

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

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dennis Nowak

**Analyse obstruktiver Atemwegserkrankungen:  
Bedeutung inhalativer Umweltnoxen, nicht-invasiver Marker  
von Entzündung und Indikatoren biologischer Alterung**

vorgelegt von

Dr. med. Stefan Karrasch

2019

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	3
2.	Hintergrund .....	3
3.	Ergebnisse und Diskussion .....	9
3.1.	Atemzugbezogene intrapulmonale Deposition feiner Partikel in Abhängigkeit vom Spontan-Atemmuster im Tiermodell für eine erwachsene Lunge .....	10
3.2.	Die Bedeutung des Lungenreifegrades für die atemzugbezogene intrapulmonale Deposition feiner Partikel im Tiermodell von der unreifen bis zur adulten Lunge .....	11
3.3.	Lungenphysiologische und systemische Effekte von Laserdruckeremissionen im Rahmen einer kontrollierten humanen Expositionsstudie .....	13
3.4.	Psychologische und kognitive Effekte von Laserdruckermmissionen im Rahmen einer kontrollierten humanen Expositionsstudie .....	15
3.5.	Zusammenhang spirometrischer Messgrößen mit der Telomerenlänge von Blutleukozyten als Indikator des biologischen Alters .....	16
3.6.	Vergleich von Kenngrößen der Lungenfunktion als Indikatoren eines sogenannten Lungenalters .....	18
3.7.	Normalwerte für exhalierendes Stickstoffmonoxid und ihre Einflussfaktoren in der Allgemeinbevölkerung .....	20
3.8.	Referenzwerte der Impulsozillometrie im fortgeschrittenen Lebensalter .....	21
3.9.	Spirometrische Referenzwerte für das fortgeschrittene Lebensalter .....	23
3.10.	Bedeutung unterschiedlicher spirometrischer Kriterien für die abgeleitete Prävalenz der COPD und ihrer Komorbiditäten in der Allgemeinbevölkerung .....	24
4.	Zusammenfassung und Ausblick .....	26
5.	Literaturverzeichnis .....	28
6.	Originalarbeiten der Habilitationsschrift .....	31

## **1. Einleitung**

Die vorgelegte Habilitationsschrift ist kumulativ und basiert auf den im Folgenden dargestellten Arbeiten, die als publizierte Originalarbeiten im Anhang angefügt sind. Ihr Ziel ist es, zur primären und sekundären Prävention arbeits- und umweltbedingter obstruktiver Atemwegserkrankungen beizutragen. Hierzu wurden erstens die Bedeutung und klinischen Effekte ausgewählter beruflicher oder umweltbezogener inhalativer Noxen untersucht, zweitens Marker und Indikatoren einer induzierten Entzündung und biologischen Alterung analysiert, die auf nicht-invasive Weise gewonnen werden können, und drittens die für eine Bewertung erfordernten Normbereiche solcher Marker näher definiert. Methodisch wurden zu diesem Zweck vier einander ergänzende Ansätze gewählt: tierexperimentell (Studien 1 und 2), humanexperimentell (Studien 3 und 4), zellbiologisch (Studie 5) und lungenfunktionsdiagnostisch (Studien 6 bis 10). Leitend war das Bestreben, potentielle Gefährdungen durch inhalative Noxen frühzeitig auf praktikable Weise zu erkennen.

## **2. Hintergrund**

Die obstruktiven Atemwegserkrankungen Asthma bronchiale und COPD zeichnen sich in Deutschland, wie auch international, durch eine hohe Prävalenz und erhebliche arbeitsmedizinische sowie gesundheitsökonomische Bedeutung aus (Mannino und Buist 2007, Croisant 2014, Ochmann und Nowak 2014). So werden etwa 10–25% aller Asthmaerkrankungen bei Erwachsenen und 15–20% aller COPD-Erkrankungen auf berufliche Belastungen zurückgeführt (Baur et al. 2011, Ochmann und Nowak 2014). Sie bedeuten darüber hinaus für die betroffenen Patienten eine relevante und häufig progrediente Minderung ihrer Lebensqualität (Mannino und Buist 2007, Croisant 2014). Zugleich sind die therapeutischen Optionen trotz intensiver Forschungsaktivität nach wie vor limitiert. Insbesondere für die COPD existieren keine im eigentlichen Sinne langfristig kurativen Ansätze, während für das Asthma bronchiale die Situation günstiger erscheint. Der arbeits- und umweltmedizinischen Prävention kommt daher nach wie vor eine große Bedeutung zu.

Sowohl Asthma als auch COPD werden als Sammelbegriffe für heterogene Krankheitsbilder verstanden, deren Implikationen weit über das respiratorische System hinausreichen können. Ihre Pathogenese wird möglicherweise bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Rahmen der individuellen Lungenentwicklung auf den Weg gebracht (Postma et al. 2015), lange bevor sich die Erkrankungen klinisch

manifestieren. Darüber hinaus können die Diagnose und Charakterisierung des jeweiligen Phänotyps eine Herausforderung darstellen, insbesondere, wenn invasive oder anderweitig belastende Untersuchungstechniken vermieden werden sollen. Die Beurteilung und Quantifizierung eines Zusammenhangs mit arbeits- oder umweltbezogenen Noxen wird ferner dadurch kompliziert, dass zumindest die COPD in der Regel erst in fortgeschrittenem Lebensalter manifest wird und damit eine Interaktion mit natürlichen und induzierten biologischen Alterungsprozessen anzunehmen ist.

In der westlichen Welt stellt das Zigarettenrauchen den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung einer COPD dar, während berufs- bzw. umweltbedingte Ursachen von geringerer Bedeutung sind, jedoch die Symptomatik und Prognose in bedeutsamer Weise beeinflussen können. Beim Asthma bronchiale spielt die Exposition gegenüber Allergenen eine Rolle, deren Effekt auf die Sensibilisierung und die Auslösung von Symptomen durch berufliche oder Umwelteinflüsse moduliert werden kann. Zu diesen Einflüssen gehört ein ganzes Spektrum von Entitäten, das von mikrobiologischen Faktoren bis zu Luftschadstoffen reicht.

Neben gasförmigen Schadstoffen wie Ozon kommt in diesem Zusammenhang dem Feinstaub in der Umwelt sowie am Arbeitsplatz eine besondere Bedeutung zu. Dieser gelangt, abhängig von der betrachteten Größenfraktion, bis in die Alveolen und kann im Falle ultrafeiner Partikel sogar das Gewebe durchqueren (Translokation). Generell fällt für partikuläre Belastungen auf, dass ihre Effekte in stärkerem Maße als diejenigen gasförmiger Schadstoffe über die Lunge hinausreichen und auch systemische Effekte sowie Effekte auf andere Organe umfassen. Aus diesem Grunde ist eine präzise Abschätzung der deponierten Dosis von Bedeutung, die sowohl vom Atemmuster als auch vom Entwicklungszustand der Lunge abhängen kann und auf deren Basis kumulative Dosen im Hinblick auf berufliche oder Umweltexpositionen abgeschätzt werden können. Die ersten beiden Arbeiten widmen sich dieser Frage mit einem tierexperimentellen Ansatz (Studien 1 und 2).

Über die in der Umwelt verbreiteten Schadstoffe hinaus werden auch speziellere inhalative Noxen als mögliche Krankheitsauslöser diskutiert. Insbesondere in Zusammenhang mit verschiedenen an Büroarbeitsplätzen berichteten gesundheitlichen Beschwerden haben Emissionen von Laserdruckern bzw. -kopierern eine besondere Beachtung erfahren; allerdings sind die diskutierten Effekte nicht in zureichendem Maße durch wissenschaftliche Daten belegt. In der Literatur dominieren Fallberichte und Beobachtungsstudien mit ihren naturgemäßen Einschränkungen, die einer teils erheblichen methodologischen Kritik ausgesetzt sind (Jörres et al. 2017). Angesichts der verbreiteten öffentlichen

Aufmerksamkeit erscheint eine den Standards genügende arbeitsepidemiologische Studie etwa auf der Basis von Symptomen nicht mehr sauber durchführbar. Erforderlich sind daher andere methodische Ansätze, vor allem solche experimenteller Natur. Dies steht in Einklang mit der Forderung, grundsätzlich epidemiologische Ergebnisse durch humanexperimentelle Daten zu stützen, die plausible pathophysiologische Mechanismen bei nicht zu realitätsfernen Konzentrationen beschreiben. Um derartige Mechanismen zu eruieren, erfolgte eine großangelegte Expositionsstudie gegenüber den Emissionen von handelsüblichen Laserdruckern, die in standardisierter Weise dargeboten wurden und deren Effekte mit einem breit gefächerten Satz von physiologischen, biochemischen, symptombezogenen, psychologischen und psychometrischen Messgrößen erfasst wurden. Die Studien 3 und 4 legen die Ergebnisse im Detail dar und diskutieren ihre Implikationen.

