		
	MW	ST	MW	ST	
Exhalatmenge [µg]	2546,9	537,5	2396,6	403,9	0,41
V'E [l]	157,3	45,5	149,1	32,7	0,90
Protein im Exhalat [µg/ml]	6,514	1,666	6,321	1,830	0,75

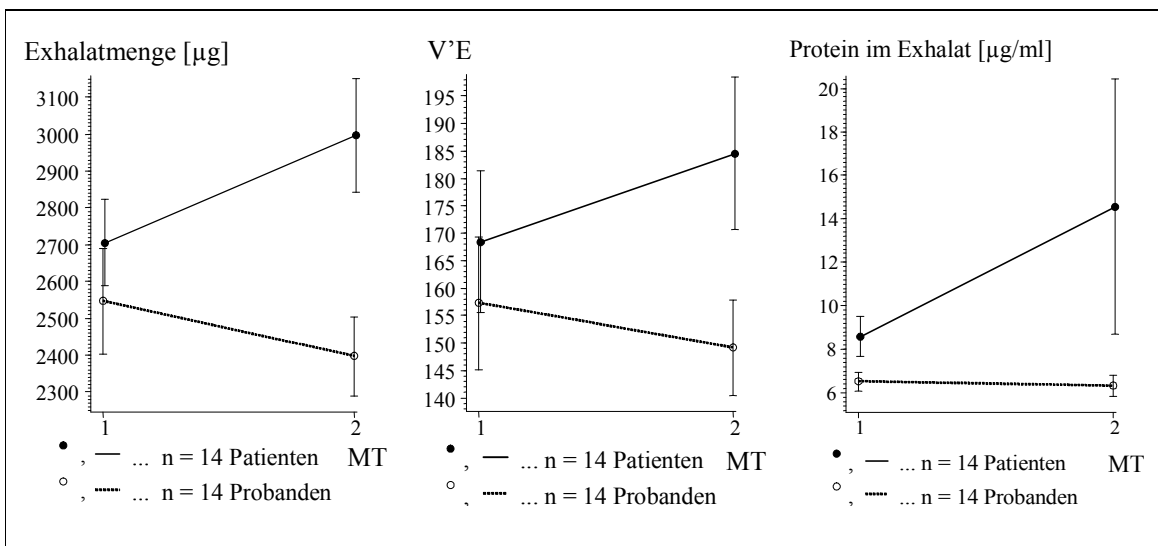
**Tabelle 12a.** Parameter des Exhalats der **Probanden** ( $n = 14$ ) im Vergleich vom ersten zum zweiten Messtermin. V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min). p aus dem Wilcoxon-Test.

	Patienten				p
	0Gy		50Gy		
	MW	ST	MW	ST	
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2705,5	436,741	2995,8	578,0	0,15
V'E [l]	168,4	48,4	184,5	51,9	0,055
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	8,591	3,429	14,554	21,932	0,71

**Tabelle 12b.** Parameter des Exhalats der **Patienten** ( $n = 14$ ) vor Strahlentherapie und nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy. V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min). p aus dem Wilcoxon-Test.

Für alle drei Parameter fand sich weder für die Probanden im Vergleich vom ersten zum zweiten Messtermin, noch für die Patienten im Laufe der Therapie eine signifikante Änderung der Exhalatparameter. Selbst die Zunahme des V'E um ca. 16l und der Proteinkonzentration auf das ca. 1,7-fache bei den Patienten ist nicht signifikant.

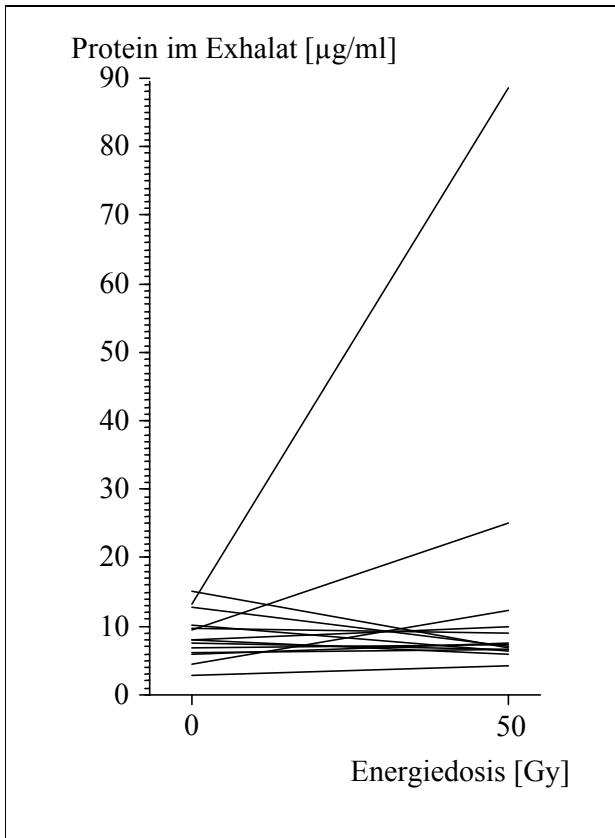
Allerdings ist auffällig, dass alle drei Exhalatparameter bei den Probanden leicht abnehmen oder unverändert bleiben, während sie bei den Patienten zunehmen:



**Abbildung 6.** Veränderungen der drei Exhalatparameter (mit Standardabweichung für jeden Messtag) vom ersten zum zweiten Messtermin (**Probanden:** 1. und 2. Messtag, **Patienten:** Werte bei 0 und 50Gy). MT = Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.).

Auffallend sind besonders die großen Varianzen der Proteinkonzentration im Exhalat der Patienten nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy; diese werden im Wesentlichen durch zwei Patienten verursacht, bei denen die Proteinkonzentration im Laufe der Therapie überdurchschnittlich stark ansteigt:





*Abbildung 7. Änderung der Proteinkonzentration im Exhalat der Patienten im Laufe der Strahlentherapie*

Es ist jedoch festzustellen, dass diese beiden Patienten nicht zu den insgesamt vier Patienten gehören, die während oder nach der Strahlentherapie eine Pneumonitis mindestens zweiten Grades entwickelten.

Um eine Abschätzung des Unterschiedes von Probanden und Patienten vom ersten zum zweiten Messtag bzw. im Laufe der Strahlentherapie zu ermöglichen, wurden im folgenden Abschnitt für die Veränderungen der drei Exhalatparameter Mittelwert und Median (stabiler), sowie die 95%-Vertrauensbereiche der Einzelwerte und des Mittelwertes bzw. des Medians, berechnet.

#### **4.3.3.1.1 Änderungen der Exhalatparameter der Probanden**

Zunächst wurden für das Probandenkollektiv der Vertrauensbereich der Differenzen der drei Exhalatparameter vom ersten zum zweiten Messtag, das 95%-Vertrauensintervall der Einzelwerte und das 95%-Vertrauensintervall des Mittelwertes, errechnet:

<b>Probanden</b>			
Änderung der Werte vom ersten zum zweiten Messtag			
	<b>Mittelwert</b>	95%-Vertrauensbereich der Einzelwerte	95%-Vertrauensbereich des Mittelwerts
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	-150,3	-1094,6 bis 794,1	-402,7 bis 102,1
V'E [l]	-8,1	-100,7 bis 84,4	-32,9 bis 16,6
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	-0,193	-2,49 bis 2,10	-0,80 bis 0,42

**Table 13a.** Alle 14 Probanden der Studie: Änderungen der Parameter des Exhalats vom ersten Messtermin zu den entsprechenden Werten am zweiten Messtermin. Mittelwert, 95%-Vertrauensbereiche der Einzelwerte sowie 95%-Vertrauensbereich des Mittelwerts.

Da doch einige Ausreißer unter den Probandenwerten waren, wurde der - gegenüber Ausreißerwerten stabilere - Median der Differenz mit dem 95%-Vertrauensintervall der Einzelwerte und dem 95%-Vertrauensintervall des Medians berechnet:

<b>Probanden</b>			
Änderung der Werte vom ersten zum zweiten Messtag			
	<b>Median</b>	95%-Vertrauensbereich der Einzelwerte	95%-Vertrauensbereich des Medians
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	-31,0	-1119,8 bis 457,4	-330,5 bis 186,2
V'E [l]	0,0	-107,7 bis 58,5	-17,8 bis 17,0
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	-0,027	-2,240 bis 1,322	-0,793 bis 0,607

**Table 13b.** Alle 14 Probanden der Studie: Änderungen der Parameter des Exhalats vom ersten Messtermin zu den entsprechenden Werten am zweiten Messtermin. Mittelwert, 95%-Vertrauensbereiche der Einzelwerte sowie 95%-Vertrauensbereich des Mittelwerts.

Bei den Probanden zeigten 95% vom ersten zum zweiten Messtermin Veränderungen der Exhalatmenge zwischen einem Abfall von ca.  $1100\mu\text{g}$  und einem Anstieg bis ca.  $460\mu\text{g}$ , des V'E zwischen einem Abfall um ca. 110l und einem Anstieg bis ca. 60l und der Proteinkonzentration zwischen einem Abfall um ca.  $2,2\mu\text{g/ml}$  und einem Anstieg bis ca.  $1,3\mu\text{g/ml}$ .

Bei Messungen von entsprechenden Probanden wird man in 95% der Probanden-Kollektive eine mediane Veränderung der Exhalatmenge zwischen einem Abfall von höchstens  $331\mu\text{g}$  und einem Anstieg von höchstens  $186\mu\text{g}$ , des V'E zwischen einem Abfall von höchstens 18l und einem Anstieg von höchstens 17l, sowie der Proteinkonzentration im Exhalat zwischen einem Abfall von höchstens  $0,79\mu\text{g/ml}$  und einem Anstieg von höchstens  $0,61\mu\text{g/ml}$  zu erwarten haben.

#### 4.3.3.1.2 Änderungen der Exhalatparameter der Patienten

Im Folgenden wurde von allen 14 Patienten der Vertrauensbereich der Differenzen der drei Exhalatparameter für die Strahlentherapie bestimmt:

<b>Patienten</b>			
Änderung der Werte von 0Gy zu 50Gy			
	<b>Mittelwert</b>	95%-Vertrauensbereich der Einzelwerte	95%-Vertrauensbereich des Mittelwerts
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	290,3	-855,9 bis 1436,4	-16,0 bis 596,6
V'E [l]	16,1	-39,4 bis 71,6	1,23 bis 30,9
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	5,962	-34,82 bis 46,75	-4,93 bis 16,86

**Tabelle 14a.** Alle 14 **Patienten** der Studie: Änderungen der Parameter des Exhalats von vor der Bestrahlung (bei 0Gy), zu den entsprechenden Werten nach Bestrahlung mit insgesamt 50Gy. Mittelwert, 95%-Vertrauensbereiche der Einzelwerte sowie 95%-Vertrauensbereich des Mittelwerts.

Auch hier waren einige Ausreißer unter den Patientenwerten, deshalb wurde wieder der Median der Differenz mit dem 95%-Vertrauensintervall der Einzelwerte und dem 95%-Vertrauensintervall des Medians berechnet:

<b>Patienten</b>			
Änderung der Werte von 0Gy zu 50Gy			
	<b>Median</b>	95%-Vertrauensbereich der Einzelwerte	95%-Vertrauensbereich des Medians
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	103,5	-301,2 bis 1484,9	-216,3 bis 597,0
V'E [l]	11,3	-20,1 bis 75,6	1,5 bis 21,5
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,441	-7,411 bis 56,023	-2,386 bis 2,970

**Tabelle 14b.** Alle 14 **Patienten** der Studie: Änderungen der Parameter des Exhalats von vor der Bestrahlung (bei 0Gy), zu den entsprechenden Werten nach einer Bestrahlung mit insgesamt 50Gy. Median, 95%-Vertrauensbereiche der Einzelwerte sowie 95%-Vertrauensbereich des Medians.

95% der Patienten wiesen nach der Bestrahlung Veränderungen der Exhalatmenge zwischen einem Abfall um ca. 300 $\mu\text{g}$  und einem Anstieg bis ca. 1485 $\mu\text{g}$ , des V'E zwischen einem Abfall um ca. 20l und einem Anstieg bis ca. 80l und der Proteinkonzentration zwischen einem Abfall um ca. 7,4 $\mu\text{g/ml}$  und einem Anstieg bis ca. 56,0 $\mu\text{g/ml}$  auf. Bei vergleichbaren

Bestrahlungsbehandlungen wird man in 95% der Patienten-Kollektive eine mediane Veränderung der Exhalatmenge zwischen einem Abfall von höchstens 216µg und einem Anstieg von höchstens 597µg, des V'E zwischen einem Abfall von höchstens 1,5l und einem Anstieg von höchstens 22l, sowie der Proteinkonzentration im Exhalat zwischen einem Abfall von höchstens 2,39µg/ml und einem Anstieg von höchstens 2,97µg/ml zu erwarten haben.

Da ja in Kapitel 4.3.3.1 bei zwei Patienten ein enormer Anstieg der Proteinkonzentration im Exhalat während der Strahlentherapie festgestellt wurde, wurde an dieser Stelle nun gleich noch untersucht, inwiefern jene Patienten, welche im Follow-Up eine Pneumonitis mindestens zweiten Grades entwickelt haben, sich von denjenigen ohne Komplikationen unterscheiden:

	<b>Patienten</b>				p
	Entwicklung einer <b>Pneumonitis</b> im Follow-Up (n = 4)		<b>keine Pneumonitis</b> im Follow-Up (n = 10)		
	MW	ST	MW	ST	
Protein im Exhalat [µg/ml] <b>vor</b> Beginn der Strahlentherapie	8,173	4,753	8,759	3,056	0,54
Protein im Exhalat [µg/ml] <b>nach</b> Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy	8,270	2,705	17,067	25,842	0,95
<b>Anstieg</b> des Proteins [µg/ml] im Exhalat während der Therapie	0,098	6,577	8,308	24,286	0,84

**Tabelle 14c.** Alle 14 **Patienten** der Studie: Vergleich der Patienten, welche im Laufe oder als Folge der Strahlentherapie an einer Pneumonitis mindestens zweiten Grades erkrankt sind (n=4), mit denjenigen ohne Komplikationen im Follow-Up (n=10). MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Es wird deutlich, dass sich Anstiege der vier Pneumonitis-Patienten nicht signifikant von denjenigen der zehn Patienten, welche keine Pneumonitis im Laufe oder als Folge der Strahlentherapie entwickeln, unterscheiden.

#### 4.3.3.2 Exhalatparameter am jeweils ersten und zweiten Messtermin, sowie Änderungen der Parameter, im Vergleich der beiden Kollektive

In Tabelle 15 wurden die Messwerte des jeweiligen ersten und zweiten Untersuchungstermins und die Anstiege der drei Exhalatparameter vom ersten zum zweiten Untersuchungstermin bei den Probanden bzw. von 0 zu 50Gy bei den Patienten auf Unterschiede zwischen Probanden und Patienten untersucht.