Wie oben erwähnt, ist insbesondere bei der COPD im Hinblick auf die Frage möglicher Verursachung durch berufliche oder Umweltexpositionen eine Wechselwirkung des Krankheitsgeschehens mit dem biologischen Alterungsprozess anzunehmen. In der Tat ist aus zellbiologischen experimentellen Daten sowie Befunden an Lungenzellen von Patienten mit COPD bzw. Lungenemphysem bekannt, dass diese Patienten Zeichen einer vorzeitigen biologischen Alterung zeigen, die etwa auf die Noxe Zigarettenrauch zurückzuführen ist. Diese vorzeitige Alterung ist analog derjenigen, die bei einer Vielzahl anderer chronischer Erkrankungen beschrieben wurde (Kennedy et al. 2014). Ein gut etablierter und zugleich für größere Analysen praktikabler Marker der biologischen Alterung ist die Telomerenlänge peripherer Blutleukozyten. Die Telomeren sind bei Patienten mit COPD im Mittel verkürzt (Cordoba-Lanus et al. 2017), interessanterweise allerdings nicht, wenn diese den Genotyp des Alpha-1-Antitrypsin-Mangels aufweisen (Saferali et al. 2014, Lucke 2015). Dies legt die Annahme nahe, dass es verschiedene pathogenetische Typen der COPD gibt, die sich in Alterungsmarkern unterscheiden. Die große Mehrzahl der Patienten mit COPD weist allerdings keinen Alpha-1-Antitrypsin-Mangel auf. Neben den Symptomen ist eine mehr oder weniger irreversible Einschränkung der Lungenfunktion für die COPD charakteristisch und wesentliche Grundlage ihrer Diagnose (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2019). Um den Zusammenhang zwischen Lungenfunktions-einschränkung und Telomerenlänge zu untersuchen, bedarf es umfänglicher Stichproben in Anbetracht der Heterogenität der Erkrankung und Einflussfaktoren. Aus diesem Grunde wurden die Proben von 14 großen bevölkerungsbezogenen

Kohortenstudien zusammengefasst und in Hinsicht auf die Telomerenlänge mit einem einheitlichen Verfahren analysiert (Studie 5).

In der klinischen Praxis steht die Telomerenlänge allerdings normalerweise nicht als Biomarker zur Verfügung. Stattdessen ist es ein verbreitetes Vorgehen, die Lungenfunktion als Marker heranzuziehen, in Übereinstimmung mit dem Ansatz der vorstehend beschriebenen Studie. Hierzu dient in der Regel die Einschränkung des forcierten Einsekundenvolumens ( $FEV_1$ ) gegenüber dem altersgerechten Normwert, und das Ausmaß dieser Einschränkung wird als Indikator einer vorgezogenen Lungenalterung gewertet. Diese Interpretation als „Lungenalter“ wird insbesondere bei der Raucherentwöhnung als Motivationshilfe genutzt und ist teilweise in der Ergebnisausgabe von Spirometrie-Systemen implementiert. In Anbetracht der Tatsache, dass  $FEV_1$  ein zwar summarischer, jedoch spezieller und ausgewählter Marker ist, stellt sich die Frage, ob er eine vorzeitige Alterung der Lunge hinreichend genau beschreibt. Konkret impliziert dies die Frage, ob sich andere Parameter der Lungenfunktion, die andere Eigenschaften des respiratorischen Systems beschreiben, parallel verhalten und man tatsächlich summarisch von einem „Lungenalter“ sprechen kann. Dies wurde in einer detaillierten Analyse zweier ausgewählter Personengruppen fortgeschrittenen Alters untersucht (Studie 6).

Die Definition des Lungenalters hängt wesentlich von der Verfügbarkeit valider Sollwerte der Lungenfunktion ab, anhand derer man die beobachtete Einschränkung quantifiziert. Darüber hinaus sind verlässliche Referenzwerte essentiell, um die Effekte beruflicher oder umweltbezogener inhalativer Noxen auf einzelne Personen zu erkennen. Zwar ist zu diesem Zweck die Langzeitbeobachtung des individuellen Verlaufs, etwa im Rahmen arbeitsmedizinischer Vorsorge, das optimale Verfahren, jedoch besteht diese Möglichkeit oft nicht, und ferner ist unter den Bedingungen der klinischen Praxis selbst in longitudinalen Messungen keineswegs eine gleichbleibende Qualität gesichert. Daher kommt Querschnittsstudien nach wie vor eine große Bedeutung zu, in denen die Zusammenhänge mit stattgehabten Expositionen analysiert und Feststellungen darüber getroffen werden, inwieweit Abweichungen als pathologisch einzustufen sind. Neben der Verfügbarkeit breit anwendbarer Normwerte erfordert dies eine sorgfältige Definition solcher Abweichungen, die als pathologisch gelten können.

Die Diagnostik von Atemwegserkrankungen, insbesondere solcher allergischer Natur, beinhaltet heute neben der Lungenfunktion vor allem die Messung des exhalierten Stickstoffmonoxids ( $FeNO$ ) als Marker einer Th2-assoziierten Entzündung. Dieser mit vergleichsweise geringem Aufwand zu erhebende Messwert wird unter anderem als möglicher Indikator für das Auftreten einer

Atemwegsüberempfindlichkeit im Rahmen beruflicher Expositionen gegenüber sensibilisierenden Arbeitsstoffen diskutiert (Tossa et al. 2010) und verbessert nach jüngeren Erkenntnissen auch die Diagnostik des allergischen Berufsasthmas im Rahmen arbeitsplatzbezogener Inhalationstests (Engel et al. 2018). Daneben wurde die FeNO-Bestimmung auch in der erwähnten humanen Expositionsstudie gegenüber Laserdruckeremissionen eingesetzt (Studien 3 und 4). Auch wenn in der klinischen Praxis bislang in der Regel fixe diagnostische Cutoff-Werte für FeNO angenommen werden, bedarf eine optimale, wissenschaftlichen Kriterien genügende diagnostische Anwendung wohldefinierter Normwerte, die so weit als möglich die Abhängigkeit von anthropometrischen Charakteristika (z. B. Körpergröße, Alter, Geschlecht) und weiteren Einflussfaktoren berücksichtigen; derartige Normwerte wurden in einer bevölkerungsbezogenen Kohorte erhoben (Studie 7).

Ein nicht zu unterschätzendes Problem stellt bei der Spirometrie das Erfordernis einer adäquaten Mitarbeit des Patienten dar. Während in Studien häufig ausgewählte Patienten untersucht werden und ausreichend Zeit für Wiederholungsmessungen zur Verfügung steht, sind Erhebungen in der klinischen Praxis in stärkerem Maße mit mangelhaften Messungen konfrontiert. Das gilt auch für sehr junge oder sehr alte Patienten sowie für Patienten mit Verständnisproblemen. Aus diesem Grunde sind alternative Messverfahren der Lungenfunktion, die nur geringe Mitarbeit erfordern, von zunehmendem Interesse. Zu diesen Verfahren gehört die Impulsoszillometrie (IOS), bei der der Atemwegswiderstand durch extern dem Atemtrakt aufgeprägte Druckschwankungen bestimmt wird. Sie bietet gegenüber der bodyplethysmographischen Bestimmung des Atemwegswiderstandes zudem den Vorteil, dass sie aufgrund der geringen Größe der technischen Ausrüstung mobil und damit auch unmittelbar am Arbeitsplatz einsetzbar ist. Die Ergebnisse der IOS müssen wie alle anderen Lungenfunktionswerte mit Referenzwerten verglichen werden; derartige Werte wurden in einer umfangreichen Untersuchung an einer bevölkerungsbezogenen Stichprobe erhoben, wobei Patienten mit hohem Alter in besonderem Maße berücksichtigt wurden (Studie 8).

Falls gültige Spirometrie-Ergebnisse vorliegen, stellt sich gegenwärtig zunehmend die Frage, welche Sollwerte bei Patienten fortgeschrittenen Lebensalters in Mitteleuropa angemessen sind. Im Rahmen pneumologischer Begutachtung ist dies unter anderem auch im Hinblick auf die Bemessung des medizinisch-funktionellen Anteils der Minderung der Erwerbsfähigkeit (MdE) von Bedeutung. Zwar existieren mit den GLI-Sollwerten (Quanjer et al. 2012) inzwischen Referenzwerte, die auch das höhere Alter abdecken, jedoch ist die Datenbasis schmal, ferner wurden z. B.

für Kinder bereits signifikante Abweichungen von den GLI-Werten für Deutschland beschrieben (Hüls et al. 2016). Aus diesem Grunde wurden im Rahmen der Nachverfolgung bevölkerungsbezogener Kohorten unter maximalen Qualitätsanforderungen Sollwerte der Spirometrie für Deutschland erhoben. Hierbei lag besonderes Augenmerk auf den bislang nur unzureichend beschriebenen Personen im hohen Lebensalter (Studie 9).

Selbst bei Verfügbarkeit verlässlicher, valider Sollwerte der Spirometrie stellt sich jedoch immer noch die Frage, welche funktionellen Kriterien gewählt werden sollten, um in angemessener Weise das Vorliegen einer pathologischen Abweichung zu beurteilen. Eine solche Einstufung sollte die klinische Symptomatik des Patienten entweder einbeziehen oder zumindest die Beziehung zur Symptomatik explizit darstellen, um klinisch interpretierbar zu sein. Derzeit herrscht kein Konsensus darüber, welche Kriterien bzw. Graduierung einer Obstruktion am ehesten dem klinischen Zustand und Risiko des Patienten gerecht werden, und eine sorgfältige Analyse der Implikationen verschiedener Kriterien erscheint für eine Entscheidung hilfreich. Zu diesem Zweck wurden, ebenfalls in einer bevölkerungsbezogenen Kohorte, die beiden derzeit am meisten diskutierten spirometrischen Kriterien zur Erfassung einer Atemwegsobstruktion miteinander verglichen und beider Effekte auf die Prävalenz der Einstufungen als „pathologisch“ bzw. „normal“ analysiert (Studie 10).



### **3. Ergebnisse und Diskussion**

Vor dem dargestellten Hintergrund wurden im vorliegenden Habilitationsprojekt die folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Die atemzugbezogene intrapulmonale Deposition feiner Partikel in Abhängigkeit vom Spontan-Atemmuster im Tiermodell für eine erwachsene Lunge
2. Die Bedeutung des Lungenreifegrades für die atemzugbezogene intrapulmonale Deposition feiner Partikel im Tiermodell von der unreifen bis zur adulten Lunge
3. Lungenphysiologische und systemische Effekte von Laserdruckeremissionen im Rahmen einer kontrollierten humanen Expositionsstudie
4. Psychologische und kognitive Effekte von Laserdruckeremissionen im Rahmen einer kontrollierten humanen Expositionsstudie
5. Der Zusammenhang spirometrischer Messgrößen mit der Telomerenlänge von Blutleukozyten als Indikator des biologischen Alters
6. Vergleich von Kenngrößen der Lungenfunktion als Indikatoren eines sogenannten Lungenalters
7. Normalwerte für exhalierendes Stickstoffmonoxid und ihre Einflussfaktoren in der Allgemeinbevölkerung
8. Referenzwerte der Impulsozilometrie im fortgeschrittenen Lebensalter
9. Spirometrische Referenzwerte für das fortgeschrittene Lebensalter
10. Die Bedeutung unterschiedlicher spirometrischer Kriterien für die abgeleitete Prävalenz der COPD und ihrer Komorbiditäten in der Allgemeinbevölkerung

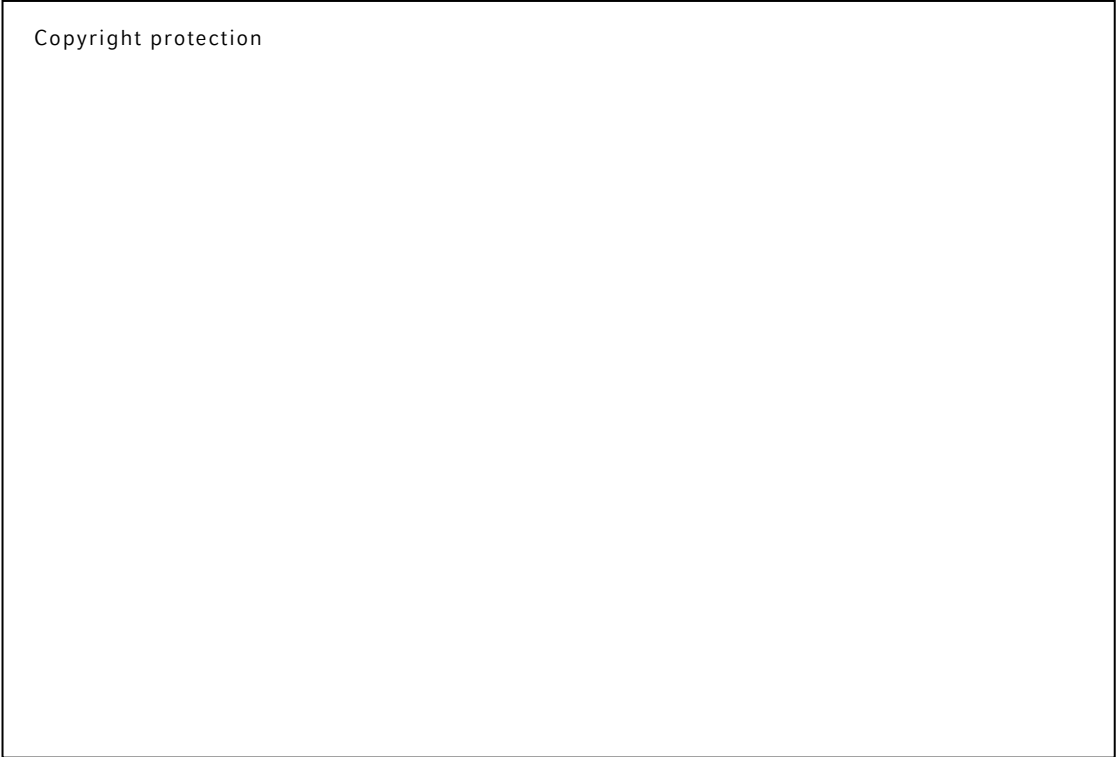
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden näher ausgeführt.

### **3.1. Atemzugbezogene intrapulmonale Deposition feiner Partikel in Abhängigkeit vom Spontan-Atemmuster im Tiermodell für eine erwachsene Lunge**

Ziel dieser Studie war es, die Deposition von feinen Partikeln in Abhängigkeit von den Atemparametern in der erwachsenen Rattenlunge zu bestimmen. Ein Setup für derartige Messungen war bis zur vorliegenden Studie nicht verfügbar.

Zu diesem Zweck wurde ein neues Aerosol-Photometriesystem entwickelt, welches die Bestimmung der Lungendeposition inhalierter Partikel (Di-Ethyl-Hexyl-Sebacat, 2  $\mu\text{m}$  monodispers) in anästhesierten, intubierten und spontan atmenden 90 Tage alten Wistar-Kyoto-Ratten ermöglichte (Abbildung 1). Zwecks paralleler Erfassung der Atemparameter wurde die anästhesierte Ratte in Rückenlage in einer entsprechend miniaturisierten Bodyplethysmographie-Kammer positioniert. Der instrumentelle Totraum des Gesamtsystems wurde auf 310  $\mu\text{l}$  minimiert, entsprechend ca. 20% des Atemtotraums der erwachsenen Ratte. Das entwickelte System gestattete die kontinuierliche Messung der Partikelanzahlkonzentration im Atemvolumen; als Atemparameter wurden zeitgleich u. a. Atemfrequenz (f), Tidalvolumen (VT) sowie Inspirations- und Expirationszeiten aufgezeichnet. Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Atemmuster auf die Deposition wurde zusätzlich die Anästhesie-Tiefe medikamentös moduliert.

Copyright protection



**Abbildung 1:** Schema des experimentellen Aufbaus. Modifiziert nach Karrasch et al. 2009.

Über alle Anästhesie-Stufen hinweg lag VT typischerweise zwischen 1,5 und 4,0 ml bei normaler Atmung und zwischen 4,0 und 10,0 ml bei einzelnen Seufzer-Atemzügen; f lag zwischen 40 und 200 Atemzügen/min. Die Depositionswerte variierten abhängig vom Atemmuster zwischen 5 und 50 %. Die beste Vorhersage der prozentualen Deposition (D) in Abhängigkeit von den Atemparametern wurde durch eine bilineare Funktion von VT und f erreicht und ließ sich als Gleichung  $D = 11,0 - 0,09 \times f + 3,75 \times VT$  beschreiben.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode bietet realistischere Bedingungen für die Bestimmung der Deposition als bisherige Modelle mit beatmeten Tieren und ermöglicht es, die Korrelation zwischen atemzugbezogener Deposition und spontanen Atemmustern zu analysieren. Der Vergleich unterschiedlicher Atemmuster ergab darüber hinaus, dass zur Abschätzung der Deposition die Beschreibung mittels Atemfrequenz und Tidalvolumen der alleinigen Verwendung des Atemminutenvolumens deutlich überlegen ist (Karrasch et al. 2009).

### **3.2. Die Bedeutung des Lungenreifegrades für die atemzugbezogene intrapulmonale Deposition feiner Partikel im Tiermodell von der unreifen bis zur adulten Lunge**


Ziel der Studie war es, die Deposition feiner Partikel in der sich entwickelnden Wistar-Kyoto-Ratte zu bestimmen, deren Lungenentwicklung weitgehend jener des Menschen entspricht.

Zu diesem Zweck wurde das in Studie 1 beschriebene Aerosol-Photometriesystem weiterentwickelt und noch weiter miniaturisiert, um die intrapulmonale Partikeldeposition bei anästhesierten, intubierten, spontan atmenden Ratten an den postnatalen Tagen (P) 7 bis 90 zu ermöglichen. Wie in Studie 1 wurden die Atemparameter dabei mittels miniaturisierter Bodyplethysmographie erfasst.

Das mittlere Tidalvolumen (VT) erhöhte sich erwartungsgemäß von P7 bis P90 (von 0,19 ml auf 2,1 ml), während die Atemfrequenz (f) von 182 auf 107/min zurückging. Die atemzugbezogene Deposition war bei P7 und P90 am geringsten (9 %) und bei P35 deutlich höher (fast 16 %). Die Partikeldeposition pro Zeiteinheit und Oberfläche erreichte ebenfalls ihr Maximum bei P35 und zeigte ein Minimum bei P90. Bei einer inhalierten Partikelanzahlkonzentration von  $10^5 \text{ cm}^{-3}$  entsprach dies etwa 450, 690 und 330 Partikeln/(min·cm<sup>2</sup>) bei P7, P35 und P90 (Abbildung 2). In Regressionsmodellen zeigte sich, dass die Deposition nicht nur von VT und f abhing,

sondern darüber hinaus vom Mean Linear Intercept als Strukturcharakteristikum der Lunge.

Copyright protection



**Abbildung 2:** Intrapulmonale Deposition pro Atemzug (A), Partikeldeposition pro Minute bei einer Partikelanzahlkonzentration von  $10^5/\text{cm}^3$  (B) sowie pro Minute und Oberfläche (C), intrapulmonale Deposition pro Atemzug adjustiert für die totale Lungenkapazität (TLC; D) und Partikeldeposition pro Minute und Körpergewicht (BW; E). Modifiziert nach Schulz et al. 2012.