	Status				p
	Probanden		Patienten		
	MW	ST	MW	ST	
1. Messung bzw. 0Gy					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2546,9	537,5	2705,5	436,7	0,33
V'E [l]	157,3	45,5	168,4	48,4	0,51
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	6,514	1,666	8,591	3,429	0,077
2. Messung bzw. 50Gy					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2396,6	403,9	2995,8	578,0	0,0014**
V'E [l]	149,1	32,7	184,5	51,9	0,029*
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	6,321	1,830	14,554	21,932	0,10
Änderung von der 1. zur 2. Messung					
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	-150,3	481,8	290,3	584,8	0,12
V'E [l]	-8,1	47,2	16,1	28,3	0,15
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	-0,193	1,174	5,962	20,812	0,63

**Tabelle 15.** Vergleich der Parameter des Exhalats und von deren Änderungen vom ersten zum zweiten Messtermin (**Probanden**,  $n = 14$ ) bzw. von vor Strahlentherapie auf nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy (**Patienten**,  $n = 14$ ). V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min). p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Im Vergleich der beiden Kollektive zeigt sich am ersten Untersuchungstermin bzw. bei 0Gy für alle drei Exhalatparameter keinerlei Unterschied zwischen Probanden und Patienten. Am zweiten Untersuchungstermin, beziehungsweise bei 50Gy, erkennt man signifikant höhere Werte der Patienten für die gewonnene Exhalatmenge und das V'E. Die mehr als doppelt so hohe Proteinkonzentration im Exhalat der Patienten gegenüber den Probanden ist dagegen nicht signifikant.

Der Unterschied im Anstieg der Exhalatmenge von 450 $\mu\text{g}$ , des V'E von 24l, sowie der Proteinkonzentration von 6,2 $\mu\text{g/ml}$  vom ersten zum zweiten Messtermin zwischen Patienten

und Probanden ist nicht signifikant. Zwischen den Veränderungen des Proteins im Exhalat fand sich zwischen Patienten- und Probandenkollektiv insgesamt keinerlei Unterschied. Allerdings fällt auf (wie schon oben erwähnt, siehe auch Tabellen 12a und 12b), dass alle drei Exhalatparameter vom ersten zum zweiten Messtermin im Probandenkollektiv abnehmen oder nahezu gleich bleiben, während sie bei den Patienten zunehmen (im Falle des Total-Proteins z. B. bis auf das ca. 1,7fache der Ausgangskonzentration).

#### **4.3.3.3 Änderungen der Exhalatparameter von Probanden und Patienten vom ersten zum zweiten Messtermin im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten**

Zwar fanden sich bei den Probanden im Vergleich des ersten und zweiten Untersuchungstermins in der Spearman'schen Rangkorrelation eine signifikant stärkere Abnahme der Exhalatmenge ( $\rho = -0,60$  und  $p = 0,025^*$ ) und des V'E ( $\rho = -0,55$  und  $p = 0,040^*$ ) bei höheren Ausgangswerten; die Abnahme der Proteinkonzentration im Exhalat für höhere Ausgangskonzentrationen war jedoch nicht signifikant ( $\rho = -0,21$  und  $p = 0,54$ ).

Bei den Patienten bestanden dagegen für keinen der drei Exhalatparameter signifikante Abhängigkeiten der Veränderungen der Parameter von den 50Gy-Werten (bei den jeweils höheren Ausgangswerten Abnahme der Exhalatmenge mit  $\rho = -0,44$  und  $p = 0,20$ , Abnahme des V'E mit  $\rho = -0,14$  und  $p = 0,67$ , sowie Abnahme der Proteinkonzentration im Exhalat mit  $\rho = -0,36$  und  $p = 0,30$ ).

#### **4.3.4 Exhalatparameter von Patienten und Probanden**

Zuletzt wurde noch untersucht, inwiefern die in 4.2 ermittelten Exhalatparameter (Mittelwerte aus den drei Einzelmessungen) der Probanden sich von denjenigen der Patienten vor und nach Bestrahlung unterscheiden.

	<b>Status</b>			
	<b>Patienten</b>		<b>Probanden</b>	
	MW	ST	MW	ST p
<b>Erste Messung (0Gy)</b>				
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2705,5	436,7	2456,9	368,9 0,16
V'E [l]	168,4	48,4	153,6	27,7 0,33
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	8,591	3,429	6,172	1,335 0,029*
<b>Zweite Messung (50Gy)</b>				
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	2995,8	578,0	2456,9	368,9 0,0063**
V'E [l]	184,5	51,9	153,6	27,7 0,045*
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	14,554	21,932	6,172	1,335 0,051

**Tabelle 16.** Vergleich der Parameter des Exhalats der **Patienten** ( $n = 14$ ) vor Strahlentherapie und nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy mit Exhalatparametern, die aus dem Mittel dreier Messungen der **Probanden** ( $n = 14$ ) gewonnen wurden. V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min). MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Man erkennt, dass sich Exhalatmenge und V'E bei den Patienten vor der Radiatio nicht wesentlich von den durchschnittlichen Werten der Probanden unterscheiden; nach Bestrahlung der Patienten mit 50Gy konnte bei diesen signifikant mehr Exhalat als bei den Probanden gewonnen werden bei signifikant höherem V'E. Dies entspricht den Verhältnissen im direkten Vergleich der Patientenwerte mit dem zweiten Wert der Probanden (siehe auch Tabelle 15).

Während die mittlere Proteinkonzentration im Exhalat vor Beginn der Strahlentherapie bei den Patienten signifikant höher ist, als bei den Probanden, ist nach einer Dosis von 50Gy zwar die Proteinkonzentration im Exhalat der Patienten im Durchschnitt mehr als doppelt so hoch wie diejenige im Exhalat der Probanden, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Der Unterschied ist aber sehr viel deutlicher ausgeprägt als beim Vergleich des Anstiegs der Patientenwerte mit dem Anstieg der Proteinkonzentration der Probanden vom ersten zum zweiten Messtag (siehe auch Tabelle 15). Aus der Formel für den t-Test kann man hierbei ausrechnen, dass je Kollektiv mindestens  $n = 22$  vergleichbare Probanden beziehungsweise Patienten, insgesamt also 44 Personen, untersucht werden müssten, um signifikant höhere Konzentrationen an Protein im Exhalat der Patienten nach Strahlentherapie im Vergleich zu den Probanden messen zu können.

## **4.4 Serumparameter von Probanden und Patienten**

Bisher wurden lediglich Exhalatparameter berücksichtigt. In diesem Abschnitt werden nun ausschließlich die Serumparameter auf Zusammenhänge mit demographischen Daten und im Vergleich beider Kollektive getestet.

### **4.4.1 Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung**

Auch für die im Serum bestimmten Parameter Protein und TGF- $\beta$ , sowie für die bei den Patienten errechneten Differenzen der Parameter zwischen 0 und 50Gy, wurden für alle Probanden und alle Patienten Probitanalysen zur Untersuchung auf Gauß'sche Normalverteilung durchgeführt.

Die Messergebnisse für Protein und diejenigen für TGF- $\beta$  im Serum der Probanden, die Werte für Protein im Serum der Patienten bei 0 und bei 50Gy und die Ergebnisse der Konzentrationsdifferenzen von TGF- $\beta$  im Serum der Patienten von 50 und 0Gy zeigten eine wesentliche Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung.

Für die Werte von TGF- $\beta$  im Serum der Patienten bei 0 und bei 50Gy, sowie für die Differenz von Protein im Exhalat der Patienten von 50 und 0Gy sind t-Test, Varianzanalyse und Produkt-Moment-Korrelation nicht mehr zuverlässig; es wurden dementsprechend auch hier ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet.

### **4.4.2 Serumwerte und demographische Daten**

Die Abhängigkeiten der gefundenen Konzentrationen an Protein und TGF- $\beta$  im Serum der Probanden, der Patienten vor Bestrahlung und nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy, sowie der Differenzwerte der Serumkonzentrationen (nur Patienten), von Geschlecht (Tab. 17 und 18), Körpergröße und -gewicht, sowie Body-Mass-Index (Tab. 19 und 20), wurden im folgenden Abschnitt untersucht. Im Patientenkollektiv wurde auch der Einfluss des Alters untersucht.



#### 4.4.2.1 Serumwerte und Geschlecht

	Geschlecht				p
	männlich (n = 8)		weiblich (n = 6)		
	MW	ST	MW	ST	
Protein im Serum [mg/ml]	71,30	4,31	73,29	1,80	0,41
TGF-β im Serum [ng/ml]	42,58	17,53	36,58	14,60	0,41

**Tabelle 17.** Alle 14 **Probanden** der Studie: Serumparameter in Abhängigkeit vom Geschlecht. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Die Proteinkonzentration und die Konzentration an TGF-β im Serum zeigt bei den Probanden keinerlei Abhängigkeit vom Geschlecht der jeweils untersuchten Person.

	Geschlecht				p
	männlich (n = 11)		weiblich (n = 3)		
	MW	ST	MW	ST	
<b>Serumwerte vor Radiatio (0Gy)</b>					
Protein [mg/ml]	72,59	6,33	69,23	6,33	0,46
TGF-β [ng/ml]	31,18	16,09	46,24	27,52	0,67
<b>Serumwerte nach 50Gy</b>					
Protein [mg/ml]	73,77	5,29	68,91	4,28	0,23
TGF-β [ng/ml]	30,97	14,58	37,90	7,71	0,38
<b>Serumwerte (Δ50Gy, 0Gy)</b>					
Protein im Serum [mg/ml]	1,18	4,94	-0,32	3,87	0,89
TGF-β im Serum [ng/ml]	-0,20	26,00	-8,34	19,81	0,38

**Tabelle 18.** Alle 14 **Patienten** der Studie: Serumparameter in Abhängigkeit vom Geschlecht. (Δ50Gy, 0Gy) = Differenz der Werte von 50Gy und 0Gy. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Für die Patientenseren findet sich keinerlei Geschlechtsabhängigkeit der Protein- und der TGF-β-Konzentrationen, weder vor Beginn der Strahlentherapie, noch nach einer Energiedosis von insgesamt 50Gy oder bezüglich der Veränderungen dieser Konzentrationen.

Es fällt lediglich auf, dass bei den weiblichen Patienten die TGF- $\beta$ -Konzentration etwas stärker abnimmt, während bei den Männern keinerlei Änderung erkennbar ist. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant und wegen der geringen Fallzahl von nur 3 Frauen im Patientenkollektiv auch schlecht zu verwerten.

#### 4.4.2.2 Serumwerte, Alter und Körpermaße

Für das Patientenkollektiv wurde die Altersabhängigkeit der Serumwerte untersucht. Hier ergab sich in der Spearman'schen Korrelation keinerlei Abhängigkeit von Protein im Serum vor Beginn der Strahlentherapie ( $p = 0,44$ ) und nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy ( $p = 0,94$ ), sowie TGF- $\beta$  bei 0Gy ( $p = 0,59$ ) und 50Gy ( $p = 0,23$ ); auch bezüglich der Differenzen von Protein ( $p = 0,54$ ) und TGF- $\beta$  ( $p = 0,74$ ) war keinerlei Bezug zum Alter der Untersuchten zu erkennen.

Ferner wurde für beide Kollektive auf Abhängigkeiten der Serumwerte von Größe, Gewicht und Body-Mass-Index getestet:

	Körpergröße [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
	rho p	rho p	rho p
Protein im Serum [mg/ml]	-0,07 0,85	-0,12 0,73	-0,04 0,90
TGF- $\beta$ im Serum [ng/ml]	0,07 0,84	0,16 0,63	0,32 0,35

**Table 19.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Probanden** der Studie: Serumparameter im Vergleich von Körpergröße, Gewicht und Body-Mass-Index. BMI = Body-Mass-Index. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation). p aus der Spearman'schen Korrelation.

Bei den Probanden der Studie ist die Proteinkonzentration im Serum in keinerlei Weise abhängig von Körpergröße und Body-Mass-Index; auch mit zunehmendem Gewicht steigt sie kaum an.

Es findet sich keinerlei Abhängigkeit der Konzentration von TGF- $\beta$  von der Größe der untersuchten Person, während sie mit steigendem Gewicht und BMI etwas zunimmt.

	Körpergröße [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
	rho p	rho p	rho p
Serumwerte vor Radiatio (0Gy)			
Protein [mg/ml]	0,17 0,61	0,08 0,81	0,11 0,75
TGF-β [ng/ml]	-0,18 0,59	-0,35 0,31	-0,30 0,38
Serumwerte nach 50Gy			
Protein [mg/ml]	0,19 0,57	0,08 0,81	0,21 0,53
TGF-β [ng/ml]	-0,32 0,34	-0,27 0,43	-0,27 0,43
Serumwerte (Δ50Gy, 0Gy)			
Protein [mg/ml]	0,19 0,57	0,21 0,54	0,22 0,52
TGF-β [ng/ml]	0,21 0,54	0,22 0,52	0,13 0,71

**Tabelle 20.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten** der Studie: Serumparameter im Vergleich von Körpergröße, Gewicht und Body-Mass-Index. BMI = Body-Mass-Index, (Δ50Gy, 0Gy) = Differenz der Werte von 50Gy und 0Gy. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation). p aus der Spearman'schen Korrelation.

Im Patientenkollektiv findet sich vor Beginn der Strahlentherapie keinerlei Bezug der Proteinkonzentration zum Körpergewicht der Untersuchten, sowie ein leichter Anstieg mit zunehmender Größe und steigendem Body-Mass-Index. Die gleichen Tendenzen sind nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy zu finden. Bei den Differenzen der Messwerte findet sich eine leichte Zunahme der Konzentration von Protein mit steigender Körpergröße, zunehmendem Gewicht und höherem BMI des jeweiligen Patienten.

Der Gehalt des Patientenserums an TGF-β nimmt vor Beginn der Bestrahlungsbehandlung mit jeweils höheren Werten für Körpergröße und –gewicht sowie BMI etwas ab; diese leichte Abnahme findet sich in nahezu gleichen Ausprägungen auch nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy. Trotzdem lässt sich für die Patienten vom ersten zum zweiten Messtag eine leichte Zunahme der TGF-β-Konzentration feststellen, je größer und schwerer der Untersuchte und je höher sein Body-Mass-Index ist.

#### 4.4.3 Serumwerte: Interaktionen, Unterschiede zwischen beiden Kollektiven und Änderungen während der Strahlentherapie

##### 4.4.3.1 Hängen Protein- und TGF-β-Konzentrationen im Serum voneinander ab?

An dieser Stelle wurde untersucht, ob die Proteinkonzentrationen von den Konzentrationen an TGF-β im Serum abhängen. Für die Messergebnisse der Probanden (p = 0,22), die Werte der

Patienten vor Beginn der Strahlentherapie ( $p = 0,44$ ) und die Messwerte der Patienten nach Erhalt von insgesamt 50Gy ( $p = 0,78$ ) konnten in der Spearman'schen Rangkorrelation keinerlei Abhängigkeiten der Protein- von den TGF- $\beta$ -Konzentrationen gefunden werden. Analog konnten in der Spearman'schen Rangkorrelation keinerlei Zusammenhänge zwischen den Differenzwerten von Protein im Serum und den Differenzen der Konzentration an TGF- $\beta$  im Serum der Patienten ( $p = 0,45$ ) gefunden werden.