Die Deposition feiner Partikel war somit abhängig vom Stadium der postnatalen Lungenentwicklung, und ein Maximum trat während der Phase der späten bzw. zweiten Alveolarisation (P35) auf, entsprechend dem Reifegrad der menschlichen Lunge im Alter von ca. 8 Jahren. Kinder in diesem Alter sind daher möglicherweise anfälliger für gesundheitliche Beeinträchtigungen durch partikelförmige Luftschadstoffe (Schulz et al. 2012).

### **3.3. Lungenphysiologische und systemische Effekte von Laserdruckeremissionen im Rahmen einer kontrollierten humanen Expositionsstudie**

Von Laserdruckern emittierte ultrafeine Partikel stehen im Verdacht, gesundheitliche Beeinträchtigungen hervorzurufen. Diese Beeinträchtigungen umfassen nicht nur Befindlichkeitsstörungen, sondern schließen die Vermutung ein, respiratorische und nicht-respiratorische Erkrankungen aufgrund der Exposition zu entwickeln. Der Mangel an gut standardisierten Untersuchungen am Menschen erschwerte allerdings bislang erheblich eine kausale Zuschreibung. Derartige Zuschreibungen können von experimentellen Expositionsstudien geleistet werden, wenngleich diese auf relativ kurzzeitige Expositionen und begrenzte Nachbeobachtungszeiten limitiert sind. Andererseits können diese Einschränkungen dadurch zumindest teilweise kompensiert werden, dass sich auch sehr hohe Expositionslevel in kontrollierter Weise untersuchen lassen. Dies ist relevant, da die Abwesenheit akuter Reaktionen bei extrem hohen kurzzeitigen Expositionen es weniger wahrscheinlich macht, dass Langzeiteffekte auftreten, wie von anderen Luftschadstoffen bekannt. Umgekehrt würde das Auftreten signifikanter Kurzzeiteffekte Langzeiteffekte plausibler machen.

In der vorliegenden Studie wurden 23 gesunde Probanden, 14 Personen mit einem leichtgradigen, stabilen Asthma bronchiale und 15 Personen, die über Symptome im Zusammenhang mit Laserdrucker-Emissionen berichteten, für 75 Minuten gegenüber den Emissionen von Laserdruckern in einem standardisierten, randomisierten Cross-over-Design exponiert. Hierbei wurden die Effekte nach Low-Level-Expositionen ohne detektierbaren Beitrag durch die Laserdrucker und High-Level-Expositionen mit einer Partikelanzahlkonzentration von  $10^5 \text{ cm}^{-3}$  verglichen (Abbildung 3).

Copyright protection

**Abbildung 3:** Typische Verläufe der Partikelanzahlkonzentration während einer High-Level-Exposition (links) und einer Low-Level-Exposition (rechts). Modifiziert nach Karrasch et al. 2017.

Die Untersuchungen vor und nach den Expositionen umfassten Spirometrie, Bodyplethysmographie, die Bestimmung der Transferfaktoren der Lunge für CO und NO (TLCO, TLNO), das exhalierte bronchiale und alveoläre NO, inflammatorische Zytokine in Nasensekret und Serum (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), sowie ECP und IgE im Serum.

Über alle Teilnehmer hinweg zeigten sich unabhängig vom Expositionsszenario keine statistisch signifikanten Veränderungen für Parameter der Lungenmechanik und des NO. Im Mittel trat eine geringfügige Reduktion der volumenbezogenen TLNO auf; diese war bei High-Level-Exposition tendenziell stärker, jedoch war der Unterschied gegenüber Low-Level-Exposition nicht statistisch signifikant. ECP und IgE stiegen nach beiden Expositionen an, das im Nasensekret bestimmte IL-6 zeigte hingegen einen höheren Anstieg nach der Low-Level-Exposition (Tabelle 1). Der Vergleich der Reaktionen in verschiedenen Teilnehmergruppen oder Gruppen von Variablen ergab kein kohärentes Muster.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Veränderungen nach Low-Level-Exposition (LLE) und High-Level-Exposition (HLE). Modifiziert nach Karrasch et al. 2017.

Copyright protection

<sup>a</sup>Die meisten Werte lagen unter der Nachweisgrenze.

<sup>b</sup>Für die in dieser Spalte markierten Parameter wurden log<sub>10</sub>-transformierte Werte verwendet, um die Effekte der Expositionen mittels Wilcoxon-Test oder ANOVA zu untersuchen.

<sup>c</sup>Vergleich der nicht transformierten Prae- und Post-Werte mittels Wilcoxon-Test; \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,005. Die P-Werte sind hier ohne Korrektur für multiples Testen angegeben.

<sup>d</sup>Wilcoxon-Test auf Unterschiede zwischen den log<sub>10</sub>-transformierten Werten, sofern in der 'Log'-Spalte angegeben. P-Werte <0,05 sind fett hervorgehoben.

Insgesamt waren die beobachteten akuten Reaktionen auf die zwar kurze, aber sehr hohe Exposition gegenüber Laserdruckeremissionen sehr gering und nicht als klinisch bedeutsam zu bewerten (Karrasch et al. 2017). Gleichwohl erschienen die beobachteten geringfügigen Änderungen in TLNO interessant, da sie auf subklinische alveoläre Effekte inhalierter Partikel auf den Gasaustausch hinweisen könnten. Inzwischen konnten zusätzliche Hinweise auf einen solchen Mechanismus gefunden werden (Karrasch et al. 2018).

### **3.4. Psychologische und kognitive Effekte von Laserdruckeremissionen im Rahmen einer kontrollierten humanen Expositionsstudie**

Zu den Effekten, die von Personen angegeben werden, welche Laserdruckeremissionen ausgesetzt sind, gehören, wie unter 3.3. erwähnt, vor allem Störungen des Wohlbefindens und Symptome verschiedenster Art. Um hierzu objektive, unter kontrollierten Bedingungen gewonnene Daten zu erhalten, erfolgte im Rahmen der unter 3.3. dargestellten humanen Expositionsstudie über die physiologischen Parameter hinaus auch eine umfangreiche Erfassung potentieller psychologischer und kognitiver Effekte der Laserdruckeremissionen sowie von Symptomen.

Die Untersuchungen waren in den Expositions- und Messablauf der unter 3.3. beschriebenen Studie eingebettet. Sie umfassten Fragebögen zu Affektivität (PANAS), chemischer Geruchssensitivität (CAUS), Symptomen und subjektiven Beschwerden sowie einen Satz PC-basierter kognitiver Tests zur Erfassung von Aufmerksamkeit und Konzentration (d2-Test), Kurzzeitgedächtnis (Benton-Test) und Psychomotorik (Labyrinth-Test).

Analog zu den Ergebnissen der lungenphysiologischen und biochemischen Messungen (Studie 3) traten in diesen Parametern keine kohärenten, zwischen den Expositionen unterschiedlichen oder klinisch bedeutsamen Auswirkungen auf subjektive Beschwerden sowie Aufmerksamkeit, Kurzzeitgedächtnis und psychomotorische Leistung auf. Die Ergebnisse der psychologischen Charakterisierung der Teilnehmer und situativen Wahrnehmung sprachen jedoch für Unterschiede zwischen den Teilnehmergruppen. Probanden, die über Symptome im Zusammenhang mit Laserdruckeremissionen berichteten, zeigten eine höhere psychologische Empfänglichkeit für die Wahrnehmung der Expositionen, im

Einklang mit früheren Beobachtungen bei Personen mit multipler chemischer Sensitivität oder idiopathischer Umweltintoleranz (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Vergleich der Interaktionseffekte von Teilnehmergruppe und Low-Level (LLE) sowie High-Level-Exposition (HLE) auf die Wahrnehmung der Exposition. Modifiziert nach Herbig et al. 2018.

Copyright protection

\*Vergleich aller sechs Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test.

\*\*Fehlerwahrscheinlichkeit 0,1-1%, \*\*\*Fehlerwahrscheinlichkeit  $\leq 0,1\%$ .

<sup>a-f</sup>signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test,  $P \leq 0,05$ ) gegenüber den jeweils mit a – f gekennzeichneten Gruppen.

SRS, selbstberichtete Symptome beim Umgang mit Laserdruckern.

Die akuten psychologischen und kognitiven Wirkungen der Laserdruckeremissionen waren insgesamt gering und hingen lediglich von den Teilnehmergruppen, nicht jedoch den unterschiedlichen Expositionsbedingungen in Bezug auf die Partikelanzahlkonzentration ab (Herbig et al. 2018). Dies spricht dafür, dass Erwartungshaltungen suszeptibler Personen in hohem Maße ihre Wahrnehmung und Symptomatik bestimmen. Gerade dies rechtfertigt die pragmatische Lösung, direkte Expositionen mittels organisatorischer Maßnahmen so weit wie praktikabel zu reduzieren.