#### 4.4.3.2 Unterschiede der Serumwerte zwischen Probanden und Patienten

Anschließend wurde untersucht, ob die gefundenen Konzentrationen von Protein und TGF- $\beta$  im Serum der Probanden sich von denjenigen der Patienten vor Beginn der Strahlentherapie wesentlich unterscheiden:

	Status				p
	Probanden		Patienten		
	MW	ST	MW	ST	
Protein im Serum [mg/ml]	72,16	3,51	71,87	6,25	0,91
TGF- $\beta$ im Serum [ng/ml]	40,00	16,03	34,40	18,89	0,21

**Tabelle 21.** Vergleich der mittleren Konzentrationen von Protein im Serum der **Probanden** mit denjenigen der **Patienten** vor Beginn der Strahlentherapie (bei 0Gy). MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.  $p$  aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Man erkennt keinerlei Unterschiede in der durchschnittlichen Konzentration von Protein im Serum der Probanden von derjenigen der Patienten vor Beginn der Strahlentherapie.

Die mittlere Konzentration von TGF- $\beta$  im Serum der Probanden ist zwar höher als die der Patienten, aber auch dieser Unterschied ist nicht signifikant.

#### 4.4.3.3 Änderung der Serumparameter während der Strahlentherapie

Als erstes wurden die bei allen 14 Patienten gemessenen Serumkonzentrationen von Protein und TGF- $\beta$  vor Beginn der Strahlentherapie mit den jeweiligen Werten nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy verglichen. Hier fand sich im Wilcoxon-Test weder für die gemessenen Proteinkonzentrationen ( $p = 0,95$ ), noch für die Konzentrationen von TGF- $\beta$  ( $p = 0,95$ ) eine signifikante Änderung im Laufe der Bestrahlungsbehandlung.

In diesem Zusammenhang wurde auch gleich noch getestet, ob sich die Serumkonzentrationen von TGF- $\beta$  der vier Patienten, welche im Follow-Up eine Pneumonitis mindestens zweiten Grades entwickelten, von denjenigen der Patienten ohne Komplikationen unterscheiden:

	<b>Patienten</b>				
	<b>Entwicklung einer Pneumonitis im Follow-Up (n = 4)</b>		<b>keine Pneumonitis im Follow-Up (n = 10)</b>		
	MW	ST	MW	ST	p
TGF- $\beta$ [ng/ml] im Serum vor Beginn der Strahlentherapie	41,71	23,17	31,48	17,42	0,30
TGF- $\beta$ [ng/ml] im Serum nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy	27,98	12,04	34,25	14,18	0,54
Anstieg des TGF- $\beta$ [ng/ml] im Serum während der Therapie	-13,73	30,76	2,77	21,31	0,45

**Tabelle 22.** Alle 14 Patienten der Studie: Vergleich der Patienten, welche im Laufe oder als Folge der Strahlentherapie an einer Pneumonitis mindestens zweiten Grades erkrankt sind (n=4), mit denjenigen ohne Komplikationen im Follow-Up (n=10). MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

Es ist zu erkennen, dass sich Anstiege des Serum-TGF- $\beta$  der vier Pneumonitis-Patienten nicht signifikant von den Messwerten derjenigen zehn Patienten, welche keine Pneumonitis im Follow-Up entwickeln, unterscheiden. Während die Konzentration von TGF- $\beta$  sich bei den Patienten, die im weiteren Verlauf keine Pneumonitis entwickelten, kaum verändert, sinkt sie bei den später an einer Pneumonitis erkrankten im Durchschnitt um 32,9%.

## 4.5 Exhalat- und Serumwerte der beiden Kollektive

In diesem Kapitel werden nun erstmals Exhalat- und Serumparameter auf Zusammenhänge untersucht, sowohl innerhalb als auch im Vergleich beider Kollektive.

### 4.5.1 Serum- und Exhalatwerte an den beiden Messterminen

#### 4.5.1.1 Serum- und Exhalatwerte am ersten Messtermin

Zu Beginn wurde für alle Personen der Studie, getrennt nach Zugehörigkeit zum jeweiligen Kollektiv, getestet, ob an den jeweiligen Untersuchungstagen (Probanden: erster Messtag, Patienten: Messung vor Strahlentherapie und Messung nach Erhalt einer Gesamtdosis von

50Gy) Zusammenhänge zwischen den an diesen Tagen gefundenen Protein- bzw. TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Serum und den Exhalatparametern, bestehen.

mittlere Werte im Exhalat am 1. MT			
	Exhalatmenge [ $\mu$ g]	V'E [l]	Protein [ $\mu$ g/ml]
	rho p	rho p	rho p
<b>Serumwerte am 1. MT</b>			
Protein [mg/ml]	0,50 0,07	0,50 0,07	0,17 0,62
TGF- $\beta$ [ng/ml]	-0,37 0,29	-0,41 0,23	0,03 0,92

**Table 23.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Probanden**: Durchschnittswerte des Exhalats am ersten Messtag, in Abhängigkeit von den gemessenen Serumwerten an Protein und TGF- $\beta$ . MT = Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Man erkennt, dass die Proteinkonzentration im Serum umso höher ist, je größer die Exhalatmenge und das V'E der Probanden und, wenngleich auch in geringerem Maße, je größer die Proteinkonzentration im Exhalat ist.

Die TGF- $\beta$ -Konzentration im Serum sinkt hierbei, je größer Exhalatmenge und V'E der Probanden ist; sie ist dagegen von der Proteinkonzentration im Exhalat in keinerlei Weise abhängig.

mittlere Werte im Exhalat bei 0Gy			
	Exhalatmenge [ $\mu$ g]	V'E [l]	Protein [ $\mu$ g/ml]
	rho p	rho p	rho p
<b>Serumwerte bei 0Gy</b>			
Protein [mg/ml]	-0,31 0,37	-0,22 0,52	0,08 0,81
TGF- $\beta$ [ng/ml]	-0,33 0,33	-0,42 0,22	0,24 0,47

**Table 24.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten**: Durchschnittswerte des Exhalats vor Beginn der Strahlentherapie, in Abhängigkeit von den gemessenen Serumwerten an Protein und TGF- $\beta$ . V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Bei den Patienten ist vor Beginn ihrer Bestrahlungsbehandlung ersichtlich, dass der Proteingehalt im Serum etwas abnimmt, je größer die Exhalatmenge und das V'E der

untersuchten Person ist. Dagegen findet sich keinerlei Abhängigkeit der Proteinkonzentration im Serum von der Proteinkonzentration im Exhalat.

Die TGF- $\beta$ -Konzentration im Serum ist vor Radiatio zwar umso geringer, je größer Exhalatmenge und V'E des Untersuchten, aber umso größer, je höher die Proteinkonzentration in dessen Exhalat jeweils ist.

#### 4.5.1.2 Serum- und Exhalatwerte am zweiten Messtermin

	mittlere Werte im Exhalat bei 50Gy					
	Exhalatmenge [ $\mu$ g]		V'E [l]		Protein [ $\mu$ g/ml]	
	rho	p	rho	p	rho	p
<b>Serumwerte bei 50Gy</b>						
Protein [mg/ml]	0,04	0,90	0,07	0,85	-0,33	0,33
TGF- $\beta$ [ng/ml]	-0,33	0,34	-0,22	0,51	-0,02	0,94

**Table 25.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten**: Durchschnittswerte des Exhalats nach einer Gesamtdosis von 50Gy, in Abhängigkeit von den gemessenen Serumwerten an Protein und TGF- $\beta$  zu diesem Zeitpunkt. V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Hier ist zu erkennen, dass die bei den Patienten nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy festgestellten Konzentrationen an Protein im Serum in keinerlei Weise abhängig von Exhalatmenge und V'E sind. Sie sind dagegen umso kleiner, je höher die Proteinkonzentration im Exhalat ist.

Im Gegensatz dazu sind die TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Serum umso geringer, je kleiner Exhalatmenge und V'E der Untersuchten; es gibt keinerlei Abhängigkeit der TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Serum von den Proteinkonzentrationen im Exhalat.

#### 4.5.2 Änderung der Serum- und Exhalatparameter und eventuelle Abhängigkeiten

##### 4.5.2.1 Änderung der Serum- und Änderung der Exhalatparameter der Patienten während der Strahlentherapie

Ferner wurde mittels einer Korrelationsrechnung geprüft, ob für das Patientenkollektiv die Veränderungen der Exhalatparameter im Laufe der Strahlentherapie in einem Zusammenhang mit den Veränderungen der Serumparameter stehen. Da hierbei keine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde die Rang-Korrelation nach Spearman verwendet:

<b>Änderung im Exhalat (<math>\Delta 50\text{Gy}</math>, <math>0\text{Gy}</math>)</b>					
	Exhalatmenge		V'E		Protein
	[ $\mu\text{g}$ ]		[l]		[ $\mu\text{g/ml}$ ]
	rho	p	rho	p	rho p
<b>Änderung im Serum (<math>\Delta 50\text{Gy}</math>, <math>0\text{Gy}</math>)</b>					
Protein [mg/ml]	0,02	0,96	-0,14	0,68	0,59 0,027*
TGF- $\beta$ [ng/ml]	-0,35	0,30	-0,66	0,0100**	0,55 0,043*

**Tabelle 26.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten**: Differenzen der Werte des Exhalats nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy und vor der Bestrahlung, in Abhängigkeit von den Differenzen der Serumwerte an Protein und TGF- $\beta$  nach und vor der Bestrahlung mit 50 Gy. ( $\Delta 50\text{Gy}$ ,  $0\text{Gy}$ ) = Differenzen der Werte von 50 und 0Gy, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

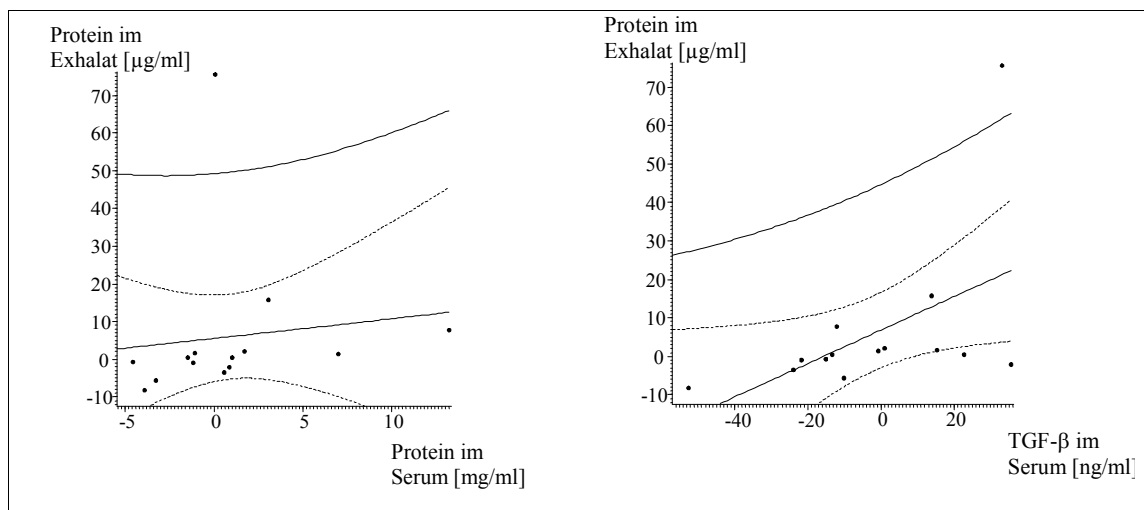
Die Korrelationsrechnung zeigt keinerlei Zusammenhang zwischen der Veränderung der Proteinkonzentration im Serum der Patienten und der Änderung der dazugehörigen Exhalatmenge, sowie eine leichte Abnahme des V'E der dazugehörigen Patienten im Laufe der Bestrahlungsbehandlung. Dagegen findet sich bei Zunahme der Proteinkonzentration im Serum auch eine signifikante Zunahme der Konzentration von Protein im Exhalat der entsprechenden Patienten.

Steigt die Konzentration an TGF- $\beta$  im Serum eines Patienten während der Strahlentherapie an, so verringert sich seine Exhalatmenge etwas; in diesem Falle nimmt überdies sein V'E signifikant ab (siehe auch Abbildung 10).

Darüber hinaus steigt bei den Patienten, die eine Zunahme der TGF- $\beta$ -Konzentration während der Behandlung zeigen, die Proteinkonzentration im Exhalat signifikant an.

Der signifikante Anstieg von Protein im Exhalat bei denjenigen Patienten, die auch höhere Konzentrationen von Protein und TGF- $\beta$  im Serum zeigen, ist in Abbildung 8 nochmals veranschaulicht:





**Abbildung 8.** Alle **Patienten** der Studie ( $n = 14$ ): Änderung der Proteinkonzentration im Exhalat und jeweils dazugehörige Änderung der Protein- bzw. TGF- $\beta$ -Konzentration im Serum. Dargestellt sind die Einzelwerte der Patienten, die Trendlinie, sowie die dazugehörigen Grenzl意思en.

Um die Veränderungen sämtlicher Exhalat- und Serumparameter im Laufe der Strahlentherapie zusammenfassend nochmals zu veranschaulichen, dient Tabelle 27 (vergleiche auch Tabelle 14b):

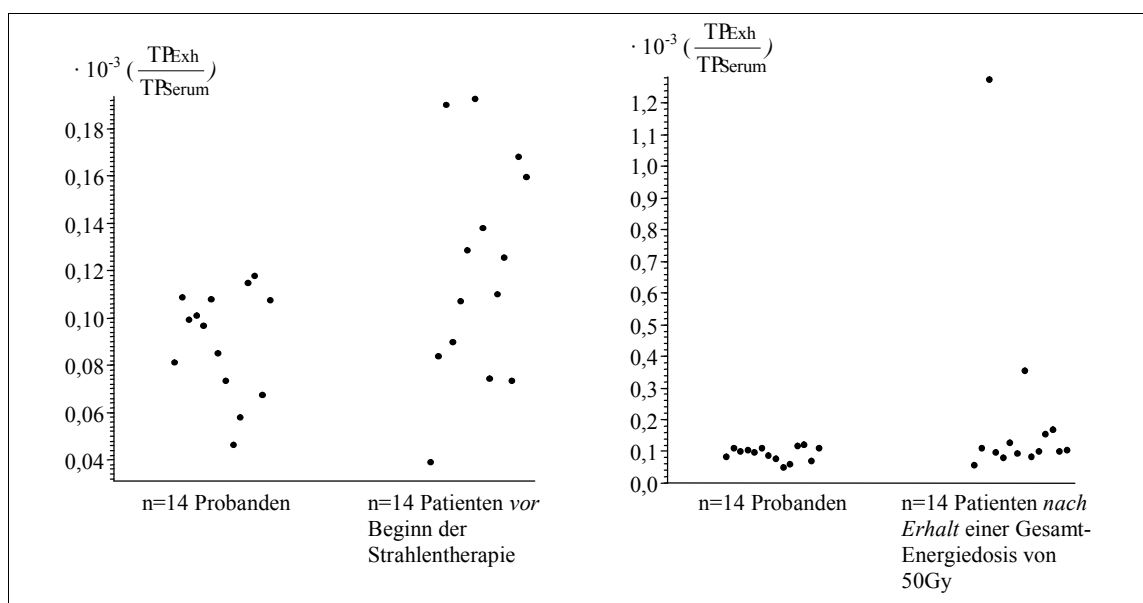
<b>Patienten</b>		
Änderung der Werte von 0Gy zu 50Gy		
	Median	68%-Vertrauensbereich des Medians
Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]	103,5	-250,2 bis 712,6
V'E [l]	11,3	-5,4 bis 30,8
Protein im Exhalat [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,441	-3,535 bis 7,433
Protein im Serum [ $\text{mg/ml}$ ]	0,30	-3,14 bis 3,00
TGF- $\beta$ [ $\text{ng/ml}$ ]	-5,31	-21,34 bis 22,29

**Tabelle 27.** Alle 14 **Patienten** der Studie: Mediane der Veränderungen der Exhalat- und Serumparameter im Laufe der Strahlentherapie (von 0Gy zu insgesamt 50Gy), jeweils mit 95%-Vertrauensbereich des Medians.