### **3.5. Zusammenhang spirometrischer Messgrößen mit der Telomerenlänge von Blutleukozyten als Indikator des biologischen Alters**

Klinische und experimentelle Arbeiten deuten auf eine Beteiligung vorzeitiger Alterungsprozesse bei Entstehung und Fortschreiten chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) hin (Karrasch et al. 2008). Allerdings ist Altern ein so komplexer Prozess, dass sich dafür kaum spezifische Marker finden lassen. Unter den integrativen Markern ist die Telomerenlänge, vor allem die von peripheren Blutleukozyten, am besten etabliert. Die vorliegende Studie untersuchte zum einen, ob das Ausmaß der biologischen Alterung, erfasst über die Telomerenlänge von Blutleukozyten, mit dem Vorliegen von COPD oder Asthma bronchiale assoziiert ist. Zum anderen wurde eruiert, inwieweit biologische Alterungsprozesse zur interindividuellen Variabilität der spirometrischen Lungenfunktion beitragen.

Zu diesem Zweck erfolgte eine Meta-Analyse mit standardisierter Telomerenmessung auf der Basis von insgesamt 14 Studien. Dabei wurden 16.780



Teilnehmer für die COPD-Fragestellung eingeschlossen, 31.029 für die Asthma-Fragestellung und 12.595 für die Analyse des Zusammenhangs mit spirometrischen Messgrößen. Die Assoziationen mit der Telomerenlänge wurden mittels linearer Regression unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht und Raucherstatus analysiert.

Es fanden sich negative Assoziationen zwischen Telomerenlänge und Asthma bronchiale sowie COPD, wobei die Assoziationen bei einer Definition der COPD mittels des altersabhängigen unteren Grenzwertes (Lower Limit of Normal, LLN) des Tiffeneau-Quotienten ( $FEV_1/FVC$ ) stärker und signifikanter ausfielen als bei Verwendung eines festen Wertes von 0,7 für diesen Quotienten (s. u. Studie 10). Für beide Erkrankungen waren die Effekte bei Frauen stärker als bei Männern. Die Untersuchung der spirometrischen Parameter ergab positive Assoziationen zwischen Telomerenlänge und Einsekundenvolumen ( $FEV_1$ ), forcierter Vitalkapazität (FVC) und  $FEV_1/FVC$  (Abbildung 4). Diese Effekte waren bei lungengesunden Teilnehmern etwas schwächer ausgeprägt als bei COPD- oder Asthmapatienten.

Copyright protection

**Abbildung 4:** Assoziation der Telomerenlänge mit a)  $FEV_1$ , b) FVC und c)  $FEV_1/FVC$ . Die Effekte der Einzelstudien und die kombinierten Effekte in Fixed-Effects-Modellen sowie in Random-Effects-Modellen sind in Forest-Plots dargestellt. Die nach Geschlecht stratifizierten Ergebnisse basieren auf Random-Effects-Modellen. Für alle Schätzer sind 95%-Konfidenzintervalle angegeben. FITSA: Finnish Twin Study on Ageing; KORA: Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg; NFBC: Northern Finland Birth Cohort Study. Modifiziert nach Albrecht et al. 2014.

Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine vorzeitige biologische Alterung zur Pathogenese nicht nur einer COPD, sondern auch eines Asthma bronchiale beitragen kann und dass interindividuelle Unterschiede in den spirometrischen Messgrößen zum Teil auch solche der biologischen Alterungsprozesse widerspiegeln (Albrecht et al. 2014). Allerdings verblieb ein hohes Maß an nicht erklärter Varianz. Künftige, weitergehende Analysen sollten daher versuchen, möglichst viele potentielle Einflussfaktoren in standardisierter Weise zu erfassen. Zu diesen Faktoren gehören der Lebensstil inklusive körperlicher Bewegung und Ernährung, das Profil von

Komorbiditäten (die ihrerseits mit der Telomerenlänge assoziiert sein können) und nach Möglichkeit auch der genetische Hintergrund.

### **3.6. Vergleich von Kenngrößen der Lungenfunktion als Indikatoren eines sogenannten Lungenalters**

Die Assoziation zwischen funktionellen Größen bzw. zugrundeliegenden strukturellen Änderungen und dem biologischen Alter wurde inzwischen für viele Erkrankungen beschrieben. In diesem Rahmen werden spirometrische Messgrößen klinisch häufig als Indikatoren einer generellen Lungenalterung eingesetzt, vor allem als Motivationshilfe bei der Raucherentwöhnung in der Erwartung, die Raucher durch Konfrontation mit einem individuellen, objektiven Befund stärker zu beeinflussen als durch allgemeine Ermahnungen. So gerechtfertigt ein solches Vorgehen erscheint, so viele Fragen wirft es aus wissenschaftlicher Sicht auf. Es wurde bislang nicht eruiert, inwieweit eine Verallgemeinerung auf das Lungenalter aus dieser Sicht gerechtfertigt ist. Die vorliegende Studie untersuchte daher die Muster spirometrischer Indizes sowie anderer respiratorischer und funktioneller Parameter bei zwei definierten Gruppen älterer Personen, um festzustellen, ob verschiedene funktionelle Charakteristika der Lunge parallele Unterschiede aufweisen.

Zu diesem Zweck wurden aus den Teilnehmern einer bevölkerungsbezogenen Kohorte im Altersbereich 65-90 Jahre zwei Gruppen entweder vom unteren ( $n=51$ ) oder vom oberen Rand ( $n=72$ ) der Verteilung der Einsekundenkapazität  $FEV_1$  ausgewählt. Bei diesen Personen waren in der klinischen Vorgeschichte keine Lungenerkrankungen bekannt, und sie waren zum Studienzeitpunkt Nichtraucher. Die eingesetzten Untersuchungen umfassten Spirometrie, Bodyplethysmographie, Diffusionskapazität für NO und CO, Funktion der Atempumpe und das exhalierete Stickstoffmonoxid (FeNO). Darüber hinaus wurden die 6-Minuten-Gehstrecke als funktionelles Gesamtmaß sowie die Telomerenlänge peripherer Blut-Leukozyten und die Konzentration von 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) im Serum als Marker für biologische Alterung und oxidativen Stress bestimmt.

In der Mehrzahl der Messgrößen zeigten Personen mit niedrigem  $FEV_1$  im Vergleich zur komplementären Gruppe signifikant beeinträchtigte Werte. Die Unterschiede in den weiteren spirometrischen Parametern, dem Atemwegswiderstand und der Funktion der Atempumpe rangierten zwischen 10 und mehr als 90 % der jeweiligen Referenzwerte. Im Gegensatz dazu waren die Gruppenunterschiede in den volumenbezogenen CO- und NO-Diffusionskapazitäten geringer als 5 %.

Telomerenlänge, 8-OHdG und FeNO waren in beiden Gruppen ähnlich, allerdings zeigten Personen mit niedrigem FEV<sub>1</sub> eine Tendenz zu geringerer Telomerenlänge, i.e. höherem biologischen Alter. Die genannten Unterschiede spiegeln sich in entsprechenden Unterschieden des berechneten "funktionellen Alters" wider, wie es sich aus den Referenzgleichungen der Einzelmessgrößen ableiten lässt (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Medianes "funktionelles Alter" der Personen mit hohem FEV<sub>1</sub> (weiß) und niedrigem FEV<sub>1</sub> (grau) für ausgewählte Parameter. Die Whisker zeigen das untere und obere Quartil an, die gestrichelte schwarze Linie entspricht dem mittleren chronologischen Alter aller Probanden. Ein niedrigeres „funktionelles Alter“ ist also beispielsweise mit höheren Werten für FEV<sub>1</sub>% Soll assoziiert. Modifiziert nach Karrasch et al. 2018.

Bei älteren anamnestisch lungengesunden Personen waren somit die Unterschiede der spirometrischen Parameter den Unterschieden anderer lungenmechanischer Parameter einschließlich solcher der Bodyplethysmographie ähnlich, nicht hingegen den Unterschieden der volumenkorrigierten Diffusionskapazitäten. Zumindest für wissenschaftliche Zwecke sollte daher das Konzept eines allgemeinen "Lungenalters" verlassen werden und spezifischere Bezeichnungen wie etwa „spirometrisches Alter“ Verwendung finden (Karrasch et al. 2018).

### **3.7. Normalwerte für exhalierendes Stickstoffmonoxid und ihre Einflussfaktoren in der Allgemeinbevölkerung**

In den letzten 20 Jahren wurde die Bewertung respiratorischer Erkrankungen durch die Erfassung von Parametern ergänzt, die auf nicht-invasive oder wenig invasive Weise gewonnen werden können. Dahinter steht im Sinne der Prävention der Gedanke, einen Krankheitsprozess bereits in einem frühen Stadium erfassen zu können, bevor er zu bleibenden strukturellen und funktionellen Änderungen führt. Neben der Technik der elektronischen Nase, die sich immer noch in einem explorativen Stadium befindet, ist die Messung des Anteils von Stickstoffmonoxid in der Ausatemluft (FeNO) zu nennen; diese Methode hat sich inzwischen in der klinischen Praxis fest etabliert. FeNO dient als nicht-invasiver Marker einer Th2-vermittelten Atemwegsentzündung und wird insbesondere im Rahmen der Diagnostik und Verlaufskontrolle des Asthma bronchiale eingesetzt (Buhl et al. 2017, Karrasch et al. 2017). Inzwischen wurden mehrere Faktoren beschrieben, die den gemessenen FeNO-Wert beeinflussen und bei seiner Interpretation zu berücksichtigen sind. Während FeNO für die longitudinale Verfolgung auch ohne Berücksichtigung dieser Faktoren aussagekräftig ist, gilt dies nicht für den diagnostischen Einsatz, der die Bewertung einer einzelnen Messung erfordert, sei es im arbeitsmedizinischen oder epidemiologischen Zusammenhang. Dies geht nur auf der Basis angemessener Normalwerte, die alle relevanten Faktoren berücksichtigen. Ziel der vorliegenden Studie war es, derartige Normalwerte für FeNO in der Allgemeinbevölkerung zu erheben und die Abhängigkeit von den Effekten und Wechselwirkungen wichtiger Einflussfaktoren zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden FeNO-Werte in einer bevölkerungsbezogenen Stichprobe von 1.250 Erwachsenen im Alter zwischen 41 und 63 Jahren erhoben. Mittels Kovarianzanalyse wurde der Einfluss von Alter, Körpergröße, Geschlecht, spirometrischer Lungenfunktion, aktuellem Rauchstatus, kürzlich vorangegangenen Atemwegsinfekt und Atemwegsallergie eruiert.