#### 4.5.2.2 Quotienten der (Total-) Proteinkonzentrationen in Exhalat und Serum im Vergleich von Probanden und Patienten

Hier wurde eine Abschätzung des Ausmaßes der Schrankenstörung bei den Patienten nach Erhalt von insgesamt 50Gy – im Vergleich zu den Probanden - anhand des Quotienten von Exhalat- und Serumprotein versucht.

Der Quotient aus den (Total-) Proteinkonzentrationen im Exhalat und den (Total-) Proteinkonzentrationen im Serum ( $\frac{TP_{Exh}}{TP_{Serum}}$ ) ist bei den Probanden  $0,090 \cdot 10^{-3} \pm 0,022 \cdot 10^{-3}$ . Bei den Patienten ist  $\frac{TP_{Exh}}{TP_{Serum}} = 0,120 \cdot 10^{-3} \pm 0,046 \cdot 10^{-3}$  vor Beginn der Strahlentherapie, nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy dagegen ist  $\frac{TP_{Exh}}{TP_{Serum}} = 0,205 \cdot 10^{-3} \pm 0,315 \cdot 10^{-3}$ . Damit ist  $\frac{TP_{Exh}}{TP_{Serum}}$  bei den Patienten vor Beginn Ihrer Therapie im Durchschnitt ca. 1,3fach höher als bei den Probanden, nach Erhalt von insgesamt 50Gy sogar 2,28mal so hoch, was einem 1,75fachen Anstieg des Quotienten bei den Patienten entspricht. Allerdings findet sich weder im Vergleich Patienten vor Bestrahlungstherapie – Probanden ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,070$  im U-Test nach Mann und Whitney), noch bei einem Vergleich Patienten nach Erhalt von insgesamt 50Gy – Probanden ( $p = 0,19$  im U-Test nach Mann und Whitney). Dies liegt darin begründet, dass die stark unterschiedlichen Quotienten und der deutliche Anstieg im Patientenkollektiv im wesentlichen auf zwei Patienten mit einem besonders hohen Anstieg der Proteinkonzentration im Exhalat im Laufe der Strahlentherapie zurückzuführen ist (siehe auch Abbildung 9).



**Abbildung 9.** Quotient aus (Total-) Proteinkonzentration im Exhalat und (Total-) Proteinkonzentration im Serum ( $\frac{TP_{Exh}}{TP_{Serum}}$ ). Links sind die Quotienten von Probanden und Patienten vor Strahlentherapie, rechts die Quotienten der Probanden und der Patienten nach Erhalt von insgesamt 50Gy dargestellt.

#### 4.5.2.3 Ausgangswerte von Protein und TGF- $\beta$ im Serum und Änderung der Proteinkonzentration im Exhalat in beiden Kollektiven

Im diesem Abschnitt wurde untersucht, ob die Veränderung des Proteins im Exhalat etwas mit den Ausgangswerten von Protein und TGF- $\beta$  im Serum zu tun haben. Wieder wurden Probanden und Patienten getrennt untersucht.

	Änderung im Exhalat ( $\Delta 2./1.MT$ )					
	Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]		V'E [l]		Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	rho	p	rho	p	rho	p
<b>Serumwerte</b>						
Protein [mg/ml]	-0,48	0,17	-0,40	0,24	0,16	0,65
TGF- $\beta$ [ng/ml]	0,41	0,23	0,15	0,66	-0,30	0,38

**Tabelle 28.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Probanden**: Differenzen der Durchschnittswerte des Exhalats vom ersten zum zweiten Messtermin, in Abhängigkeit der Serumwerte von Protein und TGF- $\beta$ . ( $\Delta 2./1.MT$ ) = Differenzen der Durchschnittswerte am zweiten und ersten Messtermin, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Im Probandenkollektiv erkennt man, dass für höhere Ausgangswerte der Proteinkonzentration im Serum eher eine Abnahme von Exhalatmenge und V'E, dafür aber eher eine leichte Zunahme der Proteinkonzentration im Exhalat, zu erwarten ist.

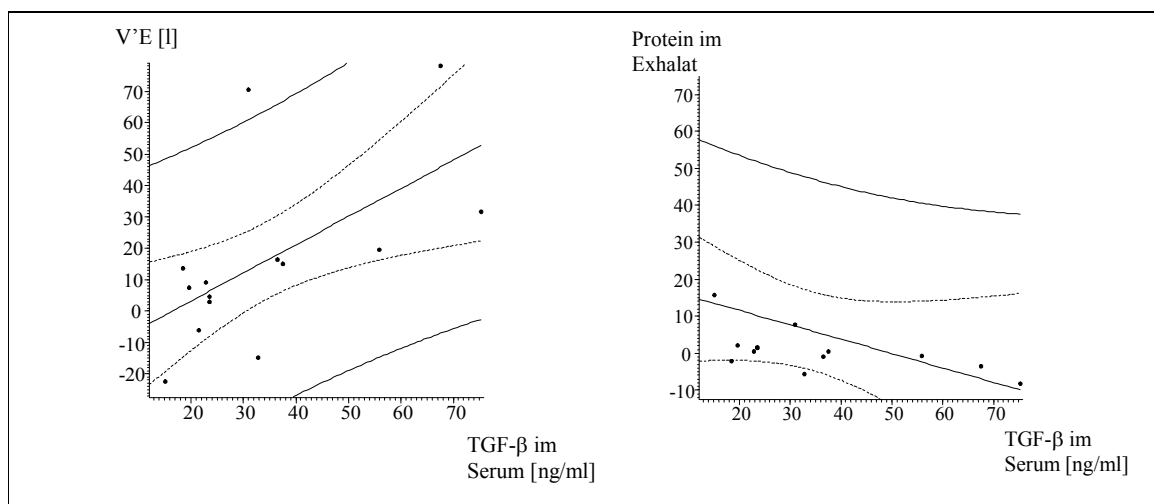
Mit hohen Konzentrationen an TGF- $\beta$  im Serum sind Zunahmen der Exhalatmenge, eine leichte Abnahme des V'E und eine Abnahme der Proteinkonzentration im Exhalat verbunden; beides ist aber nicht signifikant.

	Änderung im Exhalat ( $\Delta 50\text{Gy}, 0\text{Gy}$ )					
	Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]		V'E [l]		Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	rho	p	rho	p	rho	p
<b>Serumwerte bei 0Gy</b>						
Protein [mg/ml]	0,05	0,89	-0,08	0,81	-0,43	0,22
TGF- $\beta$ [ng/ml]	0,53	0,053	0,69	0,0067**	-0,65	0,012*

**Tabelle 29.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten**: Differenzen der Durchschnittswerte des Exhalats nach Erhalt einer Gesamtdosis von 50Gy, in Abhängigkeit von den Ausgangs-Serumwerten an Protein und TGF- $\beta$ . ( $\Delta 50\text{Gy}, 0\text{Gy}$ ) = Differenzen der Durchschnittswerte von 0 und 50Gy, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Für die Konzentration an Protein im Serum der Patienten ist zu erkennen, dass höhere Ausgangswerte keinerlei Bedeutung für Zu- oder Abnahme von Exhalatmenge und V'E dieser Patienten haben, dass sie aber eher mit einer Abnahme der Proteinkonzentration im Exhalat einhergehen (im Gegensatz zu den Probanden, s. o.).

Höhere Serums-Ausgangswerte an TGF- $\beta$  gehen dagegen eher mit einer Zunahme der Exhalatmenge einher. Bei diesen ist außerdem eine signifikante Zunahme des V'E und der Proteinkonzentration im Exhalat während der Bestrahlungsbehandlung zu erkennen, was in der folgenden Grafik veranschaulicht werden soll:



**Abbildung 10.** Alle **Patienten** der Studie ( $n = 14$ ): Änderung von V'E und der Proteinkonzentration im Exhalat während der Strahlentherapie im Vergleich zur Höhe der Ausgangskonzentrationen von TGF- $\beta$  im Serum. Dargestellt sind die Einzelwerte der Patienten, die Trendlinie, sowie die dazugehörigen Grenzl意思en.

#### 4.5.2.4 Änderungen der Serumwerte der Patienten im Vergleich zu den Exhalatparametern vor Beginn der Strahlentherapie

Zuletzt wurde noch getestet, ob die Veränderungen der Serumkonzentrationen von Protein und TGF- $\beta$  bei den Patienten in Zusammenhang mit den Exhalatparametern vor Beginn der Strahlentherapie stehen:

	Exhalatwerte bei 0Gy					
	Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]		V'E [l]		Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	rho	p	rho	p	rho	p
<b>Änderung im Serum (<math>\Delta 50\text{Gy}</math>, 0Gy)</b>						
Protein [mg/ml]	0,39	0,25	0,62	0,019*	-0,53	0,051
TGF- $\beta$ [ng/ml]	0,14	0,67	0,27	0,42	-0,24	0,48

**Table 30.** Korrelationsuntersuchung aller 14 **Patienten:** Durchschnittswerte des Exhalats vor Beginn der Strahlentherapie, in Abhängigkeit von den Differenzen der Serumwerte an Protein und TGF- $\beta$ . ( $\Delta 50\text{Gy}$ , 0Gy) = Differenzen der Durchschnittswerte von 50 und 0Gy, V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Zu erkennen ist, dass für Anstiege der Proteinkonzentration im Serum während der Behandlung höhere Exhalatmengen vor Strahlentherapie zu erwarten sind. Man findet bei diesen stärkeren Anstiegen auch signifikant größere Messwerte für das V'E der entsprechenden Patienten bei 0Gy. Außerdem sind für diese Patienten eher niedrige Ausgangskonzentrationen für Protein im Exhalat erkennbar.

Für Zunahmen der TGF- $\beta$ -Konzentration im Serum der Patienten während der Therapie findet man höhere Werte für Exhalatmenge und V'E vor Beginn der Bestrahlungsbehandlung. Dabei ist eine eher niedrige Ausgangs-Proteinkonzentration im Exhalat zu erkennen.

#### 4.5.3 Serumwerte und Durchschnittswerte des Exhalats

Im Folgenden wurden die in 4.2 für die Probanden ermittelten durchschnittlichen Parameter des Exhalats mit den Messwerten für Protein und TGF- $\beta$  im Serum der Probanden auf gegenseitige Beeinflussung untersucht:

	mittlere Exhalatparameter					
	Exhalatmenge [ $\mu\text{g}$ ]		V'E [l]		Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
	rho	p	rho	p	rho	p
<b>Serumwerte</b>						
Protein [mg/ml]	0,38	0,27	0,26	0,44	0,18	0,59
TGF- $\beta$ [ng/ml]	-0,14	0,68	-0,43	0,22	-0,07	0,84

**Tabelle 31.** Korrelationsuntersuchung der aus den drei Einzelmessungen der **Probanden** ermittelten Durchschnittswerte des Exhalats, in Abhängigkeit der gemessenen Serumwerte von Protein und TGF- $\beta$ . V'E = Atemvolumen während der Sammelzeit (15 min.), rho = Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (ein negativer Koeffizient bedeutet gegensinnige Korrelation), p aus der Spearman'schen Korrelation.

Die Proteinkonzentrationen im Probandenserum steigen mit zunehmenden mittleren Werten für Exhalatmenge, V'E und Proteinkonzentration im Exhalat über die drei Messstage etwas an. Dagegen nehmen die Konzentrationen an TGF- $\beta$  im Serum aller Probanden mit jeweils höheren Messergebnissen für Exhalatmenge und V'E ab. Es finden sich keinerlei Änderungen der TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Serum, auch wenn im Exhalat eines Probanden höhere Proteinkonzentrationen über den gesamten Messzeitraum festgestellt wurden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodik, Messung von Total-Protein und TGF- $\beta$

Die Untersuchungen ließen sich bei allen Probanden und Patienten problemlos durchführen. Kein einziger musste die Sammelperiode wegen Unzumutbarkeit abbrechen, obwohl einige der Patienten öfters Pausen einlegen mussten, krankheitsbedingt geschwächt und häufig dyspnoeisch waren.

Auch Becher et al. [6], die allerdings nicht mit dem ECoScreen, sondern mit einem Labormuster (extrem langes Sammelgefäß, Exhalatmenge ca. 0,1-1,5ml nach 15 Minuten) arbeiteten, kamen zum Ergebnis, dass die Methode der Exhalat-Kondensation auch bei eingeschränkter pulmonaler Funktion und schlechten Ergebnissen einer Lungenfunktionsuntersuchung gut durchführbar, reproduzierbar und für Mehrfachmessungen (auch in kurzen Intervallen zur Verlaufskontrolle) geeignet ist. Gökhan et al. [24] folgern aus der derzeitigen Studienlage, dass es für einige Substanzen wichtig sei, ein möglichst inertes Probensammlermaterial zu verwenden; dies ist beim Jaeger ECoScreen gewährleistet.

Eine Bestimmung des während der Sammelzeit geatmeten Volumens (V'E) am Influx-Schenkel des Sammelsystems ergab bei uns durchschnittlich für die Probanden (gemittelt über die drei Messtage, siehe Kapitel 4.2.4, Tabelle 5)  $153,6 \pm 21,6l$  und für die Patienten  $168,4 \pm 46,6l$  vor Beginn der Strahlentherapie und  $184,5 \pm 50,0l$  nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy (siehe Tabellen 37 und 38, Kapitel 8). Die Bestimmung unter Zuhilfenahme des Ergospirometers ist gut durchführbar.