Der geometrische Mittelwert für FeNO über die gesamte Population hinweg betrug 13,9 ppb. FeNO war abhängig von Alter, Größe, Rauchstatus, einem vorangegangenen Infekt und dem Bestehen einer respiratorischen Allergie. Aktives Rauchen reduzierte FeNO um 21 %, während das Vorliegen einer Atemwegsallergie zu einem Anstieg um 11 % führte. Weiterhin wurden positive Assoziationen mit Alter und Körpergröße beobachtet (Tabelle 3). Bei Nichtrauchern zeigte sich eine numerisch unabhängige Überlagerung der Faktoren, während die Wirkung einer

respiratorischen Allergie bei Rauchern ohne gleichzeitigen Infekt praktisch eliminiert wurde.

**Tabelle 3:** Parameter-Schätzer des finalen Modells einschließlich der Interaktionen. Modifiziert nach Karrasch et al. 2011.

Copyright protection

Diese Daten zeigen, dass es zwar parallele Effekte auf FeNO zwischen Rauchern und Nichtrauchern gibt, dennoch beide Gruppen getrennt bewertet werden sollten. Bei Nichtrauchern mittleren Alters können die Einflüsse von Atemwegsinfekt, Alter und Größe in der Interpretation des FeNO-Wertes auf einfache Weise berücksichtigt werden. Bei aktiven Rauchern hingegen scheinen die Auswirkungen heterogen, und hier ist die zusätzliche Berücksichtigung der Rauchintensität hilfreich (Karrasch et al. 2011). Daher muss der FeNO-Wert bei Rauchern zwar nicht verworfen werden, ist aber nur eingeschränkt interpretierbar.

### **3.8. Referenzwerte der Impulsoszillometrie im fortgeschrittenen Lebensalter**

In Anbetracht der Schwierigkeiten, die aus Mitarbeitersproben bei der Spirometrie resultieren, sind Verfahren, die geringe Kooperationsanforderungen stellen, von besonderem Interesse. Derartige Verfahren erfordern typischerweise vom Patienten nur eine Ruheatmung über eine bestimmte Zeitperiode. Ihre diagnostische Anwendung ist von besonderem Wert bei Patienten im fortgeschrittenen Alter, im Falle von Verständigungsproben etwa sprachlicher Natur sowie bei Personen mit körperlichen oder geistigen Einschränkungen, die eine Spirometrie nicht oder nur mit Mühen durchführen können. Die Impulsoszillometrie (IOS) ist eine derartige, einfach durchzuführende Methode, die nur geringe Anforderungen an die Mitarbeit stellt. Für Mitteleuropa lagen bislang nur wenige Referenzgleichungen vor, welche zudem das fortgeschrittene Alter nicht abdecken. Die vorliegende Studie hatte das Ziel, Referenzgleichungen für die IOS bis ins hohe Alter zu finden und in Beziehung zu den bislang verfügbaren Referenzwerten zu setzen.

In einer bevölkerungsbezogenen Stichprobe von 1.990 Probanden im Alter von 45-91 Jahren wurden impulsoszillometrische Messungen durchgeführt. Von diesen Probanden wurden 397 lungengesunde Nieraucher mit normaler Spirometrie in die vorliegende Analyse eingeschlossen. Mittels quantiler Regressionsmodelle wurden unter Berücksichtigung von Geschlecht, Alter, Größe und Körpergewicht Referenzgleichungen für alle wichtigen Parameter der IOS bestimmt.

Frauen zeigten höhere Werte der Resistance (ohmscher Wirkwiderstand) als Männer, während die Werte der Reactance (Scheinwiderstand vor allem durch elastische Elemente) bei Frequenzen bis 20 Hz geringer waren. Eine signifikante Altersabhängigkeit ergab sich für die Differenz der Resistance-Werte bei 5 Hz und 20 Hz ( $R5-R20$ ), die Fläche unter der Reactance-Frequenzkurve, sowie die Resonanzfrequenz (Nulldurchgang der Reactance-Frequenzkurve) bei beiden Geschlechtern; hingegen war die Reactance bei 5 Hz ( $X5$ ) nur bei Frauen altersabhängig. Bei den gesunden Probanden rangierten die mittleren Abweichungen zwischen den beobachteten Werten und den Vorhersagen für Resistance und Reactance bei Verwendung des vorliegenden Modells zwischen -1% und 5%. Im Gegensatz dazu lagen die Unterschiede gegenüber den bislang vorliegenden Gleichungen (Vogel und Smidt 1994, Newbury et al. 2008) zwischen -34% und 76% (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Unterschiede zwischen beobachteten Werten und den Vorhersagen für R5, R20 und X5 bei lungengesunden Teilnehmern. Modifiziert nach Schulz et al. 2013.

Copyright protection

<sup>†</sup>oberhalb des oberen Grenzwertes (ULN), <sup>‡</sup>unterhalb des unteren Grenzwertes (LLN).


Vor allem im fortgeschrittenen Alter erscheint daher die Anwendung der hier ermittelten aktuellen Referenzwerte empfehlenswert, um respiratorische Einschränkungen frühzeitig zu erkennen (Schulz et al. 2013). Es steht zu hoffen, dass insbesondere bei der Untersuchung von Personen mit Verständigungsproblemen sowie im geriatrischen Bereich die hier vorgestellten, besser als bisher definierten Sollwerte der Anwendung der Impulsoszillometrie förderlich sind.

### **3.9. Spirometrische Referenzwerte für das fortgeschrittene Lebensalter**

Für die Spirometrie als pneumologische und arbeitsmedizinische Basisuntersuchung wurden vielfältige Normalwerte veröffentlicht, jedoch sind in den meisten dieser Studien Personengruppen im fortgeschrittenen Alter deutlich unterrepräsentiert; dies gilt auch für die derzeit verbreitet genutzten Referenzwerte der Global Lung Initiative (GLI) (Quanjer et al. 2012). Hinzu kommt, dass keineswegs gesichert ist, dass die für „Kaukasier“ von GLI beschriebenen Sollwerte für mitteleuropäische Populationen, insbesondere Deutschland, optimal sind. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, auf Basis einer Bevölkerungsstichprobe spirometrische Referenzwerte vor allem für das fortgeschrittene Alter zu ermitteln und diese mit Werten aus anderen populationsbasierten Studien zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurden die Spirometrien von 592 Nie-Rauchern ohne Atemwegserkrankungen im Alter von 42-89 Jahren eingeschlossen. Mittels des Verfahrens der quantilen Regression wurden Referenzgleichungen für den Median und den unteren Grenzwert (Lower Limit of Normal, LLN) für ein Spektrum spirometrischer Indizes abgeleitet, einschließlich Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ), forcierter Vitalkapazität (FVC), Tiffeneau-Wert ( $FEV_1/FVC$ ) und expiratorischer Flussraten. Gegenüber früher publizierten Referenzgleichungen lagen die Werte für  $FEV_1$  und FVC geringfügig höher, die für PEF niedriger. Die forcierten Ausatemraten bei mittleren und niedrigen Lungenvolumina, als Indikatoren von Veränderungen der kleinen Atemwege, stimmten mit jüngsten Daten gut überein (Abbildung 6).

Copyright protection



**Abbildung 6:** Exemplarische Darstellung der abgeleiteten unteren Grenzwerte (LLN) für FEF<sub>75</sub> im Vergleich zu früher publizierten Referenzwerten (Quanjer et al. 1993, Kuster et al. 2008). Modifiziert nach Karrasch et al. 2013.

Die Studie lieferte somit aktuelle Referenzwerte für alle wichtigen Parameter der spirometrischen Flussvolumenkurve bis ins hohe Alter und ermöglicht damit insbesondere in dieser vulnerablen Bevölkerungsgruppe eine adäquate und frühzeitige Detektion von Ventilationsstörungen (Karrasch et al. 2013).

### **3.10. Bedeutung unterschiedlicher spirometrischer Kriterien für die abgeleitete Prävalenz der COPD und ihrer Komorbiditäten in der Allgemeinbevölkerung**

Die Frage der angemessenen spirometrischen Definition einer Atemwegsobstruktion zum Nachweis von COPD ist in der pneumologischen Forschung nach wie vor Gegenstand intensiver Diskussion. Unklar ist dabei auch, in welchem Zusammenhang verschiedene spirometrische Kriterien, insbesondere im fortgeschrittenen Alter, mit der Prävalenz häufiger Komorbiditäten der COPD sowie den Spiegeln systemischer Entzündungsmarker stehen. Eine sorgfältige vergleichende Analyse, welche die letztgenannten Aspekte miteinbezieht, ist hilfreich, um zu einem Konsensus über die Kriterien zu kommen.