Gessner et al. [13] fanden bei ihren Untersuchungen eine deutlich größere Variabilität des V'E (von 37 – 302l in zehn Minuten bei Gesunden und 27 – 238l bei COPD-Patienten), wobei sie allerdings eine andere Methode zur Bestimmung des V'E nutzten („Bellows“-Gasflussmesser am Influx-Schenkel). Bei der Berechnung des über die Sammelperiode geatmeten Volumens (Kapitel 3.2.1.2) wurde klar, dass eine einfachere Möglichkeit zur Bestimmung für einen routinemäßigen Einsatz der Methode in der Klinik unabdingbar ist – hier sind die Ingenieure und Softwareentwickler gefragt, eine einfachere Messmöglichkeit anzubieten; etwa dadurch, dass nur Volumen bei *strömender* Luft bestimmt wird, und zwar in ausreichend kleinen Messintervallen.

Bei der Weiterverarbeitung des Untersuchungsmaterials (3.2.1.5) hat sich gezeigt, dass bei dem vorliegenden System eine Bestimmung der Masse des Exhalat-Kondensats sinnvoller ist, als die Bestimmung des Volumens durch abpipettieren. Durch Pipettieren sind Fehler wegen

des nie komplett möglichen Ansaugens des Kondensats vorprogrammiert. Es gelang so, nach einer Sammelzeit von exakt 15 Minuten im Durchschnitt bei den Probanden (gemittelt über die drei Messtage, siehe Kapitel 4.2.4, Tabelle 5)  $2456,9 \pm 232,1 \mu\text{g}$  und bei den Patienten  $2705,4 \pm 420,8 \mu\text{g}$  bzw.  $2995,8 \pm 557,0 \mu\text{g}$  (bei 0 bzw. 50Gy, siehe Tabellen 37 und 38, Kapitel 8) Exhalat zu gewinnen. Ein Aufteilen der Proben auf mehrere Sammelröhrchen erscheint sinnvoll, da so mehrmaliges Auftauen und Einfrieren und damit ein Verfälschen der Proben entfällt.

TGF- $\beta$ 1 konnte mit dem benutzten ELISA in keiner der Exhalat-Kondensat-Proben nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.3.1); auch ein Ankonzentrieren der Proben erscheint nicht sinnvoll; da hierfür extrem große Mengen einer Probe nötig wären, was wiederum nicht praktikable Sammelzeiten voraussetzen würde.

Dagegen war Total-Protein mittels des benutzten BCA-Assays im Exhalat-Kondensat (analog den Studien von Effros et al. [9] und Gessner et al. [13]) gut messbar. Gessner et al. [13] betrachten die im Exhalat-Kondensat gefundenen Proteine als Bestandteile des „Epithelial Lining Fluid“ und vermuten, dass die Konzentration von Total-Protein zum Erkennen entzündlicher Prozesse nützlich sein könnte. Durch Amylase-Messungen (es war in keiner Probe  $\alpha$ -Amylase nachweisbar) gelang sowohl der Arbeitsgruppe von Gessner [13] für das von uns benutzte System, als auch von Effros [9] für eine experimentelle Kondensations-Apparatur der Nachweis, dass das bei der Exhalat-Kondensation gewonnene Probenmaterial bei korrekt durchgeführter Gewinnung nicht mit Speichel verunreinigt wird. Bei allen Betrachtungen von Stoffkonzentrationen muss aber stets auch daran gedacht werden, dass Verdünnungseffekte durch den beim Atmen erzeugten Wasserdampf eine Rolle spielen können, Effros und Mitarbeiter [9] berechneten den Verdünnungsfaktor in ihrer Studie auf ca. 1:2443 und damit den Verlust reinen „Epithelial Lining Fluids“ durch Abatmen auf ca. 200 $\mu$ l in 24 Stunden.

Die Messungen der Serumkonzentrationen von Total-Protein mittel BCA-Assay und von TGF- $\beta$ 1 mittels ELISA sind etabliert und ließen sich erwartungsgemäß problemlos durchführen.

## **5.2 Exhalatparameter bei gesunden Probanden**

In 4.2 konnte für die mittleren Werte der Exhalatparameter über die drei Messtage gezeigt werden, dass bei jungen, gesunden Probanden lediglich die Exhalatmenge vom V'E abhängt ( $p = 0,0004^{***}$ ); andere Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern waren nicht



signifikant. Die Proteinkonzentration war dabei von der gewonnenen Exhalatmenge gänzlich unabhängig ( $p = 0,96$ ).

Durch unsere Studie wird deutlich, dass die von Gessner et al. [13] beschriebene signifikante Abhängigkeit der Proteinmenge vom V'E sehr wahrscheinlich lediglich eine Folge der durch höhere Ventilation gesteigerten Menge des *absolut* abgeatmeten Proteins ist.

Es wurde anhand eines klaren Ausreißers bezüglich Exhalatmenge und V'E (4.2.3, Abb. 4) aber auch deutlich, dass man an dem benutzten Gerät offenbar 15 Minuten lang hypoventilieren kann, ohne dieses zu bemerken; Übungsphasen und Standardisierungen sind also für einen routinemäßigen Einsatz der Methode unabdingbar (siehe auch weiter unten).

Auch Gessner et al. [13] stellten in ihren Untersuchungen an Gesunden und COPD-Patienten fest, dass V'E und Exhalat-Kondensat-Volumen in hohem Maße voneinander abhängen; sie kamen überdies zum Ergebnis, dass übliche Lungenfunktionsparameter (totale Lungenkapazität TLC, Atemzugvolumen RV, Vitalkapazität VC, Einsekundenkapazität FEV<sub>1</sub>) unabhängig von der gewonnenen Exhalatmenge waren. Somit könnten nachgewiesene Stoffe in ihrer Konzentration auf einen dieser beiden Parameter (V'E oder Kondensatvolumen) bezogen werden, der andere kann dann in weiteren Betrachtungen unberücksichtigt bleiben.

Bei den Probanden fand sich während der drei Messtermine für keinen der drei Exhalatparameter ein (auf den jeweiligen Probanden bezogener) einheitlicher zeitlicher Trend im Sinne eines Anstiegs oder einer Abnahme (4.2.4). Die Tag-zu-Tag-Variabilität *aller* Exhalatparameter ist dabei beträchtlich. Daher sollten potentiell zu messenden Personen unbedingt ausreichende „Übungsphasen“ zugestanden werden und möglichst geeignete „Referenzkollektive“ gewählt werden.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gessner et al. [13], die in ihren Untersuchungen eine hohe intraindividuelle Stabilität von Kondensatvolumen und V'E während dreier Messungen gefunden haben. Reinhold et al. [27] hatten sogar eine noch ausgeprägtere Stabilität in Tierversuchen mit Kälbern nachweisen können. Für die Konzentration von Stoffen im Kondensat sieht es schon etwas anders aus: Nowak et al. berichten – allerdings bei der Messung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und TBAR bei Gesunden [26] – sowohl über Tagesschwankungen und Alterseinflüsse auf die gefundenen Konzentrationen; auch sie hatten anhand Mehrfachmessungen einen „Trainingseffekt“ entsprechend unseren Erfahrungen beobachtet. In die gleiche Richtung gehen die Erfahrungen von Schleiss et al.

[29], bei deren Studie vor allem die hohe *intraindividuelle* Variabilität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Exhalat bemerkenswert ist.

Möglicherweise sollte man bei routinemäßigem Einsatz der Methode den zu messenden Probanden zwei bis drei „Probelaufe“ à zehn bis 15 Minuten am Gerät zugestehen und erst ab der dritten Messung gewonnene Ergebnisse verwerten.

Außerdem sind die Vorschläge von Effros et al. [9] bedenkenswert, gefundene Konzentrationen auf (freilich noch nicht geklärte) „Referenzsubstanzen“ zu beziehen (siehe auch nächstes Kapitel).

### **5.3 Unterschiede und / oder Parallelen von Probanden und Patienten**

In einer Korrelationsuntersuchung (4.2.2.2) konnte gezeigt werden, dass die Methode nur bei sehr einheitlichen Kollektiven eine relative Unempfindlichkeit gegenüber Alter, Geschlecht und Körpermaßen zeigt. Bei demographisch inhomogenen Kollektiven (4.3) dagegen hängen die Exhalatparameter deutlich von den demographischen Daten ab.

Bei den *Patienten* fand sich vor Beginn der Strahlentherapie eine signifikante Abhängigkeit der Exhalatmenge von Körpergewicht ( $p = 0,0072^{**}$ ) und BMI ( $p = 0,0095^{**}$ ), während sich sonst in keinem der beiden Kollektive irgendwelche anderen Zusammenhänge finden ließen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die meisten der beim Betrachten des *Gesamtkollektivs* (Probanden *und* Patienten) gefundenen diversen Zusammenhänge zwischen Exhalatparametern und demographischen Daten (Tab. 9, Kapitel 4.3.2.2) allein auf die deutlichen demographischen Unterschiede der beiden *Teilkollektive* zurückzuführen sind.

Außerdem findet sich am jeweils zweiten Messtermin im *Gesamtkollektiv* bei den Älteren signifikant mehr Protein im Exhalat ( $p = 0,045^{*}$ ), während sich am ersten Messtermin kein altersbedingter Unterschied herstellen lässt. Zusammen mit der Tatsache, dass innerhalb der beiden *Teilkollektive* keine derartige Altersabhängigkeit zu finden ist, muss vermutet werden, dass hierfür im Wesentlichen Krankheitseinflüsse beziehungsweise Folgen der Strahlentherapie verantwortlich zeichnen und nicht das demographische Alter per se.

Bei unserer Studie ist allerdings statistisch gesehen nicht immer eindeutig zwischen Alters- und Krankheitseinfluss zu unterscheiden. Dies verdeutlicht, dass es für die Ermittlung von „Referenzwerten“ in zukünftigen Studien nötig sein wird, demographisch den zu Untersuchenden möglichst gleichartige Kollektive zu untersuchen und anhand dieser altersspezifische „Normwerte“ zu ermitteln.

Gessner et al. kamen in ihrer Studie [13] zum Ergebnis, dass die absolute Proteinmenge im Exhalat-Kondensat lediglich mit dem Kondensatvolumen korreliert und es dabei kaum

Unterschiede zwischen Gesunden und COPD-Patienten gibt – im Gegensatz dazu gibt es bei unserer Studie zwischen den Patienten nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy und den Probanden einen deutlichen Unterschied im Sinne einer durchschnittlich höheren Proteinkonzentration bei den Patienten. Ob dieser Unterschied allerdings seine Ursache in der Behandlung (Strahlentherapie) oder der Grunderkrankung hat, kann mit den vorliegenden Ergebnissen allein nicht eindeutig geklärt werden.

Bei der Untersuchung der Verläufe aller Exhalatparameter (4.3.3) über die drei Messtage bei den Probanden hat sich gezeigt, dass es für keinen einzigen der drei Parameter statistisch entscheidend ist, ob man den Verlauf erster – zweiter, erster – dritter oder zweiter – dritter Messtag der Probanden mit den Veränderungen bei den Patienten während der Strahlentherapie vergleicht. Somit sind bei zukünftigen Untersuchungen Messintervalle vergleichbarer Dauer (siehe auch weiter unten) – nach einer genügenden Anzahl von „Probeläufen“ – zur Verlaufskontrolle (jedenfalls der in dieser Studie untersuchten Exhalatparameter) prinzipiell geeignet.

Allerdings haben die Untersuchungen von Effros et al. [9] gezeigt, dass sowohl inter- als auch intraindividuell eine relativ hohe Variabilität vieler gemessener Substanzen im Exhalat vorliegt; sie schlagen deshalb vor, gemessene Substanzen möglichst auf andere Substanzkonzentrationen zu beziehen, die sich regelmäßig und in relativ konstanter Konzentration bei allen Menschen nachweisen lassen – etwa Elektrolyt-Konzentrationen (die dann bei Bedarf sogar noch auf die jeweilige Blutserum-Konzentration bezogen werden könnten). Welche „Referenzparameter“ hierbei im Einzelnen zu berücksichtigen sein werden, ist derzeit allerdings noch abzuklären und bleibt bis auf weiteres Betätigungsfeld intensiver Forschungen.

Im Vergleich der Verläufe (4.3.3.1, erster – zweiter Messtermin bei Probanden und Patienten) zeigte sich in unserer Studie, dass die Patienten insgesamt höhere *Ausgangswerte aller drei Exhalatparameter* hatten als die Probanden, wenngleich auch statistisch nicht signifikant. Möglicherweise rührt die vermehrte Ventilation der Patienten von ihrer Krankheit her – viele waren ja schon bei Beginn der Untersuchungen pulmonal stark eingeschränkt und mussten für eine ausreichende Oxygenierung ihres Blutes ja eine intensive Ventilationstätigkeit aufwenden. Diese vermehrte Ventilation bedingt ja aber wieder eine größere Exhalatmenge, was ja schon für die Probanden nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 4.2) und sich auch durch die Untersuchungen von Gessner et al. [13] an Gesunden und COPD-Patienten, sowie Reinhold et al. im Tierversuch [27], bestätigt findet.

Am zweiten Messtermin fand sich bei den Probanden durchschnittlich eine niedrigere Exhalatmenge und ein geringeres V'E als am ersten Messtag; möglicherweise ist dies Folge einer „Gewöhnung“ an den ECoScreen, in gewisser Weise also ein „Trainingseffekt“. Wieder wird an dieser Stelle deutlich, wie unbedingt notwendig bei der Anwendung der hier beschriebenen Methode Standardisierungen und angepasste „Trainingsphasen“ sind. Bei den Patienten fand sich eher eine Zunahme des V'E – eventuell als Folgen von Therapie und / oder Grunderkrankung, eine nähere Betrachtung dieses Sachverhalts folgt noch weiter unten. Die durchschnittlich höhere *Ausgangs*-Proteinkonzentration der Patienten in dieser Studie (siehe Tabellen 12a und 12b, Kap. 4.3.3.1) lässt eine schon vor der Strahlentherapie bestehende alveoläre Schrankenstörung bei mindestens einem Teil der untersuchten Patienten vermuten, wie sie von vielen Autoren, so etwa Gessner et al. [13], als Ursache einer erhöhten alveolären Proteinkonzentration gesehen wird.

Die Proteinkonzentration im Exhalat war bei den Probanden vom ersten zum zweiten Messtermin stabil, bei den Patienten stieg sie dagegen stark an (im Schnitt bis auf das ca. 1,7fache, siehe auch Tab. 15, Kap. 4.3.3.2). Dies könnte zunächst daran denken lassen, dass sich hierdurch bei einigen Patienten eine Schrankenstörung mit Bezug zur Klinik im Sinne einer Prädikktivität für eine sich anbahnende Strahlenpneumonitis nachweisen lässt. Allerdings ist der Anstieg bei den Patienten im Wesentlichen auf zwei Patienten zurückzuführen (laufende Nummern drei und acht aus Kapitel 3.1.2.2), die *beide* im Follow-Up *nicht* an einer Pneumonitis erkrankt sind (siehe auch Abb. 7, Kapitel 4.3.3.1). Es ist also zumindest kein *direkter* Zusammenhang zwischen Anstieg der Proteinkonzentration im Exhalat-Kondensat (als Zeichen einer entzündlichen Schrankenstörung) und klinischer Pneumonitis-Symptomatik herzustellen, wobei wiederum die in dieser Studie vorliegende geringe Kollektivgröße und dadurch bedingte statistische Schwierigkeiten bedacht werden müssen. Aufgrund *unserer* Ergebnisse ist jedenfalls *kein direkter* Zusammenhang zwischen Erhöhung der Proteinkonzentration im Exhalat-Kondensat und höherem individuellen Gefährdungsgrad für die Entwicklung einer strahlenbedingten Pneumonitis herzustellen.

In den Kapiteln 4.3.3.1.1 und 4.3.3.1.2 wurde nun neben einer Abschätzung der Veränderungen der Exhalatparameter in beiden Kollektiven auch untersucht, wie sich die Proteinkonzentrationen der Patienten, welche später an einer Strahlenpneumonitis erkrankt sind, von den übrigen unterscheiden (Tabelle 14c). Hier zeigte sich, dass bei den Pneumonitis-Erkrankten fast gar keine Veränderungen der Proteinkonzentrationen stattfanden (durchschnittlicher Anstieg um 0,098µg/ml), während der durchschnittliche Anstieg der Total-Proteinkonzentration um 8,308µg/ml des Patientenkollektivs ausschließlich von den

„Übrigen“ herrührt – maßgeblich durch zwei „Ausreißer“ (siehe auch weiter oben). Es ist allerdings bei all diesen Ergebnissen zu bedenken, dass erstens nicht sicher ist, ob alle Patienten, bei welchen eine Schrankenstörung vorlag, auch schließlich an einer *klinisch manifesten* Pneumonitis erkrankt sind und zweitens natürlich auch Zufallseffekte eine Rolle spielen, die in zukünftigen Studien durch wesentlich größere Studienkollektive vermieden werden müssen. Es besteht also die Notwendigkeit, in weiteren Studien große Kollektive von tatsächlich an einer Strahlenpneumonitis erkrankten mit vergleichbaren, aber nicht erkrankten Patienten eingehend zu untersuchen, um abschätzen zu können, ob es sich bei den beschriebenen Phänomenen um typische Befunde oder Zufälle handelt.

In 4.3.3.2 konnte gezeigt werden, dass es am *jeweils ersten* Messtermin zwischen Probanden und Patienten *keine* signifikanten Unterschiede der Exhalatparameter gibt (Tab. 15). Am jeweils zweiten Messtermin fanden sich jedoch bei Exhalatmenge ( $p = 0,0014^{**}$ ) und V'E ( $p = 0,029^*$ ) signifikant höhere Werte bei den Patienten im Vergleich zu den Probanden. Eventuell müssen die Patienten im Laufe der Strahlentherapie ihre infolge Krankheit und / oder Strahlentherapie mangelhafte Oxygenierung des Blutes durch vermehrte Ventilation ausgleichen (siehe auch weiter oben). Es konnte hier auch wieder, erkennbar an der riesigen Standardabweichung der Patienten, gezeigt werden, dass der Anstieg des Proteins im Exhalat-Kondensat im Wesentlichen auf sehr wenige Ausreißer zurückzuführen ist, die allerdings allesamt im Follow-Up *nicht* an einer Strahlenpneumonitis erkrankt sind (siehe oben).

In Kapitel 4.3.3.3 wurden die *Veränderungen* der Exhalatparameter in Abhängigkeit von den jeweiligen *Ausgangswerten* untersucht. Bei den *Probanden* fanden sich signifikant *stärkere Abnahmen* der Exhalatmenge ( $p = 0,025^*$ ) und des V'E ( $p = 0,040^*$ ) bei jeweils *höheren* Ausgangswerten. Diese Abnahme ist wahrscheinlich wiederum Zeichen einer „Gewöhnung“ an die Messanordnung: Probanden, die am ersten Messtag – bedingt durch die ungewohnte Situation beim Atmen am ECoScreen – „heftiger“ als gewöhnlich atmeten, ventilierten am zweiten Messtermin (einen Tag später) deutlich „ruhiger“. Zusammen mit der Tatsache, dass sich bei den Patienten keinerlei signifikante Zusammenhänge finden ließen, spricht das dafür, dass es bei der „Gewöhnung“ auch ganz maßgeblich auf die *Dauer* des Zeitintervalls zwischen zwei Messungen ankommt (bei den Patienten war dieses ja *bedeutend* länger). Man muss also bei der Beurteilung von Messungen am ECoScreen zumindest bei *physikalischen* Parametern die Häufigkeit von Messungen berücksichtigen und *vergleichbar lange* Messintervalle wählen. Die Konzentration von Total-Protein im Exhalat-Kondensat ist

dagegen vollkommen unabhängig von solcherlei „Gewöhnungseffekten“, eine Abhängigkeit wäre ja in diesem Falle auch kaum zu erklären.

In Kapitel 4.3.4 konnte schließlich gezeigt werden, dass *Mittelwerte* aus mehreren Messungen (hier aus jeweils drei Messwerten der Probanden gewonnen) zu einer *schärferen* Differenzierbarkeit eines bestimmten Kollektivs von einem anderen (hier der Patienten) beitragen können. Besonders deutlich wird dies bei den Unterschieden der Total-Proteinkonzentrationen im Exhalat: Aus dem t-Test kann man errechnen, dass ab zwei vergleichbaren Kollektiven von jeweils  $n = 22$  Probanden bzw. Patienten signifikante Unterschiede – nämlich höhere Total-Proteinkonzentrationen im Exhalat-Kondensat der Patienten – zu finden gewesen wären. Auch in diesem Zusammenhang wird wieder deutlich, dass weitere Studien mit größeren Kollektiven erforderlich sind, um dann durch eventuelle Mittelungen Fehler und Zufälle minimieren zu können.

#### **5.4 Serumwerte von Protein und TGF- $\beta$**

Für die Serumkonzentrationen von Total-Protein und TGF- $\beta$  konnte in Kapitel 4.4.2 gezeigt werden, dass diese jeweils *innerhalb* der beiden Kollektive von den demographischen Daten der Untersuchten praktisch unabhängig waren. Auch die Veränderungen der Werte der Patienten im Laufe der Strahlentherapie hingen in *keiner* Weise von Alter, Körpergröße, Gewicht oder BMI der Patienten ab. Damit können Veränderungen im Patientenkollektiv während der beiden Messzeitpunkte als Folgen der Krankheit und / oder Behandlung aufgefasst werden.

Die beiden gemessenen Serumparameter (Konzentrationen von Total-Protein und TGF- $\beta$ ) hängen dabei zu *keinem* Zeitpunkt in irgendeiner Weise *voneinander* ab, was auch aus der gegenwärtigen Studienlage nicht zu erklären wäre (Ergebnisse hierzu siehe Kapitel 4.4.3.1).

In Kapitel 4.4.3.2 wird deutlich, dass es vor Beginn der Strahlentherapie keine signifikanten Unterschiede der Serumkonzentrationen von Total-Protein und TGF- $\beta$  zwischen Patienten und Probanden gab. Bei alleiniger Betrachtung der Serumwerte zu diesem Zeitpunkt wäre es also nicht möglich, zwischen Gesunden und Kranken zu differenzieren. Für die Konzentrationsverläufe ergaben sich im Patientenkollektiv *keine* signifikanten Änderungen im Laufe der Strahlentherapie.

Anscher et al. fanden in einer prospektiven Studie mit acht Bronchial-Carcinom-Patienten *keine* Korrelation zwischen *absoluten* TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Blutserum und dem Risiko

für die Entwicklung oder gar ein Maß für den Schweregrad einer Strahlenpneumonitis [4]; sie vermuten, dass der Tumor eventuell selbst TGF- $\beta$  produzieren kann und daher die Serumkonzentrations-*Verläufe* entscheidend sind, nicht die Absolutwerte. In einer weiteren Studie mit 36 Patienten (Bronchial-Carcinom, Morbus Hodgkin, Thymom) postulieren sie, dass bei einer „TGF-Ratio“ ( $= \frac{\text{TGF-Konzentration (nach Ende der Strahlentherapie)}}{\text{TGF-Konzentration (vor Beginn der Strahlentherapie)}}$ )  $> 1$  grundsätzlich ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Strahlenpneumonitis besteht [3]. In einer dritten Veröffentlichung (über 73 Bronchial-Carcinom-Patienten) kamen sie zum Ergebnis, dass das Risiko zur Entwicklung einer Pneumonitis um ca. 90% verringert ist, falls die Serumkonzentrationen von TGF- $\beta$  im weiteren Follow-Up wieder auf das Ausgangsniveau oder gar darunter abfallen [2].

Auffallend ist, dass in unserer Studie sich bei den vier später an Pneumonitis erkrankten Patienten im Laufe Ihrer Strahlentherapie *keine* Erhöhungen der jeweiligen TGF- $\beta$ -Konzentrationen finden lassen. Im Gegenteil: in Tabelle 22 (Kapitel 4.4.3.3) wird deutlich, dass bei den Pneumonitis-Erkrankten die Konzentrationen an TGF- $\beta$  sogar *abnehmen* (im Durchschnitt um ca. 32,9%), während sie bei den Übrigen praktisch unverändert bleiben. Die Pneumonitis wurde im Durchschnitt  $43,5 \pm 27,6$  Tage nach dem zweiten Messtermin bei insgesamt vier Patienten klinisch manifest (dreimal mit Grad zwei, einmal mit Grad drei nach den CTC [25], siehe auch Kapitel 3.1.2.3). Eventuell ist dies eine Erklärung für die fehlenden TGF- $\beta$ -Anstiege im Serum der Patienten (siehe Kapitel 4.4.3.3), denn Anscher et al. berichten in einer Studie [4] über transiente Abfälle der TGF- $\beta$ -Konzentrationen innerhalb des *ersten* Monats nach Beginn der Bestrahlungen bei später an einer Pneumonitis Erkrankten; erst zu späteren Zeitpunkten waren deutliche Anstiege zu verzeichnen; in eben dieser Studie entwickelte ein Patient auch eine Pneumonitis trotz fehlender TGF- $\beta$ -Konzentrations-Erhöhung im weiteren Verlauf. Auch in weiteren Studien [2, 3] fanden sich Konzentrationsminima der Serum-TGF- $\beta$ -Konzentrationen ca. drei bis fünf Wochen nach Beginn der Strahlentherapie und erst danach deutliche Anstiege bei den später an einer klinisch relevanten Pneumonitis erkrankten Patienten. In [2], der Studie mit den meisten Patienten, wird sogar exakt das bei uns gefundene Phänomen beschrieben: Patienten *ohne* spätere Strahlenpneumonitis zeigten einen *geringeren* Abfall der Serum-TGF- $\beta$ -Konzentrationen als diejenigen, die im weiteren Verlauf eine Pneumonitis entwickelten (welche ein absolutes Minimum der Serum-TGF- $\beta$ -Konzentrationen ca. drei Wochen nach Beginn der Behandlung zeigten) – insofern sind unsere Ergebnisse also wieder als kongruent zu den bisherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Anscher zu betrachten. Wahrscheinlich

ist der Messzeitpunkt für die Bestimmung des TGF- $\beta$  im *Blutserum* also in unserer Studie „zu früh“ gewählt worden, so dass die TGF- $\beta$ -Konzentrations-Anstiege noch bevorstanden und somit die *transienten*, im Vergleich zu den Übrigen stärkeren, Konzentrations-*Abfälle* der späteren Pneumonitis-Erkrankten demonstriert wurden. Auch hier ist natürlich überdies wieder unser kleines Kollektiv von statistischem Nachteil (siehe auch das Beispiel des später Erkrankten ohne erkennbare TGF- $\beta$ -Konzentrations-Veränderungen aus der Studie von Anscher et al. [4], siehe weiter oben). In Tierversuchen konnten Rubin et al. [28] solche fluktuierenden Verläufe der Konzentrationen von TGF- $\beta$  auch schon direkt für das post mortem gewonnene Lungengewebe von bestrahlten Mäusen nachweisen, wobei hier sehr viel früher Konzentrationsminima auftraten (bereits innerhalb der ersten Tage) und sich später auch noch weitere Konzentrationsabfälle wiederholten (z. B. noch nach ca. 26 Wochen). Die genauen Zusammenhänge der Konzentrationsverläufe dieses Zytokins auf zellulärer Ebene und die Interaktionen mit anderen Mediatoren und verschiedensten Zelltypen bleiben derzeit noch in weiten Teilen ungeklärt, obwohl die Haupt-Produzenten von TGF- $\beta$  – Makrophagen und Typ-II-Pneumozyten – identifiziert zu sein scheinen (Rubin et al. [28], Übersichtsarbeit von Martin et al. [21]).

## 5.5 Serumwerte und Exhalatparameter

Es konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass bei den *Probanden* die Konzentrationen von Total-Protein und TGF- $\beta$  im Serum mit keinem der Exhalatparameter in signifikanten Zusammenhang gebracht werden können; insbesondere sind sie nicht von den Konzentrationen an Total-Protein im Exhalat abhängig (Kapitel 4.5.1.1, Tab. 23). Das Protein im Exhalat-Kondensat muss also bei *Gesunden* in irgendeiner Weise auf der alveolaren Oberfläche entstehen oder dorthin gebracht werden (etwa von Zellen sezerniert werden) und es ist sehr unwahrscheinlich, dass es – über irgendwelche stabilen Konzentrations-Gleichgewichte dorthin gelangt – ursprünglich aus dem Blutserum stammt. Eventuell sind dies Zeichen der *Stabilität* der alveolären „Blut-Luft-Schranke“ im *Normalzustand*.

Auch bei den *Patienten* sind *vor Beginn* der Strahlentherapie keine signifikanten Zusammenhänge zu finden, obwohl hier die Konzentrationen an Total-Protein im Exhalat-Kondensat bei denjenigen Patienten, die *vor* ihrer Strahlentherapie eher *hohe* Serum-TGF- $\beta$ -Werte aufweisen, ebenfalls eher *hoch* sind (Kapitel 4.5.1.1, Tab. 24).

Würde man die Überlegungen von Anscher et al. [4] – es handele sich bei diesen Patienten um solche, bei welchen der Tumor selbst TGF- $\beta$  freisetzt – zugrunde legen, könnte man mutmaßen, dass bei ihnen eine stärkere Schrankenstörung auf alveolärer Ebene (eventuell



eben durch die speziellen Eigenschaften oder Folgen des Tumors verursacht) vorliegen könnte. Dies bleibt aber bisher reine Spekulation und kann mit den vorliegenden Ergebnissen keinesfalls bewiesen werden.