In der vorliegenden Studie wurde die genannte Analyse anhand einer bevölkerungsbezogenen Kohorte mit 2.256 Teilnehmern über einen Altersbereich von 41-90 Jahren geleistet. Das Vorliegen einer COPD wurde spirometrisch entweder



durch einen festen Quotienten (fixed ratio, FR) von  $<0,7$  für den Tiffeneauwert  $FEV_1/FVC$  definiert, alternativ dadurch, dass der Wert von  $FEV_1/FVC$  unterhalb des unteren Grenzwertes (5. Perzentile, Lower limit of normal, LLN) lag. Die Prävalenzen wichtiger Komorbiditäten sowie die Konzentrationen zirkulierender Entzündungsmarker (CRP, IL-6) wurden anhand linearer Regressionsmodelle zwischen Teilnehmern verglichen, die diesen Kriterien einer COPD genügten oder nicht.

Die Prävalenz der mittels FR definierten COPD stieg mit zunehmendem Alter deutlich an, von 10 % bei Personen im Alter  $<65$  Jahre auf 26 % bei Personen im Alter  $\geq 75$  Jahre. Bei Verwendung des LLN-Kriteriums hingegen blieb sie für alle Altersgruppen unter 10 % (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Prävalenz einer mittels des festen Quotienten (hellgrau) oder mittels des unteren Grenzwertes (dunkelgrau) spirometrisch definierten COPD nach Altersgruppen. Modifiziert nach Karasch et al. 2016.

Insgesamt war für beide Definitionen eine COPD-Diagnose nicht mit Unterschieden der Prävalenz spezifischer Komorbiditäten gegenüber Teilnehmern ohne COPD verbunden, abgesehen von einer jeweils geringeren Prävalenz von Adipositas. Die Serumkonzentrationen von CRP und IL-6 lagen bei den gemäß beiden Kriterien definierten COPD-Fällen tendenziell höher als in den jeweils als gesund definierten Personen. Insgesamt lag somit bei Erwachsenen im fortgeschrittenen Lebensalter die Prävalenz einer gemäß dem FR-Kriterium definierten COPD deutlich höher als für das LLN-Kriterium, und dieser Unterschied nahm mit dem Alter weiter zu. Hingegen waren weder die Prävalenz häufiger Komorbiditäten noch die

Konzentration der betrachteten Entzündungsmarker wesentlich von der Wahl des Kriteriums beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigten kein so eindeutiges Bild in Hinsicht auf Komorbiditäten und Entzündungsmarker, dass von dieser Seite her eine Entscheidung zwischen den spirometrischen Kriterien möglich gewesen wäre. Allerdings ist bei der Interpretation berücksichtigen, dass die in der Studienpopulation beobachteten Fälle von Atemwegsobstruktion überwiegend einen geringen Schweregrad aufwiesen (Karrasch et al. 2016). Inwieweit die gleichzeitig nach dem FR-Kriterium als COPD und nach dem LLN-Kriterium als gesund beurteilten Teilnehmer prognostische Unterschiede zeigen, muss im Follow-Up der Studie geklärt werden.

#### **4. Zusammenfassung und Ausblick**

Im vorliegenden Habilitationsprojekt wurden mittels vier einander ergänzender methodischer Ansätze (tierexperimentell, humanexperimentell, zellbiologisch, lungenfunktionsdiagnostisch) einerseits die Bedeutung berufs- oder umweltassoziierten inhalativer Noxen in Hinblick auf Entstehung und Verlauf obstruktiver Atemwegserkrankungen, andererseits die möglichst frühzeitige, verlässliche und sensitive Detektion dieser Erkrankungen und ihrer zugrundeliegenden pathophysiologischen Alterationen untersucht.

Die gewonnenen Erkenntnisse liefern neben Hinweisen auf krankheits- und symptomverursachende Mechanismen auch Anhaltspunkte zur Identifikation besonders gefährdeter Personen, sowohl bezüglich umwelt- oder berufsbezogener inhalativer Expositionen als auch hinsichtlich diskreter und teilweise noch subklinischer funktioneller Einschränkungen. Sie unterstützen damit die Entwicklung gezielter und praktikabler Maßnahmen zur primären und sekundären Prävention obstruktiver Atemwegserkrankungen nicht nur am Arbeitsplatz, sondern auch in der Allgemeinbevölkerung. Dieses Ziel soll in vertiefenden Untersuchungen weiterverfolgt werden.

In Anbetracht der hohen Bedeutung von Komorbiditäten insbesondere bei Patienten mit COPD soll die Sensitivität nicht-invasiver Messverfahren zur frühzeitigen Detektion diskreter pulmonaler Veränderungen aufgrund der Effekte nicht-pulmonaler Erkrankungen auf die Lunge näher eruiert werden. So gibt es etwa Hinweise auf mikroangiopathische Veränderungen in der Lungenperipherie bei Patienten mit Diabetes mellitus (Weynand et al. 1999). In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung der COSYCONET-Kohorte konnte bei COPD-

Patienten allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Parametern des pulmonalen Gasaustausches nachgewiesen werden, möglicherweise aufgrund der bei diesen Patienten bereits ausgeprägten Strukturveränderungen der Lunge (Kahnert et al. 2017). Es soll daher geprüft werden, inwieweit in der überwiegend lungengesunden Allgemeinbevölkerung das Vorliegen eines Diabetes mellitus bzw. einer gestörten Glukose-Toleranz mit einer Veränderung des pulmonalen Gasaustausches, bestimmt mittels NO-CO-Diffusionskapazität, assoziiert ist.

Darüber hinaus soll das Spektrum der im vorliegenden Habilitationsprojekt verwendeten nicht-invasiven Diagnostik respiratorischer Einschränkungen um bildgebende Verfahren erweitert werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Magnetresonanztomographie (MRT), welche in jüngerer Vergangenheit zunehmend auch in bevölkerungsbezogenen Kohorten eingesetzt wird. So werden etwa in der NAKO-Gesundheitsstudie (n=200.000), im Rahmen derer der Habilitand für die Lungenfunktionsuntersuchungen (Spirometrie, FeNO) verantwortlich ist, in einer Subgruppe von Teilnehmern Ganzkörper-MRT-Untersuchungen durchgeführt, die eine Analyse struktureller Eigenschaften des respiratorischen Systems ermöglichen (Bamberg et al. 2015). In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung von 400 Teilnehmern der KORA-Kohorte konnten Assoziationen von MRT-basierten respiratorischen Parametern mit dem Vorliegen von COPD bzw. Emphysem sowie Indizes der Spirometrie und des pulmonalen Gasaustausches bereits gezeigt werden (Mueller et al. 2019). Eine Eruierung des diagnostischen Wertes avanciert analysierter magnetresonanztomographisch gewonnener Daten zur Detektion und Phänotypisierung berufs- und umweltbedingter obstruktiver Atemwegserkrankungen erscheint vor diesem Hintergrund vielversprechend.

## 5. Literaturverzeichnis

- Albrecht E, Sillanpaa E, Karrasch S, Alves AC, Codd V, Hovatta I, Buxton JL, Nelson CP, Broer L, Hagg S, Mangino M, Willemssen G, Surakka I, Ferreira MAR, et al. (2014). "Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease." *European Respiratory Journal* 43(4): 983-992.
- Bamberg F, Kauczor HU, Weckbach S, Schlett CL, Forsting M, Ladd SC, Greiser KH, Weber MA, Schulz-Menger J, Niendorf T, Pischon T, Caspers S, Amunts K, Berger K, et al. (2015). "Whole-Body MR Imaging in the German National Cohort: Rationale, Design, and Technical Background." *Radiology* 277(1): 206-220.
- Baur X, Heutelbeck A, Kujath P, Stahlkopf H (2011). "Prävention arbeitsbedingter obstruktiver Atemwegserkrankungen: Interdisziplinäre S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin." *Pneumologie* 65(5): 263-282.
- Buhl R, Bals R, Baur X, Berdel D, Criece CP, Gappa M, Gillissen A, Greulich T, Haidl P, Hamelmann E, Kardos P, Kenn K, Klimek L, Korn S, et al. (2017). "S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma." *Pneumologie* 71(12): 849-919.
- Cordoba-Lanus E, Cazorla-Rivero S, Espinoza-Jimenez A, de-Torres JP, Pajares MJ, Aguirre-Jaime A, Celli B und Casanova C (2017). "Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort." *Respir Res* 18(1): 59.
- Croisant S (2014). "Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease." *Adv Exp Med Biol* 795: 17-29.
- Engel J, van Kampen V, Lotz A, Abramowski J, Gering V, Hagemeyer O, Bruning T, Raulf M und Merget R (2018). "An increase of fractional exhaled nitric oxide after specific inhalation challenge is highly predictive of occupational asthma." *Int Arch Occup Environ Health* 91(7): 799-809.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. (2019). "Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD." 2019, from <https://goldcopd.org>.
- Herbig B, Jörres RA, Schierl R, Simon M, Langner J, Seeger S, Nowak D und Karrasch S (2018). "Psychological and cognitive effects of laser printer emissions: A controlled exposure study." *Indoor Air* 28(1): 112-124.
- Hüls A, Krämer U, Gappa M, Müller-Brandes C, Schikowski T, von Berg A, Hoffmann B, Schuster A, Wisbauer M, Flexeder C, Heinrich J, Schulz H und Berdel D (2016). "Age Dependency of GLI Reference Values Compared with Paediatric Lung Function Data in Two German Studies (GINIplus and LUNOKID)." *PLoS One* 11(7): e0159678.
- Jörres RA, Karrasch S, Nowak D und Ochmann U (2017). "Laserdrucker und Kopierer." *Umweltmedizin: Neue Erkenntnisse aus Wissenschaft und Praxis*. S. Schmitz-Spanke, T. Nessler, S. Letzel und D. Nowak. Landsberg am Lech, ecomed Medizin: 152-162.
- Kahnert K, Lucke T, Biertz F, Lechner A, Watz H, Alter P, Bals R, Behr J, Holle R, Huber RM, Karrasch S, Stubbe B, Wacker M, Söhler S, et al. (2017). "Transfer factor for carbon monoxide in patients with COPD and diabetes: results from the German COSYCONET cohort." *Respir Res* 18(1): 14.
- Karrasch S, Behr J, Huber RM, Nowak D, Peters A, Peters S, Holle R, Jörres RA, Schulz H und KORA Study Group (2018). "Heterogeneous pattern of differences in respiratory parameters between elderly with either good or poor FEV1." *BMC Pulm Med* 18(1): 27.
- Karrasch S, Bröske I, Smith MP, Thorand B, Huth C, Ladwig KH, Kronenberg F, Heinrich J, Holle R, Peters A und Schulz H (2016). "What is the impact of different spirometric criteria on the prevalence of spirometrically defined COPD and its comorbidities? Results from the population-based KORA study." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 11: 1881-1894.
- Karrasch S, Eder G, Bolle I, Tsuda A und Schulz H (2009). "Breath-by-breath measurement of particle deposition in the lung of spontaneously breathing rats." *J Appl Physiol* (1985) 107(4): 1293-1299.