Auch nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy finden sich bei den Patienten keinerlei *signifikante* Zusammenhänge zwischen Serum- und Exhalatparametern (Kapitel 4.5.1.2, Tab. 25), obwohl jetzt die Proteinkonzentration im Exhalat-Kondensat umso höher ist, je niedriger sie im Serum ist. Interessant ist allerdings, dass sie sich auch kontrovers zur TGF- $\beta$ -Konzentration verhält: je höher die Total-Proteinkonzentration im Exhalat-Kondensat ist, desto niedriger ist die Konzentration von TGF- $\beta$  im Blutserum. Würde eine am zweiten Messtermin eher hohe Proteinkonzentration im Exhalat-Kondensat tatsächlich eine alveoläre Schrankenstörung bedeuten (und dafür gibt es ja durchaus Anhalte, siehe Kapitel 5.3), so bestünde diese vor allem bei denjenigen Patienten, welche auch eine während der Strahlentherapie eher *sinkende* Konzentration von TGF- $\beta$  im Blutserum zeigen; jene entwickeln auch eher eine Strahlenpneumonitis (siehe Kapitel 5.4). Damit ließe sich ein Zusammenhang zwischen größerer Wahrscheinlichkeit, eine Strahlenpneumonitis zu entwickeln (= in dieser Studie eher *sinkende* TGF- $\beta$ -Konzentrationen im Serum), und stärker ausgeprägter Schrankenstörung (= eher *Erhöhung* der Total-Proteinkonzentration im Exhalat-Kondensat), herstellen. Auch diese Theorie ist mit den vorliegenden Ergebnissen natürlich wiederum nicht zweifelsfrei zu beweisen.

Stimmten diese Vermutungen, würden sich dann aber auch die Vermutungen von Gessner et al [13], die Bestimmung von Protein-Konzentrationen im Exhalat-Kondensat könnte nützlich zum Erkennen einer entzündlichen Schrankenstörung sein, in diesem *speziellen* Zusammenhang durchaus bestätigt finden.

In Kapitel 4.5.2 wurde auf Zusammenhänge zwischen Änderungen von Exhalat- und Serum-Parametern im Laufe der Strahlentherapie untersucht. Dabei fanden sich signifikante *Zunahmen* der Proteinkonzentrationen im *Serum* bei denjenigen Patienten, die auch einen *Anstieg* der Proteinkonzentration im *Exhalat* zeigten ( $p = 0,027^*$ , Tabelle 26). Eventuell zeigt sich hier bei den *Kranken* – im Gegensatz zu den Gesunden (siehe weiter oben) – doch eine Art „transzelluläres“ Proteingleichgewicht in dem Sinne, dass osmotisch unterschiedliche Drücke an den zellulären Grenzen „ausgeglichen“ werden sollen, eventuell sogar als aktive Prozesse unter zellulärer Beteiligung. Eventuell ist also bei *diesen* Patienten die alveoläre „Blut-Luft-Schranke“ empfindlich gestört. Auch diese Vermutungen bleiben bis auf weiteres

allerdings Spekulation und es kann durch die vorliegenden Ergebnisse lediglich in diese Richtung gemutmaßt werden.

Für die Patienten, die einen *Abfall* des TGF- $\beta$  im Serum zeigten, fand sich ein signifikant *erhöhtes* V'E ( $p = 0,0100^*$ , Tab. 26 aus Kapitel 4.5.2.1), wahrscheinlich als Zeichen einer nun gesteigerten Ventilationstätigkeit, und eine (ebenfalls signifikante) *Abnahme* der Proteinkonzentration im Exhalat ( $p = 0,043^*$ , siehe Tabelle 26 und Abbildung 8 rechts). Die Konzentrationsabfälle von TGF- $\beta$  im Serum sind ja in dieser Studie wohl eher Zeichen einer eventuell entstehenden Pneumonitis (siehe Kapitel 5.4). Allerdings passen die *sinkenden* Proteinkonzentrationen im Exhalat-Kondensat an dieser Stelle nicht zu der weiter oben verfassten Theorie, die ja annimmt, eine alveoläre Schrankenstörung äußere sich eher mit einer *steigenden* Proteinkonzentration im Kondensat. Aber auch hier gilt: Erstens ist alveoläre Schrankenstörung ja nicht *gleichbedeutend* mit Pneumonitis und zweitens wäre ja auch denkbar, dass eventuell lediglich Konzentrationsänderungen diagnostisch entscheidend sein könnten in dem Sinne, dass die „Regulation“ der „normalen“ Proteinmenge auf der alveolären Oberfläche in irgendeiner Weise gestört ist.

Beim Versuch der Bildung eines „Total-Protein-Quotienten“ (Kapitel 4.5.2.2) aus den jeweiligen Konzentrationen in Exhalat und Serum fand sich bei den Patienten vor Beginn der Strahlentherapie ein ca. 1,3fach erhöhter Quotient im Vergleich zu den Probanden, nach Erhalt einer Energiedosis von insgesamt 50Gy war dieser Quotient sogar 2,28mal so hoch wie bei den Probanden – der Anstieg des Quotienten beträgt also bei den Patienten während des beobachteten Zeitraums ca. 1,75. Allerdings war dieser offensichtliche Unterschied zwischen Probanden und Patienten im U-Test *nicht* signifikant, da er, wie weiter oben schon beschrieben, im Wesentlichen durch Ausreißer zustande kommt. Wieder ist hier natürlich unsere geringe Kollektivgröße von statistischem Nachteil – bei größeren Kollektiven kann sich ja durchaus eine Signifikanz ergeben. Eventuell sind diese Ausreißer ein Kollektiv, das es sich in größeren Studien mit deutlich mehr Patienten gegenüber den „Übrigen“ zu betrachten lohnen würde. Vielleicht wäre dann ein im Einzelfall *bedeutend* hoher derartiger Quotient als Zeichen einer vermehrten alveolären Schrankenstörung zu werten, ein Anstieg dieses Quotienten wäre damit ein Hinweis auf eine Verschlimmerung dieser Schrankenstörung.

Betrachtet man die *Ausgangskonzentrationen* von Total-Protein und TGF- $\beta$  im *Serum* und sucht nach statistischen Zusammenhängen mit den Veränderungen der Exhalatparameter (Kapitel 4.5.2.3), so finden sich zwei signifikante Beziehungen: die Patienten, welche ein höheres *Ausgangs*-TGF- $\beta$  im Serum zeigen, zeigen im Laufe der Therapie eine deutlich *vermehrte* Ventilation, erkennbar an einem signifikant *zunehmenden* V'E ( $p = 0,0067^{**}$ ), und

einen *Abfall* der Proteinkonzentration im Exhalat ( $p = 0,012^*$ ). Auch hier ist es wieder wahrscheinlich, anzunehmen, dass Patienten mit hohen Ausgangs-Serum-TGF- $\beta$ -Werten eine mangelnde Oxygenierung ihres Blutes durch signifikant gesteigerte Ventilation auszugleichen versuchen. Eine hohe *Ausgangs*-Konzentration von TGF- $\beta$  im Blutserum könnte aus dem Tumor bzw. der Tumorperipherie stammen, wie zum Beispiel Anscher et al. vermuten [4]. – Vielleicht ist eine *sinkende* Proteinkonzentration im Exhalat bei *diesen* Patienten Zeichen einer „Konsolidierung“ der alveolären Schrankenstörung, beziehungsweise reagieren sie (eventuell durch „Gewöhnung“ infolge lange bestehender Entzündungs- und Fibroseprozesse, erkennbar an den erhöhten *Ausgangs*-Konzentrationen von TGF- $\beta$  im Serum) nicht mit einer weiteren Verschlimmerung der Schrankenstörung in Folge der Therapie. Oder ein *Abfall* ist bei *diesen* Patienten ebenfalls Zeichen einer entzündlichen Schrankenstörung (vgl. weiter oben), es erfolgt aber in diesem speziellen Falle eher ein *Abfall* der Proteinkonzentration im Exhalat durch veränderte Konzentrationsverhältnisse von Alveolarraum, Zytoplasma der anliegenden Zellen und Blutserum. Jedoch sind diese Theorien wiederum nicht zu beweisen und mit dieser Studie *keinesfalls* zu beantworten.

Betrachtet man schließlich noch bei den Patienten die Änderungen der *Serum*werte im Vergleich zu den *Exhalat*parametern *vor Beginn* der Strahlentherapie, so finden sich bei denjenigen, die während der Therapie einen *Anstieg* der Serum-Proteinkonzentration zeigen, signifikant *höhere* Werte des V'E vor Beginn der Therapie. Dieser Zusammenhang ist augenblicklich nicht sinnvoll zu interpretieren. Für *Zunahmen* der Serum-TGF- $\beta$ -Konzentrationen finden sich (allerdings statistisch nicht signifikante) *höhere* Ausgangswerte von Exhalatmenge und V'E und eine eher niedrige Ausgangs-Exhalat-Proteinkonzentration (vgl. oben). Dies spricht eventuell dafür, dass diese Patienten schon vor Therapiebeginn eine insgesamt höhere Ventilation nötig haben, um eine ausreichende Oxygenierung ihres Blutes zu gewährleisten und damit pulmonal stärker vorgeschädigt sind.

Abschließend konnte noch gezeigt werden, dass bei den *Probanden* in bezug auf den *Zusammenhang* zwischen *Serum*- und *Exhalat*parametern eine Berücksichtigung der Durchschnittswerte der Exhalatparameter (aus 4.2) keinerlei neue Erkenntnisse bringen (siehe Kapitel 4.5.3). Man kann also auf Mehrfachmessungen einzelner Probanden bei der Ermittlung von „Normwerten“ für *Gesunde* sehr wahrscheinlich verzichten.

## 6 Zusammenfassung

Die thorakale Strahlentherapie birgt stets das Risiko der Entstehung einer Pneumonitis, deren frühe Diagnose äußerst wichtig ist. Die Exhalat-Kondensat-Methode ermöglicht es, die alveoläre Oberfläche wenig invasiv und beliebig oft wiederholbar untersuchen zu können.

Methodik, Variabilität der Exhalatparameter bei Gesunden, Unterschiede zwischen diesen und Patienten während einer thorakalen Strahlentherapie sollten untersucht, Zusammenhänge der Exhalatparameter mit Blutserumkonzentrationen von Total-Protein und TGF- $\beta$  geklärt werden und die Eignung der Methode zur Früherkennung einer Strahlenpneumonitis geprüft werden.

14 gesunde Probanden (an drei aufeinander folgenden Messtagen) und 14 Patienten (bei 0 und 50Gy Gesamt-Energiedosis) wurden untersucht. Jeder atmete 15 Minuten lang am Jaeger ECoScreen; Exhalatmenge und Atemvolumen (V'E) wurden bestimmt. Bei den Probanden wurde am ersten Messtag, bei den Patienten beides Mal Blutserum abgenommen. Exhalat- und Serumproben wurden eingefroren und später auf TGF- $\beta$  und Total-Protein untersucht. Die Statistik erfolgte mittels Probit- und Rangvarianzanalysen,  $\chi^2$ -Test, Spearman'scher Rangkorrelation, U-Test, Wilcoxon-Test und dem Test nach Olkin und Siotani.

Die Untersuchungen waren problemlos durchzuführen; die Messung des V'E war allerdings umständlich. Eine Bestimmung der Masse des Exhalat-Kondensats ist genauer als die des Volumens. TGF- $\beta$  konnte in keiner Kondensatprobe nachgewiesen werden, Total-Protein bei allen. Total-Protein und TGF- $\beta$  ließen sich im Serum messen.

Vier Patienten erkrankten an einer Pneumonitis, im Mittel  $43,5 \pm 27$  Tage nach Erhalt von 50Gy. Bei Gesunden bedeutet ein höheres V'E auch signifikant mehr Exhalat ( $p = 0,0004^{***}$ ); die Tag-zu-Tag-Variabilität aller Exhalatparameter war beträchtlich. Übungsphasen, weitere Standardisierungen und geeignete „Referenzkollektive“ sind für eine Etablierung der Methode unbedingt notwendig.

Patienten höheren Körpergewichts ( $p = 0,0072^{**}$ ) und mit einem größerem Body-Mass-Index (BMI,  $p = 0,0095^{**}$ ) produzierten vor Therapie signifikant mehr Exhalat-Kondensat. Es fand sich bei den Älteren am zweiten Messtermin signifikant mehr Protein im Exhalat ( $p = 0,045^*$ ), dies ist als Alters- und / oder Krankheitsfolge zu werten (in beiden Teilkollektiven findet sich kein solcher Zusammenhang), was wiederum die Notwendigkeit zur Messung möglichst gleichartiger „Referenzkollektive“ zur Standardisierung deutlich macht. Die Patienten hatten höhere Ausgangswerte aller drei Exhalatparameter als die Probanden. Bei den Gesunden fand sich infolge „Gewöhnung“ an die Messapparatur am zweiten Messtag

weniger Exhalat und ein geringeres V'E. Die Patienten hatten vor Beginn der Therapie mehr Protein im Exhalat, was eine bei vielen vorbestehende alveoläre Schrankenstörung vermuten lässt. Die Patienten hatten stets mehr Protein im Exhalat als die Probanden, dieses stieg während der Therapie um das 1,7fache an; trotzdem ließ sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Entwicklung einer Strahlenpneumonitis finden. Bei den Gesunden fanden sich bei jeweils höheren Ausgangswerten auch signifikant stärkere Abnahmen der Exhalatmenge ( $p = 0,025^*$ ) und des V'E ( $p = 0,040^*$ ) – es kommt also bei den „Gewöhnungseffekten“ auf die Zeitdauer des Messintervalls an. Mittelwerte aus mehreren Messungen trugen zu einer schärferen Abgrenzung der zwei Kollektive bei. Bei jeweils  $n = 22$  Personen pro Kollektiv wären mehr signifikante Unterschiede zu finden gewesen, es sind also weitere Untersuchungen mit größeren Kollektiven nötig.

Die Serumkonzentrationen vom Protein und TGF- $\beta$  waren von den demographischen Daten unabhängig und hingen niemals voneinander ab. Die TGF- $\beta$ -Serumkonzentrationen der an Pneumonitis erkrankten Patienten nahmen im Laufe der Strahlentherapie im Durchschnitt um 32,9% ab, während sie sich bei den übrigen praktisch nicht änderten; wahrscheinlich handelt es sich hier um typische transiente Abfälle von TGF- $\beta$ .

Bei den Probanden waren Serum- und Exhalatparameter unabhängig voneinander. Bei den Patienten war mehr Protein im Exhalat-Kondensat, wenn bei 0Gy mehr Serum-TGF- $\beta$  vorhanden war. Nach 50Gy war umso mehr Protein im Kondensat, je niedriger es im Serum war. Bei Patienten, die im Laufe der Therapie mehr Protein im Exhalat hatten, fand sich auch eine signifikant steigende Proteinkonzentration im Serum ( $p = 0,027^*$ ). Sinkt TGF- $\beta$  im Serum während der Therapie ab (eher steigendes Pneumonitis-Risiko in dieser Studie), dann steigt V'E ( $p = 0,0100^*$ ) und sinkt das Protein im Exhalat ( $p = 0,043^*$ ) signifikant. Bei 0Gy war der Protein-Quotient aus Exhalat und Serum bei den Patienten 1,3mal höher und stieg bis 50Gy um das 1,75fache auf das 2,28fache der Probanden-Ausgangswerte an. Ein hohes TGF- $\beta$  im Serum bei 0Gy ging mit einem signifikant steigenden V'E ( $p = 0,0067^{**}$ ) und sinkenden Protein im Exhalat ( $p = 0,012^*$ ) im Laufe der Therapie einher. Steigt Protein im Serum während der Therapie an, fand sich ein eher höheres V'E vor Beginn der Therapie. Waren Exhalatmenge und V'E vor Therapie eher hoch, stieg TGF- $\beta$  im Serum bis 50Gy eher an. Die Berücksichtigung der Durchschnittswerte von drei Messtagen brachte für die Ermittlung von „Normwerten“ bei Gesunden keine neuen Erkenntnisse.