- Karrasch S, Ernst K, Behr J, Heinrich J, Huber RM, Nowak D, Wichmann HE, Baumeister SE, Meisinger C, Ladwig KH, Holle R, Jörres RA, Schulz H und KORA Study Group (2011). "Exhaled nitric oxide and influencing factors in a random population sample." *Respir Med* 105(5): 713-718.
- Karrasch S, Flexeder C, Behr J, Holle R, Huber RM, Jörres RA, Nowak D, Peters A, Wichmann HE, Heinrich J, Schulz H und KORA Study Group (2013). "Spirometric reference values for advanced age from a South German population." *Respiration* 85(3): 210-219.
- Karrasch S, Holz O und Jörres RA (2008). "Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema." *Respiratory Medicine* 102(9): 1215-1230.
- Karrasch S, Linde K, Rucker G, Sommer H, Karsch-Volk M, Kleijnen J, Jörres RA und Schneider A (2017). "Accuracy of FENO for diagnosing asthma: a systematic review." *Thorax* 72(2): 109-116.
- Karrasch S, Radtke T, Simon M, Kronseder A, Dressel H, Jörres RA und Ochmann U (2018). "Acute effects of hypertonic saline inhalation on nitric oxide pulmonary diffusing capacity in healthy adults." *Respir Physiol Neurobiol* 258: 40-46.
- Karrasch S, Simon M, Herbig B, Langner J, Seeger S, Kronseder A, Peters S, Dietrich-Gümperlein G, Schierl R, Nowak D und Jörres RA (2017). "Health effects of laser printer emissions: a controlled exposure study." *Indoor Air* 27(4): 753-765.
- Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, et al. (2014). "Geroscience: linking aging to chronic disease." *Cell* 159(4): 709-713.
- Kuster SP, Kuster D, Schindler C, Rochat MK, Braun J, Held L und Brändli O (2008). "Reference equations for lung function screening of healthy never-smoking adults aged 18-80 years." *Eur Respir J* 31(4): 860-868.
- Lucke T (2015). "Vergleichende Analyse biologischer Alterungsmarker bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD)." Dissertation, LMU.
- Mannino DM und Buist AS (2007). "Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends." *Lancet* 370(9589): 765-773.
- Mueller J, Karrasch S, Lorbeer R, Ivanovska T, Pomschar A, Kunz WG, von Krüchten R, Peters A, Bamberg F, Schulz H und Schlett CL (2019). "Automated MR-based lung volume segmentation in population-based whole-body MR imaging: correlation with clinical characteristics, pulmonary function testing and obstructive lung disease." *Eur Radiol* 29(3): 1595-1606.
- Newbury W, Crockett A und Newbury J (2008). "A pilot study to evaluate Australian predictive equations for the impulse oscillometry system." *Respirology* 13(7): 1070-1075.
- Ochmann U und Nowak D (2014). "Arbeitsplatzassoziierte obstruktive Atemwegserkrankungen." *Handbuch der Arbeitsmedizin*. S. Letzel and D. Nowak. Landsberg/Lech, ecomed Verlagsgesellschaft.
- Postma DS, Bush A und van den Berge M (2015). "Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease." *Lancet* 385(9971): 899-909.
- Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, Enright PL, Hankinson JL, Ip MS, Zheng J, Stocks J und die ERS Global Lung Function Initiative (2012). "Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations." *Eur Respir J* 40(6): 1324-1343.
- Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R und Yernault JC (1993). "Lung volumes and forced ventilatory flows." *Eur Respir J* 6 Suppl 16: 5-40.
- Saferali A, Lee J, Sin DD, Rouhani FN, Brantly ML und Sandford AJ (2014). "Longer telomere length in COPD patients with alpha1-antitrypsin deficiency independent of lung function." *PLoS One* 9(4): e95600.
- Schulz H, Eder G, Bolle I, Tsuda A und Karrasch S (2012). "Micron-sized intrapulmonary particle deposition in the developing rat lung." *J Appl Physiol* (1985) 112(5): 759-765.

- Schulz H, Flexeder C, Behr J, Heier M, Holle R, Huber RM, Jörres RA, Nowak D, Peters A, Wichmann HE, Heinrich J, Karrasch S und KORA Study Group (2013). "Reference values of impulse oscillometric lung function indices in adults of advanced age." PLoS One 8(5): e63366.
- Tossa P, Paris C, Zmirou-Navier D, Demange V, Acouetey DS, Michaely JP und Bohadana A (2010). "Increase in exhaled nitric oxide is associated with bronchial hyperresponsiveness among apprentices." Am J Respir Crit Care Med 182(6): 738-744.
- Vogel J und Smidt U (1994). "Impulse Oscillometry – Analysis of Lung Mechanics in General Practice and the Clinic, Epidemiological and Experimental Research." Frankfurt, Pmi Verlagsgruppe GmbH.
- Weynand B, Jonckheere A, Frans A und Rahier J (1999). "Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina." Respiration 66(1): 14-19.

## **6. Originalarbeiten der Habilitationsschrift**

1. **Karrasch S**, Eder G, Bolle I, Tsuda A, Schulz H (2009). "Breath-by-breath measurement of particle deposition in the lung of spontaneously breathing rats." *Journal of Applied Physiology* 107(4): 1293-1299.
2. Schulz H, Eder G, Bolle I, Tsuda A und **Karrasch S** (2012). "Micron-sized intrapulmonary particle deposition in the developing rat lung." *Journal of Applied Physiology* 112(5): 759-765.
3. **Karrasch S**, Simon M, Herbig B, Langner J, Seeger S, Kronseder A, Peters S, Dietrich-Gümperlein G, Schierl R, Nowak D und Jörres RA (2017). "Health effects of laser printer emissions: A controlled exposure study. " *Indoor Air* 27(4):753-765.
4. Herbig B, Jörres RA, Schierl R, Simon M, Langner J, Seeger S, Nowak D und **Karrasch S** (2018). "Psychological and cognitive effects of laser printer emissions: A controlled exposure study." *Indoor Air* 28(1):112-124.
5. Albrecht E\*, Sillanpaa E\*, **Karrasch S\***, Alves AC\*, Codd V, et al. (2014). "Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease." *European Respiratory Journal* 43(4): 983-992. \*equal contribution
6. **Karrasch S**, Behr J, Huber RM, Nowak D, Peters A, Peters S, Holle R, Jörres RA und Schulz H; KORA Study Group (2018). "Heterogeneous pattern of differences in respiratory parameters between elderly with either good or poor FEV1." *BMC Pulm Med* 18(1):27.
7. **Karrasch S**, Ernst K, Behr J, Heinrich J, Huber RM, Nowak D, Wichmann HE, Baumeister SE, Meisinger C, Ladwig KH, Holle R, Jörres RA und Schulz H (2011). "Exhaled nitric oxide and influencing factors in a random population sample." *Respiratory Medicine* 105(5): 713-718.
8. Schulz H, Flexeder C, Behr J, Heier M, Holle R, Huber RM, Jörres RA, Nowak D, Peters A, Wichmann HE, Heinrich J und **Karrasch S** (2013). "Reference Values of Impulse Oscillometric Lung Function Indices in Adults of Advanced Age." *PLoS ONE* 8(5):e63366.
9. **Karrasch S**, Flexeder C, Behr J, Holle R, Huber RM, Jörres RA, Nowak D, Peters A, Wichmann HE, Heinrich J und Schulz H (2013). "Spirometric reference values for advanced age from a South German population." *Respiration* 85(3): 210-219.
10. **Karrasch S**, Bröske I, Smith MP, Thorand B, Huth C, Ladwig K-H, Kronenberg F, Heinrich J, Holle R, Peters A und Schulz H (2016). "What is the impact of different spirometric criteria on the prevalence of spirometrically defined COPD and its comorbidities? Results from the population-based KORA study." *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* Volume 11: 1881-1894.