## 7 Literatur

1. **Abratt RP, Morgan GW (2002)**  
Lung toxicity following chest irradiation in patients with lung cancer.  
Lung Cancer 2002; 35(2): 103-109
2. **Anscher MS, Kong FM, Andrews K, Clough R, Marks LB, Bentel G, Jirtle RL (1998)**  
Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 41(5): 1029-1035
3. **Anscher MS, Kong FM, Marks LB, Bentel GC, Jirtle RL (1997)**  
Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced pneumonitis.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 37(2): 253-258
4. **Anscher MS, Murase T, Prescott DM, Marks LB, Reisenbichler H, Bentel GC, Spencer D, Sherouse G, Jirtle RL (1994)**  
Changes in plasma TGF beta levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 30(3): 671-676
5. **Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ (2001)**  
Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke.  
Thorax 2001; 56(6): 456-461
6. **Becher G, Winsel K, Beck E, Neubauer G, Stresemann E (1997)**  
Breath condensate as a method of noninvasive assessment of inflammation mediators from the lower airways.  
Pneumologie 1997; 51(2): 456-459
7. **Carpenter CT, Price PV, Christman BW (1998)**  
Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS.  
Chest 1998; 114(6): 1653-1659

8. **Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A (1996)**  
Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease.  
Am J Respir Crit Care Med 1996; 154(3): 813-816
9. **Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, Gare M, Lin W, Sun F (2002)**  
Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates.  
Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(5): 663-669
10. **Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, Rudinski K, Fedoulov A, Karabanov A, Barnes PJ (2001)**  
Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients.  
Chest 2001; 120(4): 1136-1139
11. **Erich Jaeger GmbH (1999)**  
Eco-Screen Gebrauchsanweisung.  
2. Ausgabe, April 1999
12. **Ferreira IM, Hazari MS, Gutierrez C, Zamel N, Chapman KR (2001)**  
Exhaled Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Effects of inhaled beclomethasone.  
Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(6): 1012-1015
13. **Gessner C, Kuhn H, Seyfarth HJ, Pankau H, Winkler J, Schauer J, Wirtz H (2001)**  
Factors influencing breath condensate volume.  
Pneumologie 2001; 55(9): 414-419
14. **Gibson PG, Henry RL, Thomas P (2000)**  
Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate.  
Eur Respir J 2000; 16(5): 1008-1015
15. **Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ (2000)**  
Increased Nitrotyrosine in Exhaled Breath Condensate of Patients with Asthma.  
Am J Respir Crit Care Med 2000; 162(4): 1273-1276

16. **Hernando ML, Marks LB, Bentel GC, Zhou SM, Hollis D, Das SK, Fan M, Munley MT, Shafman TD, Anscher MS, Lind PA (2001)**  
Radiation-induced pulmonary toxicity: a dose-volume histogram analysis in 201 patients with lung cancer.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 51(3): 650-659
17. **Hunt JF, Erwin E, Palmer L, Vaughan J, Malhotra N, Platts-Mills TA, Gaston B (2002)**  
Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium.  
Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(1): 101-7
18. **Kharitonov SA, Barnes PJ (2001)**  
Exhaled markers of inflammation.  
Curr Opin Allergy Clin Immunol 2001; 1(3): 217-24
19. **Kharitonov SA, Barnes PJ (2002)**  
Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath.  
Biomarkers 2002; 7(1): 1-32
20. **Lärstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Torén K (2002)**  
Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.  
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 766(1): 107-14
21. **Martin M, Lefaix J, Delanian S (2000)**  
TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 47(2): 277-290
22. **McDonald S, Rubin P, Phillips TL, Marks LB (1995)**  
Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31(5): 1187-1203
23. **Movsas B, Raffin TA, Epstein AH, Link CJ Jr. (1997)**  
Pulmonary radiation injury.  
Chest 1997; 111(4): 1061-1076



24. **Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I (2001)**  
Collection and Analysis of Exhaled Breath Condensate in Humans.  
Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(5): 731-737
25. **National Cancer Institute, Rockville, Maryland, USA (1998)**  
Common Toxicity Criteria.  
Version 2.0, zweite Auflage vom 30. April 1999
26. **Nowak D, Kalucka S, Bialsiewicz P, Krol M (2001)**  
Exhalation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects.  
Free Radic Biol Med 2001; 30(2): 178-186
27. **Reinhold P, Becher G, Rothe M (2000)**  
Evaluation of the measurement of leukotriene B<sub>4</sub> concentrations in exhaled condensate as a noninvasive method for assessing mediators of inflammation in the lungs of calves.  
Am J Vet Res 2000; 61(7): 742-749
28. **Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN (1995)**  
A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 33(1): 99-109
29. **Schleiss MB, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnussen H, Jorres RA (2000)**  
The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate.  
Eur Respir J 2000; 16(6): 1115-1118

## 8 Tabellenanhang

Probanden					
Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Gewicht [kg]	Größe [cm]	
1	23	w	56	170	
2	24	m	55	168	
3	23	m	78	190	
4	24	w	52	165	
5	22	w	57	164	
6	29	m	105	185	
7	25	w	76	181	
8	23	m	80	198	
9	24	m	86	185	
10	22	w	53	158	
11	24	m	92	189	
12	23	m	67	182	
13	23	m	81	193	
14	23	w	56	170	
MW ±ST	23,7 ±1,7	—	71,0 ±16,2	178,4 ±12,0	

**Tabelle 32.** Demographische Daten aller 14 **Probanden** der Studie. w = weiblich, m = männlich, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.

<b>Patienten</b>				
Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Gewicht [kg]	Größe [cm]
1	44	m	78	176
2	73	m	80	176
3	56	m	75	173
4	81	m	103	180
5	51	m	90	176
6	55	w	65	162
7	70	m	79	174
8	56	w	80	162
9	64	m	80	163
10	58	m	107	174
11	67	m	92	183
12	66	m	75	170
13	77	m	68	176
14	49	w	43	158
MW ±ST	61,9 ±10,6	—	79,6 ±15,3	171,6 ±7,3

**Tabelle 33.** Demographische Daten aller 14 **Patienten** der Studie. w = weiblich, m = männlich, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.

<b>Probanden</b>						
Nr.	Exhalatparameter			Serumkonzentrationen		
	Exhalatmenge [µg]	Exhalatmenge [µl]	V'E in 15 min. [l]	Protein [µg/ml]	Protein [mg/ml]	TGF-β [ng/ml]
1	2567	2540	154,5	5,818	72,02	14,50
2	2164	2170	127,5	6,979	64,41	72,98
3	2246	2200	135,0	7,260	73,43	56,87
4	2143	2140	138,0	7,403	73,34	24,54
5	3468	3520	243,0	7,109	73,83	39,87
6	3218	3220	207,0	7,757	72,09	41,81
7	2272	2360	132,0	6,428	75,62	45,60
8	3352	3320	217,5	5,488	75,04	29,10
9	2319	2340	138,0	3,130	67,76	48,58
10	2452	2590	150,0	4,303	74,41	40,28
11	2562	2580	169,5	8,249	71,91	45,63
12	3135	3180	202,5	9,135	77,67	20,28
13	2011	1980	81,0	4,575	68,11	25,36
14	1748	1720	106,5	7,563	70,53	54,66
MW	2546,9	2561,4	157,3	6,514	72,15	40,00
±ST	±517,9	±528,4	±43,8	±1,605	±3,38	±15,44

**Tabelle 34.** Messwerte aller 14 **Probanden** der Studie am **1. Messtermin**. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.

<b>Probanden</b>				
Nr.	Exhalatmenge		Exhalatparameter	
	[ $\mu\text{g}$ ]	[ $\mu\text{l}$ ]	V'E in 15 min. [l]	Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1	2251	2260	156,0	5,716
2	2342	2320	135,0	4,604
3	2161	2160	127,5	7,308
4	2370	2420	132,0	8,305
5	2345	2350	129,0	8,341
6	2105	2080	112,5	7,185
7	2346	2330	153,0	6,976
8	3138	3020	225,0	3,529
9	2582	2610	157,5	4,495
10	2049	2130	126,0	3,990
11	3113	3060	186,0	7,929
12	2905	2890	186,0	9,327
13	2034	1980	157,5	5,122
14	1812	1760	105,0	5,666
MW $\pm$ ST	2396,6 $\pm$ 389,2	2383,6 $\pm$ 373,5	149,1 $\pm$ 31,5	6,321 $\pm$ 1,763

**Tabelle 35.** Messwerte aller 14 **Probanden** der Studie am **2. Messtermin**. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.

<b>Probanden</b>				
Nr.	Exhalatmenge		Exhalatparameter	
	[ $\mu\text{g}$ ]	[ $\mu\text{l}$ ]	V'E in 15 min. [l]	Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1	1896	1940	133,5	5,891
2	2414	2430	141,0	6,702
3	2282	2280	126,0	5,698
4	2305	2350	126,0	7,596
5	2405	2480	130,5	4,778
6	2571	2580	139,5	6,832
7	2265	2240	136,5	5,923
8	3097	3100	226,5	3,898
9	2954	2930	171,0	2,760
10	2366	2580	145,5	4,060
11	2823	2800	177,0	4,744
12	2568	2580	159,0	4,507
13	2139	2090	225,0	8,451
14	1894	1860	123,0	7,694
MW $\pm$ ST	2427,0 $\pm$ 342,2	2445,7 $\pm$ 343,1	154,3 $\pm$ 33,2	5,681 $\pm$ 1,587

**Tabelle 36.** Messwerte aller 14 **Probanden** der Studie am **3. Messtermin**. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.

<b>Patienten</b>						
Nr.	Exhalatparameter			Serum		
	Exhalatmenge [µg]	Exhalatmenge [µl]	V'E in 15 min. [l]	Protein [µg/ml]	Protein [mg/ml]	TGF-β [ng/ml]
1	2891	2940	171,0	2,894	74,68	23,51
2	2609	2590	160,5	5,909	70,62	23,51
3	2319	2280	148,5	13,239	69,72	21,47
4	2738	2710	315,0	6,888	77,09	37,55
5	2971	3005	187,5	7,956	74,37	18,59
6	1987	1930	133,5	9,758	75,97	55,96
7	2109	2080	118,5	15,144	78,79	75,29
8	2649	2770	175,5	9,413	68,29	15,18
9	2611	2550	148,5	6,150	82,80	22,97
10	3363	3350	177,0	7,584	69,10	36,54
11	3173	3550	172,5	8,014	63,92	19,61
12	3014	2960	186,0	4,508	61,60	31,01
13	3262	3250	153,0	12,717	75,77	32,89
14	2181	2150	111,0	10,105	63,42	67,58
MW	2705,4	2722,5	168,4	8,591	71,87	34,40
±ST	±420,8	±474,7	±46,6	±3,304	±6,02	±18,20

**Tabelle 37.** Messwerte aller 14 **Patienten** der Studie am **1. Messtermin (vor Beginn der Strahlentherapie)**. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.

<b>Patienten</b>						
Nr.	Exhalatparameter			Serum		
	Exhalatmenge [µg]	Exhalatmenge [µl]	V'E in 15 min. [l]	Protein [µg/ml]	Protein [mg/ml]	TGF-β [ng/ml]
1	2682	2710	174,0	4,281	81,69	22,91
2	2731	2730	165,0	7,612	69,55	38,80
3	2404	2260	142,5	88,698	69,77	54,58
4	4388	4520	330,0	7,324	78,12	24,35
5	3465	3720	201,0	5,818	75,26	54,16
6	2424	2610	153,0	9,013	71,42	40,81
7	2681	2940	150,0	6,859	74,86	22,78
8	2387	2490	153,0	25,069	71,33	29,16
9	2615	2590	157,5	6,595	81,35	45,73
10	3243	3560	193,5	6,565	67,90	14,79
11	2920	2840	180,0	10,018	65,61	20,68
12	3736	4240	256,5	12,303	74,81	19,06
13	2942	2942	138,0	7,121	72,52	22,87
14	3323	3880	189,0	6,477	63,97	43,73
MW	2995,8	3145,1	184,5	14,554	72,73	32,46
±ST	±557,0	±680,2	±50,0	±21,135	±5,16	±12,98

**Tabelle 38.** Messwerte aller 14 **Patienten** der Studie am **2. Messtermin (nach Erhalt einer Gesamt-Energiedosis von 50Gy)**. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.



## **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Michael Schmidt herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die stets freundliche Betreuung während der gesamten Durchführung der praktischen Arbeiten und die Korrektur der schriftlichen Abfassung in all ihren Entstehungsstadien.

Herrn Professor Dr. med. Georg Ertl, Direktor der Medizinischen Universitätsklinik der Universität Würzburg, danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit im Schwerpunkt Pneumologie der Medizinischen Klinik durchzuführen und für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Professor Dr. med. Michael Flentje, Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg, bedanke ich mich dafür, geeignete Patienten aus seiner Klinik für die Studie rekrutieren zu dürfen.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Jochen Willner, Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg, Frau Dr. med. Claudia Anhut, Assistentin der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg, und Frau Dr. med. Julia Schönberger, Assistentin der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg, und insbesondere allen Mitarbeitern der Pneumologischen Abteilung, allen voran Frau Margarete Wechner und Frau Karin Kretzer, für die allzeit hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten.

Frau Dr. rer. nat. Imme Haubitz, Diplom-Mathematikerin, danke ich für die Beratung bei der Auswahl der statistischen Tests.

Ganz besonders herzlich will ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihren liebevollen Rückhalt zu jeder Zeit bedanken.

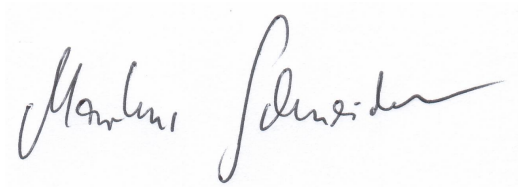
## Lebenslauf

Name: Schneider  
Vorname: Markus  
geboren am: 19. Februar 1977  
in Schwäbisch Hall  
wohnhaft: Hilpert 3  
74541 Vellberg

Familienstand: ledig

Ausbildung: 09/1983 – 08/1987 Grundschule Vellberg-Großaltdorf  
09/1987 – 06/1996 Gymnasium bei St. Michael,  
Schwäbisch Hall  
27.06.1996 allgemeine Hochschulreife  
1.09.1996 – 30.09.1997 Zivildienst, Ev. Diakonie-Krankenhaus,  
Schwäbisch Hall  
10/1997 – 05/2004 Studium der Humanmedizin, Bayerische  
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
15.09.1999 Ärztliche Vorprüfung  
29.08.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
31.03.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
26.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1.06.2004 Vorläufige Approbation als Arzt

Würzburg, den 4. Juni 2004



Markus Schneider